

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„*Nocardia farcinica* aktiviert humane dendritische Zellen und
induziert die Sekretion von Interleukin-23“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ariane Buchal

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. R. Ignatius
 2. Prof. Dr. med. S. Ehlers
 3. Prof. Dr. T. Laskay

Datum der Promotion: 24.02.2012

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|-------|
| 1. | Einleitung | Seite |
| 1.1 | Geschichte der Impfstoffentwicklung | 5 |
| 1.2 | Adjuvantien: Entwicklung und aktueller Stand | 7 |
| 1.3 | Dendritische Zellen | 8 |
| 1.4 | T-Zell-Aktivierung | 9 |
| 1.5 | Nocardien | 10 |
| 1.6 | Nocardien und ihre Wirkung auf das Immunsystem | 12 |
| 1.7 | Ziel dieser Arbeit und Fragestellungen | 14 |
| 2. | Material und Methoden | |
| 2.1 | Materialverzeichnis | 15 |
| 2.1.1 | Technische Geräte | 15 |
| 2.1.2 | Chemikalien und Lösungen | 15 |
| 2.1.3 | Kulturmedien | 16 |
| 2.1.4 | Antikörper und ELISA | 16 |
| 2.1.5 | Antibiotika | 17 |
| 2.1.6 | Bakterienkultur | 17 |
| 2.1.7 | Zytokine | 17 |
| 2.1.8 | Blutprodukte | 17 |
| 2.1.9 | Kleinmaterialien | 17 |
| 2.2 | Methoden | |
| 2.2.1 | Gewinnung von DCs | 18 |
| 2.2.2 | Gewinnung von T-Zellen | 19 |
| 2.2.3 | Anzucht von <i>N. farcinica</i> , Herstellung von Suspensionen für die Inkubation mit DCs und zur Keimzahlbestimmung | 20 |
| 2.2.4 | Inkubation der DCs mit <i>N. farcinica</i> | 20 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.2.5 | Nachweis intrazellulärer Nocardien | 21 |
| 2.2.6 | Bestimmung der Anzahl intrazellulärer, lebender Bakterien | 22 |
| 2.2.7 | Phänotypisierung der DCs | 22 |
| 2.2.8 | Gleichzeitiger Nachweis von Phagozytose und Reifung | 23 |
| 2.2.9 | Durchflusszytometrie | 23 |
| 2.2.10 | Zytokinbestimmung | 23 |
| 2.2.11 | Gemischte Leukozyten Reaktion (MLR) | 23 |
| 2.2.12 | Apoptose-Nachweis durch TUNEL-Assay | 24 |
| 2.2.13 | Statistik | 25 |
| 3. | Ergebnisse | |
| 3.1 | Etablierung des Versuchsystems | 26 |
| 3.2 | Aufnahme von <i>N. farcinica</i> durch DCs | 26 |
| 3.3 | Nocardien induzieren MOI-abhängig Apoptose in DCs | 28 |
| 3.4 | <i>N. farcinica</i> überlebt nicht in DCs | 30 |
| 3.5.1 | Aktivierung von DCs durch <i>N. farcinica</i> | 31 |
| 3.5.2 | Aktivierung von DCs auch ohne intrazelluläre Aufnahme von Nocardien | 33 |
| 3.5.3 | Lösliche Faktoren in <i>N. farcinica</i> -stimulierten Zellkulturüberständen haben keinen Einfluß auf die DC-Aktivierung | 34 |
| 3.5.4 | Aktivierung von DCs nach Inkubation mit inaktivierten Nocardien | 35 |
| 3.6 | Gesteigerte T-Zellproliferation durch <i>N. farcinica</i> -stimulierte DCs | 36 |
| 3.7 | Sekretion von IL-10, IL-12p40, IL-12p70 und IL-23 | 37 |
| 4. | Diskussion | 42 |
| 5. | Zusammenfassung | 48 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 50 |

1. Einleitung

1.1 Geschichte der Impfstoffentwicklung

Seit der Entdeckung von Antibiotika und der Entwicklung von Impfstoffen konnten Inzidenz und Mortalität zahlreicher Infektionskrankheiten drastisch reduziert werden. Waren Infektionskrankheiten im 19. Jahrhundert noch die Haupttodesursache weltweit, wurden sie in den Industrieländern im 20. Jahrhundert durch Stoffwechsel- und Tumorerkrankungen abgelöst. Durch die Einführung der Pockenimpfung im Rahmen einer weltweiten Impfkampagne konnte die WHO am 08. Mai 1980 die Welt für Pocken-frei erklären (1). Die Inzidenz von Infektionskrankheiten wie Poliomyelitis und Influenza konnte ebenfalls durch Impfungen stark reduziert werden (2),(3). Erkrankungen wie Tuberkulose, Malaria oder AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) stellen jedoch ein zunehmendes globales Problem dar. Im Jahr 2007 waren 33,2 Millionen Menschen weltweit infiziert mit HIV, es traten 2,5 Millionen Neuinfektionen auf und 2,1 Millionen Menschen verstarben (4). 68% der Infizierten kommen aus der subsaharischen Region Afrikas. Durch zahlreiche Aufklärungs- und Präventionskampagnen sowie die Versorgung mit antiretroviralen Mitteln nimmt die Anzahl neuer Infektionen zwar ab, da eine Heilung jedoch nicht möglich ist und die Lebenszeit medikamentös verlängert wird, steigt die absolute Anzahl HIV-Infizierter nach wie vor.

Steigende Antibiotikaresistenzen, vermehrte Reiseaktivität, Armut und schlechte Lebensbedingungen in den ärmsten Ländern der Welt sind Gründe für eine weltweit steigende Anzahl an Tuberkuloseerkrankten sowie eine unverändert hohe Anzahl an Malaria-Fällen. Im Jahr 2006 traten 9,2 Millionen Neuerkrankungen an Tuberkulose auf, 1,7 Millionen Menschen verstarben an der Erkrankung (5). Die absolute Anzahl an Tuberkulose-Neuerkrankungen steigt nach wie vor.

An Malaria erkranken jährlich mehr als 500 Millionen Menschen, davon versterben mehr als 1 Millionen Erkrankte (6). Betroffen sind insbesondere Kinder und schwangere Frauen in Afrika, Lateinamerika, Asien und im mittleren Osten. Die Problematik von Infektionskrankheiten wie AIDS, Malaria und Tuberkulose verdeutlicht, wie wichtig die Entwicklung neuer, effektiver Impfstoffe ist.

Ein beim Menschen einsetzbarer Impfstoff muss mehrere Bedingungen erfüllen. Er soll langfristigen Schutz geben und sicher und damit nebenwirkungsarm sein. Hinzu kommen eine möglichst preiswerte Herstellung und Aspekte der Stabilität. Damit eine Vakzine langfristigen Schutz ermöglicht, muss es zu einer Aktivierung der spezifischen Immunabwehr kommen.

Dies umfasst die Aktivierung spezifischer B- und T-Lymphozyten, welche B- und T-Gedächtniszellen bilden. Diese können lange Zeit im Körper persistieren und bei erneutem Antigenkontakt eine rasche Abwehrreaktion unter Bildung spezifischer Antikörper (Ak) und Aktivierung zytotoxischer und T-Helfer-Zellen initiieren, so dass ein Ausbruch der Krankheit beim Geimpften vermieden oder abgeschwächt werden kann.

Die Grundidee der Impfung hat ihren Ursprung in der Vorstellung, dass man sich durch die Zufuhr der für eine Krankheit verantwortlichen Substanz in kleinster Dosierung vor der Erkrankung schützen kann. Bereits im 11. Jahrhundert wurde in China Schorf Pockenerkrankter inhaliert zum Schutz vor Pocken (7). Die kutane Variolation nahm ihren Ursprung in Indien. Dabei wurde eine kleine Menge des ausgetrockneten Pustelinhaltes Pockenerkrankter in die Haut Gesunder überimpft (8). 1796 entdeckte Jenner, dass eine lokale Infektion mit den für den Menschen weniger gefährlichen Kuhpocken Schutz gegen eine nachfolgende Infektion mit menschlichen Pocken verleiht (9). 1874 wurde die Pockenschutzimpfung mit dem Vacciniavirus, welches Eigenschaften des Variola- als auch des Kuhpockenvirus besitzt, in Deutschland als Pflichtimpfung eingeführt. Aufgrund von Impfrisiken wie einer Erregerverschleppung von der Impfstelle beim Geimpften in Form einer Schmierinfektion mit Ausbildung von Ekzemen oder Augeninfektionen wurde die Impfpflicht 1974 wieder aufgehoben. Auch bestand die Gefahr einer generalisierten Streuung, insbesondere bei Immungeschwächten, sowie einer Enzephalitis (10). 1881 entdeckte Pasteur, dass attenuierte Erreger der Spezies *Pasteurella multocida*, welche durch Wärme in ihrer Pathogenität abgeschwächt waren, vor einer möglichen Infektion mit dem Erreger schützen konnten (11). Damit begann die Entwicklung der attenuierten Lebendimpfstoffe. Pasteur erreichte eine Attenuierung über physikalisch-chemische Prozesse wie Temperatur und Sauerstoffgehalt. Anfang des 20. Jahrhunderts schwächten Calmette und Guérin einen *Mycobacterium bovis* Stamm in seiner Pathogenität durch zahlreiche Passagen in künstlichen Nährmedien ab (12). Dieser bis 1974 in Deutschland regelmäßig eingesetzte Impfstoff *M. bovis* BCG wird auch heute noch in Entwicklungsländern als Impfstoff verwendet.

Bei dem Einsatz von Lebendimpfstoffen besteht für den Geimpften, und unter Umständen für enge Kontaktpersonen, ein Restrisiko zu erkranken. Bei geschwächtem Immunstatus können tödliche, systemische Infektionen hervorgerufen werden (13). Die Entwicklung inaktivierter Impfstoffe ab Ende des 19. Jahrhunderts gewährleistete ein höheres Maß an Sicherheit. Inaktivierte Vakzine und Totimpfstoffe wurden durch Studien im 20. Jahrhundert weiterentwickelt mit dem Ziel zu definieren, welche Bestandteile eines Erregers eine protektive Immunantwort induzieren. Es wurden Impfstoffe entwickelt, die gereinigte

Untereinheiten des Erregers, meist Proteine oder Polysaccharide, enthielten (8). Im Vergleich zu einem Lebendimpfstoff bieten Totimpfstoffe ein höheres Maß an Sicherheit, da eine Vermehrung des Erregers nicht möglich ist. Totimpfstoffe zeichnen sich jedoch auch durch ein geringeres Antigen (Ag)-Repertoire aus und weisen dadurch eine geringere Immunogenität auf, so dass in der Regel Mehrfachimpfungen und der Zusatz von Adjuvantien notwendig sind (14).

Um die Zellen der spezifischen Immunabwehr aktivieren zu können, muss es zu mindestens zwei Interaktionen kommen. Das Ag muss, gekoppelt an MHC (major histocompatibility complex = Haupthistokompatibilitätskomplex)-Proteine einer antigenpräsentierenden Zelle (APC), dem T-Zell-Rezeptor präsentiert werden. Außerdem muss eine Rezeptorinteraktion zwischen kostimulatorischen Molekülen stattfinden (15). Werden der T-Zelle keine kostimulatorischen Moleküle präsentiert, findet keine Aktivierung statt und es entwickelt sich Toleranz gegenüber dem gezeigten Ag (15). Proteinimpfstoffe führen in den meisten Fällen nicht zu einer Expression von kostimulatorischen Molekülen auf APCs. Um Proteine als Vakzine einsetzen zu können, müssen daher Substanzen hinzugefügt werden, welche zur Expression der benötigten Moleküle führen. Diesen Zweck können Adjuvantien erfüllen.

1.2 Adjuvantien: Entwicklung und aktueller Stand

Der Name „Adjuvans“ leitet sich ab vom lateinischen „adjuvare“ = unterstützen. Adjuvantien sind Substanzen, die unspezifisch die spezifische Immunantwort auf ein Ag verstärken (16).

Verschiedene Beobachtungen zu Beginn des 20. Jahrhunderts führten zur Entwicklung von Adjuvantien. Nach der Impfung von Pferden mit dem Diphtherie-Toxoid wiesen jene Tiere höhere Ak-Titer auf, welche einen lokalen Abszess, hervorgerufen durch nicht mit dem Impfstoff assoziierte Substanzen oder Erreger, an der Injektionsstelle entwickelten, als die Pferde, die keine lokale Entzündungsreaktion zeigten (17). 1916 berichteten Le Moignie und Pinoy, dass mineralische Öl-Emulsionen Immunantworten auf ein Ag verstärkten, und 1926 entdeckten Glenny et al. die immunstimulierende Wirkung von Aluminium-Bestandteilen (18). Verschiedene weitere Substanzen, z.B. Wasser-in-Öl-Emulsionen, Mineralien, bakterielle Derivate, natürliche und künstliche oberflächenaktive Stoffe, wurden ebenfalls auf ihre Wirkung auf das Immunsystem getestet (15).

Neben der immunstimulierenden Wirkung muss die Sicherheit für den Einsatz beim Menschen gegeben sein. Diese Bedingung erfüllten zahlreiche Substanzen nicht. Das 1936 von Freund entwickelte komplette Freundsche Adjuvans, bestehend aus abgetöteten Mykobakterien in einer Wasser-in-Öl-Emulsion, zeigte sich als ungeeignet, da die

Applikation schwere lokale und systemische Reaktionen hervorrufen kann (19). Von den wenigen für den Menschen zugelassenen Adjuvantien sind Aluminiumsalze die am häufigsten eingesetzten Substanzen, da sie sich durch die geringste Toxizität auszeichnen. Jedoch sind auch diese nicht nebenwirkungsfrei. Sterile Abszesse und Eosinophilie können auftreten, sehr selten eine Myofasziitis. Hohe Aluminiumspiegel können neurotoxisch wirken (19). Aluminiumsalze führen zu einer Differenzierung von T-Helfer-(T_H)-Zellen zu T_H2-Zellen und aktivieren somit die humorale Abwehr unter Bildung spezifischer Ak. Die zelluläre Immunantwort mit Aktivierung zytotoxischer T-Zellen durch T_H1-Zellen wird nicht induziert. Die Abwehr obligat intrazellulärer Bakterien, vieler Parasiten oder Viren ist jedoch abhängig von zytotoxischen T-Zellen. Aluminiumsalze wären daher in Impfstoffen gegen Erkrankungen wie Malaria, HIV und Tuberkulose kein geeignetes Adjuvans (15). Das Fehlen eines Adjuvans, welches die Differenzierung von T_H-Zellen zu T_H1-Zellen fördert, ist damit ein zentrales Problem bei der Entwicklung neuer Impfstoffe.

Zahlreiche Substanzen wurden auf ihre Einsetzbarkeit getestet. Aus dem Bereich der mikrobiellen Stimuli zeigte sich der Einsatz ganzer Erreger wie Mykobakterien, Corynebakterien, Bordetellen oder Neisserien als Adjuvantien als zu toxisch, ebenso Lipopolysaccharid (LPS) oder Lipid A aus der Zellwand gramnegativer Bakterien. In Erprobung waren auch andere Bakterienbestandteile wie N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) und bakterielle DNA mit unmethylierten CpG-Sequenzen, welche sehr potente Stimuli der Immunabwehr sind. Ebenso wurden Substanzen wie das Kohlenhydrat Inulin, virusähnliche Partikel und Zytokine auf ihre Wirkung getestet. Substanzen, die das Immunsystem in der Form beeinflussen, dass gezielt T_H1-Antworten induziert werden, und die gleichzeitig sicher für den Einsatz beim Menschen sind, sind jedoch bisher nicht bekannt (19).

1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind potente APCs, die T- und B-Lymphozyten aktivieren und zur Differenzierung anregen können (20). Sie können damit, z.B. bei der Induktion von T_H1-Antworten, eine wichtige Rolle für die Entwicklung neuer Adjuvantien spielen. DCs sind Bestandteil der angeborenen, unspezifischen Abwehr. Sie residieren in einer unreifen Form in peripheren Geweben wie der Haut, Schleimhaut und dem Respirationstrakt und sind damit eine Art „Wachposten“ an möglichen Eintrittspforten für Erreger (20). Dringen Erreger ein, so können sie von DCs phagozytiert werden. Für die Erkennung dieser fremden Ag haben Rezeptoren, die Bestandteile von Mikroorganismen erkennen, wie z.B. Toll-ähnliche

Rezeptoren (Toll Like Receptors = TLR) eine bedeutende Funktion. Sie werden als „pattern recognition receptors“, d.h. Muster-erkennende Rezeptoren bezeichnet (21). Diese Rezeptoren befinden sich auf der Oberfläche und im Zellinneren u.a. von DCs, Makrophagen, T-Zellen und Endothelzellen. TLRs sind ein sehr alter Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie dienen der Erkennung von typischen, in der Evolution konservierten, stabilen Bestandteilen von Bakterien, Pilzen, Protozoen und Viren. Intrazellulär in den DCs findet eine Prozessierung der Ag statt, um Proteinbestandteile der Erreger an der Oberfläche, gekoppelt an MHC-Molekülen, Zellen der spezifischen Immunantwort präsentieren zu können. Durch den extra- oder intrazellulären Kontakt zwischen Erreger und DC, z.B. vermittelt durch TLRs, kommt es zur Aktivierung und damit zur Reifung der DC (22). Dieser Reifungsprozess ist gekennzeichnet durch zahlreiche Veränderungen. Unreife DCs zeichnen sich durch eine sternförmig verzweigte, d.h. dendritische Form aus, um für die Interaktion mit Erregern eine möglichst große Oberfläche bieten zu können. Aktivierte DCs haben weniger die Funktion der Phagozytose sondern aktivieren ihrerseits durch die Präsentation antigener Peptide und die Synthese von Zytokinen T-Lymphozyten. Aktivierte DCs verändern ihre Form, runden sich ab und wandern zum nächstgelegenen Lymphknoten, wo sie in die T-Zellareale einwandern. Um naive T_H -Zellen aktivieren zu können, müssen neben dem Ag zahlreiche kostimulatorische Moleküle präsentiert werden. DCs verändern während der Reifung das Spektrum an Oberflächenmolekülen. MHC-II-Moleküle, die kostimulatorischen Oberflächenproteine CD(cluster of differentiation)40, CD80 und CD86 werden vermehrt exprimiert, die Reifungsmarker CD25 und CD83 werden hochreguliert und erscheinen an der Oberfläche (22). Reife DCs sind durch ihre Fähigkeit, naive T-Zellen aktivieren zu können und dadurch zelluläre Immunantworten induzieren zu können, ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener, unspezifischer und erworbener, spezifischer Abwehr.

1.4 T-Zell-Aktivierung

Nach der Interaktion mit DCs proliferieren die aktivierten T_H -Zellen. Das umgebende Zytokinmilieu, die von DCs präsentierten kostimulatorischen Moleküle und Größe und Konformation des MHCII-Ag-Komplexes auf DCs entscheiden über die folgende Differenzierung der T_H -Zellen (23). Werden DCs zur Synthese von Interleukin(IL)-12 stimuliert, so fördert das die Differenzierung von T_H1 -Zellen. Eine T_H1 -Antwort führt zur Aktivierung der zellulären Abwehr und ist durch folgende Veränderungen gekennzeichnet. Durch die Sekretion von $IFN-\gamma$ und die Expression des CD40-Liganden werden Makrophagen aktiviert, die daraufhin in der Lage sind, aufgenommene Bakterien zu zerstören. Die

Sekretion von IL-2 bewirkt eine T-Zell-Proliferation, zytotoxische T-Zellen werden aktiviert, welche infizierte Zellen durch Apoptose töten (23). Das eine T_H1 -Antwort initiiierende Zytokin IL-12 ist ein Heterodimer von 70 kDa, welches aus 2 Untereinheiten besteht (IL-12p40 und IL-12p35). Die beiden Untereinheiten werden von unterschiedlichen Genen kodiert (24). Während in Abwesenheit der IL-12p40-Untereinheit ein Funktionsverlust der Abwehrreaktion auftritt, zeigen IL-12p35-knock-out-Mäuse eine Ag-spezifische T_H1 -Reaktion mit Synthese von IFN- γ (25). Diese Beobachtungen sind auf IL-23, ein weiteres Mitglied der IL-12-Familie, zurückzuführen, welches ebenso wie IL-12 die p40-Untereinheit beinhaltet. IL-23 wird ebenfalls von DCs synthetisiert, besteht aus den Untereinheiten p40 und p19 und begünstigt die Differenzierung zu T_H17 -Zellen (26). T_H17 -Zellen sind eine kürzlich entdeckte Untergruppe der T_H -Zellen, die sich durch die Synthese von IL-17 auszeichnen (27). IL-17 induziert die Synthese proinflammatorischer Zytokine, welche u.a. eine Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bewirken. Diese Reaktion läuft rasch innerhalb von Stunden ab und dient der lokalen Abwehr zur Verhinderung septischer Verläufe, da sich eine T_H1 -Antwort erst nach einigen Tagen ausbildet. Bei überschießender Synthese von IL-23 und IL-17 besteht die Gefahr der Ausbildung von Autoimmunreaktionen (26). T_H17 -Zellen können jedoch auch die T-Zell-vermittelte IFN- γ -Produktion unterstützen, indem durch die Sekretion von Chemokinen T_H1 -Zellen rekrutiert werden (25).

Eine T_H2 -Antwort wird durch die Sekretion des Zytokins IL-4 initiiert. Sie ist gekennzeichnet durch die Aktivierung von B-Lymphozyten, welche zur Synthese von Immunglobulinen der Klasse IgG1 und IgE stimuliert werden (28).

Ein Gegenspieler von IL-12 ist IL-10. Es wird ebenfalls u.a. von DCs synthetisiert und beeinträchtigt die Aktivierung von T_H -Zellen, indem die Synthese von IL-12 und die Migration der aktivierten DCs zum nächsten Lymphknoten gehemmt wird (29). Es konnte auch gezeigt werden, dass IL-10 eine immunmodulierende Funktion erfüllt. So werden überschießende T-Zellaktivierungen vermieden. Des Weiteren wird eine spontane Aktivierung von DCs ohne Stimulus verhindert, indem auch unreife DCs kleine Mengen an IL-10 sezernieren (30).

1.5 Nocardien

Mykobakterien sind potente Stimuli der zellulären Immunität, sodass sie schon früh zur Entwicklung von Adjuvantien herangezogen wurden (31). Die Zellwand stellte sich als der für die Immunstimulation verantwortliche Bestandteil heraus. Es konnte gezeigt werden, dass

es zu einer Aktivierung von DCs durch Stimulation mit der Zellwand von Mykobakterien kommt (32).

Verwandt mit den Mykobakterien sind Nocardien. Sowohl Nocardien als auch Mykobakterien sind grampositive, stäbchenförmige, fakultativ intrazelluläre Bakterien, die unter aeroben Bedingungen wachsen und sich durch einen hohen Anteil an Mykolsäuren in der Zellwand auszeichnen. Nocardien sind dadurch partiell, Mykobakterien vollständig säurefest, d.h. sie sind nach Färbung mit Karbolfuchsin durch Zugabe von 3% Salzsäurealkohol nur schwer bzw. nicht entfärbbar. Die beiden Genera *Nocardia* und *Mycobacterium* unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Pathogenität und den hervorgerufenen Erkrankungen. Während einige Spezies der Mykobakterien wie *M. tuberculosis* und *M. bovis* auch für den Immunkompetenten ein hohes Infektionsrisiko darstellen, verursachen Nocardien hauptsächlich bei Immunsupprimierten schwerwiegende Infektionen (33).

Der Genus *Nocardia* lässt sich in zahlreiche Spezies untergliedern (siehe Tabelle 1), die sich in der Zusammensetzung ihrer Zellwandbausteine, in der Wachstumsgeschwindigkeit, in der Morphologie, in ihren biochemischen Eigenschaften, hinsichtlich der verursachten Infektionen und der Ansprechbarkeit auf Antibiotika unterscheiden. Allen gemeinsam ist das typische verzweigt-filamentäre Wachstum, welches an ein Pseudomyzel erinnert. Zu den wichtigsten humanpathogenen Nocardien zählen *Nocardia(N.) asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum* und *N. farcinica*. Nocardien kommen ubiquitär in Erdböden, Gewässern, organischen Materialien und insbesondere Staub vor. Eintrittspforten sind der Respirationstrakt bei Inhalation kontaminierter Stäube und Läsionen von Haut und Schleimhaut, wo sie eitrige Entzündungen und Abszesse verursachen können. Betroffen sind davon in aller Regel Patienten mit einem Defekt der zellulären Immunabwehr, beispielsweise HIV-Patienten. In diesen Fällen kann es zu schweren Krankheitsbildern mit hämatogener Dissemination kommen. Ein bevorzugter Absiedlungsort ist das zentrale Nervensystem.

Tabelle 1: Nocardia-Spezies mit klinischer Relevanz

| Spezies | Primär assoziierte Erkrankungen | | |
|---|---------------------------------|-------|-----------------------|
| | Haut | Lunge | disseminierter Befall |
| <i>N. abscessus</i> | | + | + |
| <i>N. africana</i> | | + | |
| <i>N. asteroides</i> | + | + | + |
| <i>N. brasiliensis</i> | + | | |
| <i>N. farcinica</i> | | + | + |
| <i>N. nova</i> | | + | + |
| <i>N. otitidiscaviarum</i> (ehemals <i>N. caviae</i>) | + | + | + |
| <i>N. paucivorans</i> | | + | + |
| <i>N. pseudobrasiliensis</i> | | + | + |
| <i>N. pneumoniae</i> | | + | |
| <i>N. transvalensis</i> | | + | + |

1.6 Nocardien und ihre Wirkung auf das Immunsystem

Die Wirkungen von Nocardien auf verschiedene Zellen des Immunsystems wurden in den letzten Jahrzehnten in zahlreichen Studien untersucht. So wurden thymektomierte Mäuse mit gesunden Kontrollmäusen hinsichtlich ihrer Reaktion auf eine lokale Infektion mit *N. asteroides* in der Pfote verglichen. Thymektomierte Mäuse, welche durch eine Insuffizienz des T-Zellsystems ausgezeichnet sind, entwickelten schwere systemische Infektionen und verstarben, während die Kontrollmäuse nur temporär lokale Abszesse entwickelten (34). Die Arbeitsgruppe um G.A. Filice konnte zeigen, dass nicht aktivierte neutrophile Granulozyten und Monozyten trotz der Bildung von Sauerstoffradikalen *N. asteroides* intrazellulär nicht abtöten können (35). Studien zur Interaktion von Makrophagen und Nocardien zeigten, daß aktivierte Peritonealmakrophagen *Toxoplasma-gondii*-infizierter Mäuse ein intrazelluläres Wachstum von *N. asteroides* verhindern und die Bakterien abtöten. In nicht aktivierten Peritonealmakrophagen gesunder Mäuse kommt es zu einer starken Bakterienvermehrung und

letztendlich zur Apoptose der Makrophagen (36). Eine andere Arbeitsgruppe konnte im Kaninchenmodell zeigen, daß *N. asteroides* die Fusion von Phagosomen und Lysosomen in Alveolarmakrophagen verhindert. Zugabe von Serum und Lymphknotenzellsuspensionen aus Kaninchen, die zuvor mit *N. asteroides* immunisiert wurden, führte in den Makrophagen zu vermehrter Phagosom-Lysosom-Fusion mit dem Effekt, dass mehr Nocardien abgetötet wurden. Zugabe von Komplementfaktoren zeigte hingegen keinen Effekt (37). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass offenbar T-Lymphozyten und aktivierte Makrophagen eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Nocardien spielen.

In klinischen Studien wurden die Effekte von Nocardien auf das Immunsystem untersucht. In den 70er und 80er Jahren wurden prospektive, randomisierte Fall-Kontroll-Studien zum Einsatz des Zellwandgerüsts von *N. rubra* in der adjuvanten Tumorthherapie durchgeführt. Bei Patienten mit einem operablen Lungenkarzinom wurde postoperativ entweder nur eine Chemotherapie oder zusätzlich noch eine Immuntherapie durchgeführt. Letztere bestand aus der einmaligen intrapleuralem Instillation einer Suspension mit dem Zellwandgerüst von *N. rubra* und anschließender mehrfacher intradermaler Injektion. Durch die Immuntherapie kam es zu einer statistisch signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit ($p < 0,01$) sowie einer Senkung der Rezidivrate im Vergleich zur postoperativen Chemotherapie (38). Über einen Beobachtungszeitraum von 4 Jahren traten bei 14,9 % der Patienten mit alleiniger Chemotherapie lokale Rezidive auf, in der Gruppe der Patienten mit zusätzlicher Immuntherapie gab es innerhalb des Zeitraumes keine lokalen Rezidive. Fernmetastasen traten nach Immuntherapie bei 18,9 % der Patienten bzw. 34 % der Patienten mit alleiniger Chemotherapie auf.

Da *N. farcinica* im Gegensatz zu *N. asteroides*, fast ausschließlich Immunsupprimierte infiziert und somit von einer protektiven, zellvermittelten Immunität in Immunkompetenten ausgegangen werden kann, und sie zudem mit einem systemischen Organbefall und nicht nur lokalen Erkrankungen assoziiert ist, wurde sie für die vorliegende Arbeit ausgewählt.

1.7 Ziel dieser Arbeit und Fragestellungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Interaktion von DCs mit Nocardien, welche bislang nicht untersucht wurde. Erkenntnisse darüber könnten für die Entwicklung verbesserter Adjuvantien von Interesse sein.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

1. Werden Nocardien durch DCs phagozytiert und lassen sich diese intrazellulär nachweisen?
2. Welche Folgen hat diese Interaktion für das Überleben der Bakterien bzw. Zellen?
3. Kommt es durch den Kontakt zu *N. farcinica* zur Aktivierung und Reifung von DCs?
4. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Prozess der Phagozytose und der Aktivierung der DCs?
5. Ist im Falle einer Reifung der Prozess abhängig von lebenden Erregern?
6. Spielen Zytokine eine Rolle bei der Initiierung der Reifung?
7. Werden T-Lymphozyten durch den Kontakt mit *N. farcinica*-inkubierten DCs aktiviert?
8. Werden DCs durch die Interaktion mit *N. farcinica* zur Sekretion von Zytokinen wie IL-12, IL-23 oder IL-10 angeregt?

2. Material und Methoden

2.1 Materialverzeichnis

2.1.1 Technische Geräte

Brutschrank mit CO₂-Zufuhr (Heraeus, Hanau)
Durchflusszytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg)
Schüttler, Modell Kühner (B.Braun, Melsungen)
Mikroskop Standard 14 (Zeiss, Oberkochen)
Zentrifuge Varifuge RF, ø 18 cm (Heraeus)
Zentrifuge Rotina 35, ø 35 cm (Hettich, Tuttlingen)
Zentrifuge Eppendorf 5417R, ø 17 cm (Eppendorf, Hamburg)

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

FACS-Fix: Formaldehyd 37% Solution (Sigma-Aldrich, Steinheim) 54 ml
Phosphate buffered saline (PBS), (Biochrom, Berlin) 500 ml
FACS-Wash: Natriumazid (Fluka, Sigma-Aldrich) 5 ml
PBS (Biochrom) 500 ml
Fötales Kälberserum (FCS, Biochrom) 25 ml
Ficoll-Paque (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden)
LPS (*E. coli*, 0111:B4)
MACS-Puffer: bovines Serum-Albumin (BSA) 7,5% (Sigma-Aldrich) 33 ml
PBS (Biochrom) 466 ml
EDTA 500 nM, pH8 (Gibco, Invitrogen) 1 ml
Natrium-Zitrat (Merck)
PBS Dulbecco 9,55 g/l (Biochrom AG)
PBS-B: 1% BSA in PBS
PBS-T: 0,05% Tween 20 in PBS
PBS-TB: PBS-T mit 0,5% BSA
Paraformaldehyd (PFA) 4% Lösung (Sigma-Aldrich)
Saponin (Sigma-Aldrich)
Schwefelsäure H₂SO₄ 2M
Substratpuffer für ELISA: 12,85 ml Na₂HPO₄ 0,2 M + 12,15 ml Zitronensäure 0,1 M + 25 ml
Aqua dest.
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Tabletten (Sigma-Adrich)

3H-Thymidin (Perkin-Elmer, Boston, USA)

Triton X (Sigma-Aldrich)

Trypanblau 0,5% (Biochrom)

Tween 20 (Sigma-Aldrich)

2.1.3 Kulturmedien

Agar: 15 g/l Caseinpepton, 5 g/l Sojamehlpepton, 5 g/l Natriumchlorid, 15 g/l Agar, suspendiert in 1 l destilliertem Wasser, pH 7,3

Brain-Heart-Infusion-Bouillon (BHI / Oxoid, Wesel)

Kochblutagar: 900 ml Agar mit 10 % Schafsblut, 30 Min. im 90°C warmen Wasserbad inkubiert, intermittierend geschüttelt, auf 50 °C abgekühlt und als Platten gegossen

R10 Zellkulturmedium: RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) 500 ml, Hepes 1 M (Gibco) 25 ml, FCS (Biochrom) 25 ml, Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg) 50 µM

2.1.4 Antikörper und ELISA

Anti-HLA-DR-FITC, Klon L243 (BD Biosciences)

Anti-CD3-Ak, Klon SP34

Anti-CD14-PE, Klon MΦP9 (BD Biosciences)

Anti-CD25-PE, Klon 2A3 (BD Biosciences)

Anti-CD40-PE, Klon mAb89 (Coulter-Immunotech, Krefeld)

Anti-CD80-PE, Klon L307.4 (BD Biosciences)

Anti-CD83-PE, Klon HB15e (Caltay Lab., Hamburg)

Anti-CD86-PE, Klon 2331/FUN-1 (BD Biosciences)

Anti-IgG1/IgG2a-PE/FITC, Klon X40 (BD Biosciences)

Anti-CD14-Ak (Maus-IgG1), Klon M-T321, gekoppelt an Magnetpartikel (beads), (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Anti-FITC-Ak, gekoppelt an Magnetpartikel (beads), (MACS, Miltenyi Biotec)

Maus-anti-Kaninchen-Ak-FITC

Polyklonales Kaninchen-Serum gegen *M. tuberculosis* BCG mit Kreuzreaktivität gegen Nocardien (zur Verfügung gestellt von Dr. Timo Ulrichs, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie Berlin)

ELISA-Kits: IL-10 ELISA Monkey, IL-12 p40/p70- und IL-12p70-ELISA (U-CyTech Biosciences, Utrecht, Niederlande)

IL-23 ELISA (eBiosciences, San Diego, USA)

2.1.5 Antibiotika

Amikacin (ICN Biomedicals, Eschwege)

Penicillin/Streptomycin (Biochrom)

2.1.6 Bakterienkultur

Nocardia farcinica, Stamm ATCC 3308

2.1.7 Zytokine

rekombinantes, humanes TNF- α (R&D Systems)

rekombinantes, humanes IL-1 β (Biosource GmbH, Solingen)

rekombinantes, humanes IL-6 (Biosource GmbH)

rekombinantes, humanes PGE-2 (Sigma)

rekombinantes, humanes GM-CSF (Sargramostim Leukine, Berlex, Österreich)

rekombinantes, humanes Interleukin(IL)-4 (R&D Systems, Wiesbaden-Nordernstadt)

2.1.8 Blutprodukte

Leukozytenkonzentrat (DRK Berlin)

2.1.9 Kleinmaterialien

Einmalspritzen, 10 ml (Braun, Melsungen)

Filter für Sterilfiltration, Porengröße 0,45 μm (Renner GmbH, Dannstadt)

MACS-Beading-Trennsäulen (Miltenyi Biotec)

Mikropipetten, 10 μl , 200 μl , 1000 μl (Eppendorf)

Mikro-Schraubröhrchen, 1,5 ml (Sarstedt)

Neubauer-Zählkammern (Brand, Wertheim)

Rundbodenröhrchen, 5 ml (BD Falcon)

Serologische Pipetten, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (BD Falcon)

Zellkulturplatten: 6- und 24-Well-Flachbodenplatten (Nunc)

96-Well-Rundbodenplatte (Nunc)

96-Well-Spitzbodenplatte (Greiner bio-one, Frickenhausen)

Zentrifugenröhrchen, 15 ml (Nunc)

Zentrifugenröhrchen, 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht)

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von DCs

Leukozytenkonzentrate wurden mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt. 50-ml-Röhrchen wurden mit 10 ml Ficoll gefüllt, das Ficoll wurde langsam mit 40 ml des verdünnten Leukozytenkonzentrates überschichtet. Die Röhrchen wurden 20 min bei 1000 g, 22°C und ohne Bremse zentrifugiert. Die oberste Phase (Plasma) wurde abgesaugt und verworfen. Die Interphase mit den PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) wurde vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und in ein neues 50-ml-Röhrchen überführt.

Dann wurden die PBMCs zur Reinigung in 50 ml PBS resuspendiert und 10 min bei 600 g, 4°C zentrifugiert. Sie wurden 2x mit 30 ml PBS resuspendiert und 10 min bei 350 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 10 ml R10 Zellkulturmedium resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden nach Färbung mit 10 µl Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Dann wurden die Monozyten separiert. Hierzu wurden die Zellen 2x für 10 min bei 350 g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 80 µl MACS-Puffer/10⁷ Zellen resuspendiert. Durch Zugabe von 20 µl Anti-CD14-beads/10⁷ Zellen erfolgte die Markierung der Zellen. Die Zellen wurden für 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und anschließend gewaschen, d.h. nach Zugabe von MACS-Puffer (10-20fache Menge des Markierungsvolumens) für 10 min bei 350 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl MACS-Puffer/10⁸ Zellen resuspendiert.

Zur Separation der Zellen wurde die in den Magneten eingerastete Trennsäule zunächst mit 500 µl MACS-Puffer gespült, anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde 3 x mit 500 µl MACS-Puffer gespült, anschließend aus dem Magneten genommen und es wurde 1 ml MACS-Puffer aufgetragen. Die positiven Zellen wurden mit dem Stempel in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen gedrückt und mit 9 ml Medium aufgefüllt. Die so gewonnenen CD14-positiven Zellen wurden 2 x für 10 min bei 350 g und 4°C zentrifugiert und in 10 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt (siehe oben).

In einigen Experimenten (Ausnahme Zytokinbestimmung) wurden Monozyten über die Adhärenzmethode gewonnen, bei der man sich zunutze macht, dass Monozyten an Plastikoberflächen adhären. Hierzu wurden in jede Vertiefung einer 6-well-Platte 1x10⁷ PBMCs in 3 ml Medium gegeben. Die Platte wurde 90 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nicht adhärenzte Zellen wurden durch vorsichtiges Spülen der Platte entfernt.

Hierzu wurden in jede Vertiefung 2 ml 37°C warmes PBS oder Medium gegeben und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Dieser Vorgang wurde 4 x wiederholt.

Anschließend wurden die Monozyten zu DCs differenziert. Hierzu wurden die adhärenierten Zellen mit jeweils 3 ml Medium in einer 6-Well-Platte resuspendiert bzw. 3×10^6 CD14-positiven Zellen mit 3 ml Medium pro Well einer 6-Well-Platte gegeben. In jede Vertiefung wurden 1000 IU/ml GM-CSF und 100 IU/ml IL-4 gegeben. Anschließend wurden die Platten 6 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. An Tag 2 und 4 wurden 200 µl frisches Medium mit 1000 IU/ml GM-CSF und 100 IU/ml IL-4 hinzugegeben.

2.2.2 Gewinnung von T-Zellen

Als Ausgangsmaterial dienen CD14-negative Zellen, welche nach magnetischer Zellseparation der PBMCs durch CD14-beading anfielen. Die T-Zellen wurden durch Separation von den HLA(human leukocyte antigen)-DR-positiven Zellen gewonnen. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Der an Magnetpartikel gekoppelte α -FITC-AK wurde mit MACS-Puffer gewaschen. Die CD14-negativen PBMCs wurden in sterilem MACS-Puffer aufgenommen und nach Zentrifugation für 10 min bei 350 g und 4°C wurde das Pellet in 100 µl / 10^7 Zellen MACS-Puffer resuspendiert. Der α -HLA-DR-FITC-Ak wurde hinzugegeben (20 µl pro 10^8 Zellen), es folgte eine Inkubation für 15 min bei 4°C im Dunkeln. Die Zellen wurden 3 x mit MACS-Puffer gewaschen (10-20faches Volumen) und 10 min bei 350 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 90 µl/ 10^7 Zellen MACS-Puffer resuspendiert. Der an Magnetpartikel gekoppelte α -FITC-Ak wurde hinzugegeben (10 µl/ 10^7 Zellen) und die Zellen wurden 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen (10-20faches Volumen), 10 min bei 350 g und 4°C zentrifugiert und erneut mit MACS-Puffer resuspendiert. Zur Separation der Zellen wurde die in den Magneten eingerastete Trennsäule zunächst mit 500 µl MACS-Puffer gespült, anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde 3 x mit 500 µl MACS-Puffer gespült. Dabei wurde die HLA-DR-negative Fraktion unterhalb der Trennsäule aufgefangen und 2 x mit Zellkulturmedium gewaschen und anschließend jeweils 10 min bei 350 g und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden nach Trypanblaufärbung gezählt und mit Medium auf eine Zellzahl von 2×10^6 /ml eingestellt. Die Reinheitskontrolle der Zellpopulation erfolgte durch Färbung der Zellen mit dem Anti-CD3-Ak (Vorgehen siehe Phänotypisierung) und durch Messung der Fluoreszenz im Zytometer. In allen Versuchen war der Anteil CD3-positiver Zellen > 90%.

2.2.3 Anzucht von *N. farcinica*, Herstellung von Suspensionen für die Inkubation mit DCs und zur Keimzahlbestimmung

Der *N. farcinica* Stamm wurde in einem Glasröhrchen mit BHI-Medium bei Raumtemperatur aufbewahrt. Subkulturen wurden auf Kochblutagar-Platten angelegt, welche 5 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubierten. Anschließend wurden einige der Kolonien mit einem feuchten Wattetupfer in ein 15 ml-Röhrchen mit Zellkulturmedium überführt. Die Röhrchen wurden 2 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nocardien wachsen stark verzweigend und bilden Aggregate. Diese eignen sich nicht zur Infektion mit einer standardisierten MOI (multiplicity of infection). Aus diesem Grund wurden die flüssigen Subkulturen nach einer zuvor veröffentlichten Methode aufgearbeitet (39).

Die Röhrchen wurden für 10 Minuten bei 60 g zentrifugiert, um die großen Filamentaggregate, die sich während des Wachstums gebildet hatten, zu sedimentieren. Das Pellet mit den Aggregaten wurde verworfen und der Überstand erneut für 15 Minuten bei 900 g zentrifugiert. Das nun entstandene Pellet enthielt die Nocardien in der gewünschten kokkoiden Form und wurde in frischem Medium resuspendiert. Durch Verdünnung der Suspension mit Medium wurde die gewünschte MOI eingestellt.

Zur Inaktivierung von *N. farcinica* wurden die aufgearbeiteten Nocardien nach dem 2. Zentrifugationsschritt bei 900 g für 15 Minuten mit antibiotikahaltigem Medium (RPMI mit 10% FCS, 1000 U/ml Penicillin und 1 mg/ml Streptomycin und 5µg/ml Amikacin) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde 45-60 Minuten ins 56°C warme Wasserbad gestellt und anschließend über Nacht bei 37°C in den Brutschrank. Wachstumskontrollen auf Kochblutplatten verifizierten die komplette Inaktivierung der Bakterien.

2.2.4 Inkubation der DCs mit *N. farcinica*

Die DCs wurden mit dem Medium an Tag 6 der Differenzierung aus der Zellkulturplatte in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Dieses wurde 2 x für 10 Minuten bei 350 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde jeweils mit 30 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Zur Herstellung von zwei verschiedenen Nocardien-Konzentrationen wurde das Nocardien-Pellet, welches die kokkoiden Formen enthielt, mit Zellkulturmedium resuspendiert und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Zur Kontrolle wurde von jeder Suspension ein Ausstrich auf Kochblutagarplatten angelegt. Die Platten wurden 5 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, dann erfolgte die Auszählung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE).

Die Inkubation von DCs mit Nocardien erfolgte in 96-Well-Rundbodenplatten. In jede Vertiefung wurden 1×10^5 DCs gegeben, suspendiert in 100 μl Zellkulturmedium, welches 1000 IU/ml GM-CSF und 100 IU/ml IL-4 enthielt. Anschließend wurden pro Vertiefung 100 μl Nocardiensuspension bzw. proinflammatorische Zytokine (PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β und IL-6) als Positivkontrolle (40) oder Zellkulturmedium hinzugegeben. Die Platten wurden für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden in jede Vertiefung 100 μl Zellkulturmedium mit Penicillin (1000 U/ml), Streptomycin (1 mg/ml) und Amikacin (5 $\mu\text{g/ml}$) gegeben und die Platten 2 Tage bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen mit Medium entnommen, in Eppendorfgefäße überführt und 4 Minuten bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig mit einer Pipette entnommen, sterilfiltriert und in Eppendorfgefäßen bei -80°C eingefroren.

2.2.5 Nachweis intrazellulärer Nocardien

Der Nachweis von Nocardien erfolgte durch Verwendung eines Poly-BCG-Ak mit Kreuzreaktivität gegen Nocardien (41). Dieser Ak bindet hauptsächlich an die Zellwand der Mykobakterien. Die Kreuzreaktivität des Ak läßt sich damit erklären, dass sich Mykobakterien und Nocardien durch einen ähnlichen Zellwandaufbau mit einem hohen Gehalt an Mykolsäuren auszeichnen. Zunächst wurden die Zellen durch Zugabe von 100 μl 4% PFA/PBS bei 4°C für 30 min fixiert. Anschließend wurden sie 4 min bei 950 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde 2 x in 200 μl FACS-Wash resuspendiert und 4 min bei 950 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 200 μl 0,1% Saponin in FACS-Wash bzw. in 200 μl FACS-Wash ohne Saponin resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 4 min bei 950 g und 4 °C wurde das Pellet in 100 μl 0,1% Saponin in FACS-Wash (Kontrolle 100 μl FACS-Wash) resuspendiert und der Primär-Ak im Verhältnis 1:200 hinzugefügt. Nach Inkubation für 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Zellen 2 x mit 200 μl 0,1% Saponin in FACS-Wash (Kontrolle 200 μl FACS-Wash) gewaschen und anschließend 4 min bei 950 g und 4 °C zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 100 μl 0,1% Saponin in FACS-Wash (Kontrolle 100 μl FACS-Wash) resuspendiert und der Sekundär-Ak im Verhältnis 1:200 hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation für 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurden die Zellen 2 x mit 200 μl 0,1% Saponin in FACS-Wash (Kontrolle 200 μl FACS-Wash) gewaschen und 4 min bei 950 g bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 μl FACS-Fix aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und 30 min im Dunkeln im Kühlschrank fixiert. Durch Hinzufügen von 250-300 μl FACS-Wash

wurde die Zellsuspension verdünnt. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Fluoreszenz im Zytometer.

2.2.6 Bestimmung der Anzahl intrazellulärer, lebender Bakterien

Um zu überprüfen, dass extrazellulär keine vermehrungsfähigen Nocardien mehr anzüchtbar sind, wurden 50 µl aller Konditionen auf Kochblutplatten ausgestrichen. Eventuell gewachsene Kolonien wurden nach 5 Tagen bei 37°C und 5% CO₂ gezählt. Um zu bestimmen, ob die Nocardien intrazellulär in DCs überleben, wurden mit Nocardien inkubierte DCs nach 2, 4 und 10 Tagen Inkubation lysiert. Der Inhalt von jeweils 4 Vertiefungen der 96-Well-Platte wurde mit einer Pipette in Eppendorfgläser überführt. Die Eppendorfgläser wurden für 4 min bei 50 g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden bei -80°C eingefroren, das Pellet wurde in 500 µl Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt, erneut für 4 min bei 50 g und 4°C zentrifugiert, in 1 ml Antibiotika-haltigem Medium resuspendiert und für 2 h bei 37°C inkubiert, um eventuell extrazellulär gebundene Nocardien abzutöten. 50 µl aller Konditionen wurden auf Kochblutplatten ausgestrichen und die gewachsenen Kolonien nach 5 Tagen bei 37°C und 5 % CO₂ gezählt. Die Zellen wurden 3 x für 4 min bei 50 g und 4°C zentrifugiert und anschließend mit 500 µl PBS gewaschen. Zum Lysieren der DCs wurde das Pellet in 100 µl 37°C warmen destilliertem Wasser resuspendiert und für mindestens 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Lysate auf Kochblutagar-Platten ausgestrichen und die Anzahl der vermehrungsfähigen Erreger in KBE/ml nach einer Inkubation von 5 Tagen bei 37 °C und 5% CO₂ beurteilt.

2.2.7 Phänotypisierung der DCs

Um die für eine Aktivierung von DCs typischen Oberflächenmoleküle zu bestimmen, wurden DCs nach 2 Tagen Inkubation mit *N. farcinica*, Zytokinen oder Medium der Mikrotiterplatte entnommen und in Eppendorfgläser gefüllt. Die Gläser wurden 4 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden bei -80°C für spätere Zytokinbestimmungen eingefroren, das Pellet wurde in 1 ml FACS-wash resuspendiert. Nach Zellzählung erfolgte die Ak-Markierung. Pro Vertiefung einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 100 µl der Proben gegeben und anschließend die Ak hinzugegeben. Die Isotypkontrolle erfolgte mit dem Anti-IgG1/IgG2a-PE/FITC-Ak im Verhältnis 1:50. Zudem erfolgten Doppelfärbungen jeweils mit dem Anti-HLA-DR-FITC-Ak im Verhältnis 1:100 und den PE-markierten Ak gegen CD14, CD25, CD40, CD80, CD83 und CD86, jeweils 1:50 eingesetzt.

Es erfolgte eine Inkubation für 20 min im Dunkeln bei 4°C, anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl FACS-Wash und Zentrifugation 4 min bei 950 g und 4°C gewaschen. Der Waschvorgang wurde durch Resuspension mit 200 µl FACS-wash und erneuter Zentrifugation für 4 min bei 500 g und 4 °C zweimal wiederholt. Durch Zugabe von 100 µl FACS-Fix und Inkubation für mindestens 30 min bei 4°C im Dunkeln wurden die Zellen fixiert.

2.2.8 Gleichzeitiger Nachweis von Phagozytose und Reifung

Zum Nachweis, ob auch DCs reifen, die keine Nocardien phagozytiert haben, wurde die Poly-BCG-Ak-Markierung mit der Färbung zur Phänotypisierung kombiniert.

Zunächst wurde die Poly-BCG-Ak-Markierung vorgenommen bis einschließlich zur Fixierung mit FACS-Fix für 30 min. Die Zellen wurden anschließend für 4 min bei 950 g und 4°C zentrifugiert, das Pellet wurde in 500 µl FACS-Wash resuspendiert und die Färbung zur Phänotypisierung wurde angeschlossen. Angelegt wurden jeweils nur 4 Konditionen. Die erste Kondition diente der Isotypkontrolle, die Konditionen 2-4 dienten dem Nachweis von HLA-DR, CD25 und CD83.

2.2.9 Durchflusszytometrie

Nach Fixierung der Zellen mit FACS-Fix und Inkubation für mindestens 30 min erfolgte die Auswertung der Zellen im FACSCalibur® Zytometer mit Hilfe der CELLQuest® Pro Software (BD Pharmingen).

Die Zellen der Proben wurden zunächst nach Größe (FSC) und Granuliertheit (SSC) beurteilt. DCs sind eine Zellpopulation großer, granulierter Zellen. Die Messung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte in der Darstellung FSC gegen FL1/FL2 bei Einfachfärbungen bzw. FL1 (x-Achse) gegen FL2 (y-Achse) bei Doppelfärbungen.

2.2.10 Zytokinbestimmungen

Der Nachweis der Zytokine IL-12p40, IL-12p70, IL-10 und IL-23 erfolgte aus den Überständen der DC-Kultur mit *N. farcinica* mit Hilfe spezifischer ELISAs (enzyme linked immuno sorbent assay). Die Durchführung erfolgte entsprechend den Hersteller-Angaben.

2.2.11 Gemischte Leukozyten Reaktion (MLR)

Hierzu wurden DCs auf eine Konzentration von 5×10^4 /ml eingestellt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe in 1:3 Verdünnungsschritten mit Zellkulturmedium angelegt. T-Zellen

wurden auf eine Konzentration von 2×10^6 /ml eingestellt. In einer 96-well Flachbodenplatte wurden pro Kondition und Verdünnungsstufe jeweils 3 Vertiefungen mit 100 μ l DC-Zellsuspension gefüllt. Hierzu wurden 100 μ l T-Zellsuspension hinzupipettiert. 3 Vertiefungen enthielten nur DCs in der Ausgangskonzentration und 3 Vertiefungen nur T-Zellen. Es folgte eine Inkubation für 5 Tage bei 37°C und 5 % CO₂. Am Tag 5 wurden in jede Vertiefung 25 μ l 3H-Thymidin gegeben und die Platte wurde für weitere 18-24 h inkubiert. Die Messung des eingebauten Thymidins erfolgte durch Messung der Radioaktivität im Betacounter.

2.2.12 Apoptose-Nachweis durch TUNEL-Assay

Im Rahmen von Apoptose finden ein Abbau der Organellen und eine Degradierung der DNA statt, so dass Brüche in der Doppelstrangstruktur entstehen. Beim TUNEL-Assay werden diese DNA-Bruchstellen markiert, indem enzymatisch fluoreszenzmarkierte Nukleotide mit Hilfe einer Desoxy-Nukleotidyl-Transferase an die entstandenen freien 3'-OH-Enden der DNA gebunden werden.

Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer DCs wurden die Zellen 4 min bei 50 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde 2 x in 1 ml PBS-B resuspendiert und erneut 4 min bei 50 g und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden gezählt und durch Resuspension mit PBS-B auf eine Konzentration von 1×10^7 DCs/ml eingestellt. Pro Kondition wurden 2 Vertiefungen einer 96-Well-Platte mit 100 μ l der Zellsuspension gefüllt (Ansatz und Kontrolle). Durch Zugabe von 100 μ l PBS/4% PFA pro Vertiefung wurden die Zellen fixiert. Die Platte wurde zur Inkubation für 30-60 min bei 25°C auf den Schüttler gestellt und anschließend 10 min bei 300 g und 10°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 μ l PBS-B resuspendiert und erneut 4 min bei 50 g und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden durch Resuspension des Pellets in 100 μ l 0,1% TritonX in 0,1% Na-Citrat-Lösung permeabilisiert und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurden sie 2 x mit 200 μ l PBS-B gewaschen und 4 min bei 50 g und 4°C zentrifugiert. Pro Ansatz wurden 5 μ l Transferase mit 45 μ l der Nukleotidlösung gemischt. Für die Kontrollen wurden jeweils 50 μ l Nukleotidlösung entnommen. Pro Vertiefung wurden jeweils 50 μ l Reaktionsmix bzw. Kontrolllösung hinzugegeben, es erfolgte eine Inkubation für 60 min bei 37°C im Dunkeln. Die Platte wurde 2 x mit 200 μ l PBS-B gewaschen und 4 min bei 50 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250-500 μ l PBS gelöst. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Fluoreszenz im Zytometer.

2.2.13 Statistik

Um Unterschiede hinsichtlich der Zytokinproduktion zu berechnen, wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. P-Werte von $<0,05$ wurden als signifikant angesehen. Angegeben sind jeweils der Median mit Quartilen.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung des Versuchsystems

Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für die Inkubation von DCs mit *N. farcinica* wurden zunächst DCs mit Nocardien mit MOIs von 0,01 bis 10 inkubiert. Die Nocardien zeigten ein schnelles und stark verzweigendes Wachstum, so dass bei MOIs ≥ 1 die Vertiefungen der Mikrotiterplatten nach 48 h Bebrütung von Bakterien überwuchert waren und eine Beurteilung lebender DCs nicht möglich war. Aus diesem Grund wurden für die vorliegende Arbeit MOIs von 0,1 bzw. 0,01 gewählt. Das Bakterienwachstum wurde außerdem nach 30 min durch Zugabe von Antibiotika gestoppt. Hier zeigten sich weder Cotrimoxazol noch die Kombination von 1000 U/ml Penicillin mit 1 mg/ml Streptomycin ausreichend wirksam, so dass 5 $\mu\text{g/ml}$ Amikacin zu Penicillin und Streptomycin hinzugefügt wurde. Die Amikacinkonzentration entsprach der dreifachen mittleren Hemmkonzentration für den verwendeten Nocardien-Stamm (42).

3.2 Aufnahme von *N. farcinica* durch DCs

Um zu untersuchen, ob DCs Nocardien aufnehmen, wurden DCs nach 48 h Inkubation mit *N. farcinica* und nach Gramfärbung lichtmikroskopisch beurteilt. Es ließen sich sowohl intrazellulär als auch extrazellulär lange Filamente darstellen (Abb. 1).



Abb. 1: Aufnahme von *N. farcinica* durch DCs

DCs wurden 48 h mit *N. farcinica* inkubiert, anschließend erfolgte eine Gramfärbung und die lichtmikroskopische Beurteilung der intrazellulären Bakterienaufnahme bei 400-facher Vergrößerung.

Um zu bestätigen, dass die Zellen die Bakterien internalisierten, wurden die Nocardien mit Hilfe eines kreuzreaktiven Poly-BCG-Serums gefärbt. Um unterscheiden zu können, ob die Antikörper an intra- oder extrazelluläre Bakterien gebunden wurden, wurden Versuchsansätze mit und ohne Permeabilisierung der Zellen durchgeführt.

Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass nach Permeabilisierung der Zellen *N. farcinica*-infizierte DCs im Gegensatz zu nicht infizierten DCs das Poly-BCG-Serum gebunden hatten (Abb. 2). Je höher die eingesetzte MOI war, desto mehr DCs waren positiv. Nicht permeabilisierte Zellen zeigten für infizierte und nicht infizierte DCs ein identisches Ergebnis in der FACS-Färbung, das Poly-BCG-Serum wurde nicht gebunden. Somit ließ sich zeigen, dass die Nocardien von DCs internalisiert wurden.

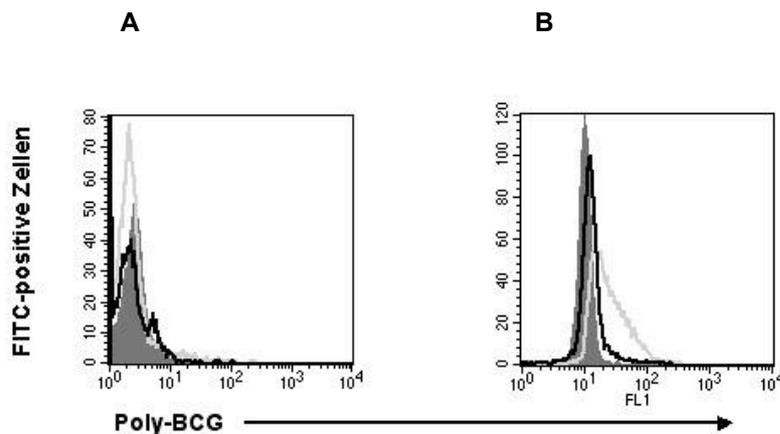


Abb. 2: Aufnahme von *N. farcinica* durch DCs.

DCs wurden 48 h mit *N. farcinica* bzw. für die Negativkontrolle mit Medium inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde mit Saponin permeabilisiert, die übrigen DCs wurden mit Medium behandelt, anschließend erfolgte die Färbung mit dem Poly-BCG-Serum. Darstellung mit Medium inkubierter DCs (ausgefüllte Kurve) gegen mit Nocardien inkubierte DCs (schwarze Linie MOI 0,01, helle Linie MOI 0,1); A: nicht permeabilisierte Zellen; B: permeabilisierte Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives von vier erfolgten Experimenten.

3.3 Nocardien induzieren MOI-abhängig Apoptose in DCs

In der FACS-Analyse infizierter DCs zeigte sich neben den großen, granulierten DCs eine Population kleiner und granulierter Zellen, wie es für apoptotische Zellen typisch ist. Je höher die eingesetzte MOI war, desto mehr kleine, granuliert Zellen ließen sich darstellen (Abb. 3).

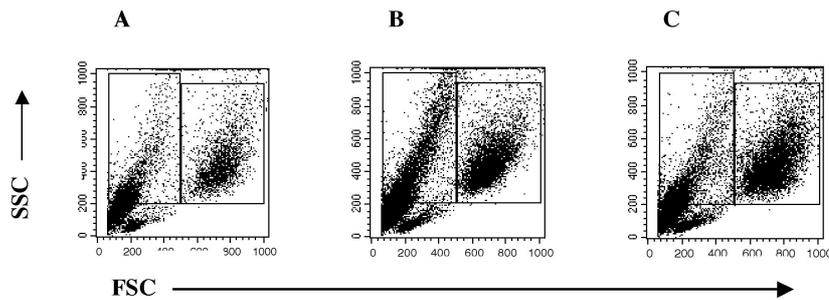


Abb. 3: MOI-abhängig ansteigender Anteil kleiner, granulierter Zellen nach Inkubation von DCs mit *N. farcinica*.

DCs wurden 48 h mit Nocardien, bzw. für die Negativkontrolle mit Medium inkubiert. Darstellung kleiner, granulierter Zellen (linkes Rechteck) gegen große, granuliert Zellen (rechtes Rechteck); A: DCs + Medium (Negativkontrolle); B: DCs + *N. farcinica* (MOI 0,1); C: DCs + *N. farcinica* (MOI 0,01). Dargestellt ist ein repräsentatives von vier erfolgten Experimenten.

Um zu untersuchen, ob in DCs durch Inkubation mit Nocardien Apoptose induziert wird, wurden apoptotische Zellen mittels TUNEL-Assay angefärbt. Die Auswertung zeigte eine MOI-abhängig ansteigende Anzahl TUNEL-positiver Zellen nach Inkubation von DCs mit *N. farcinica*. Im Gegensatz dazu fanden sich nur wenige TUNEL-positive Zellen in unstimulierten DCs. Der Anteil apoptotischer Zellen nimmt somit durch die Inkubation mit Nocardien mit steigender MOI zu (Abb. 4).

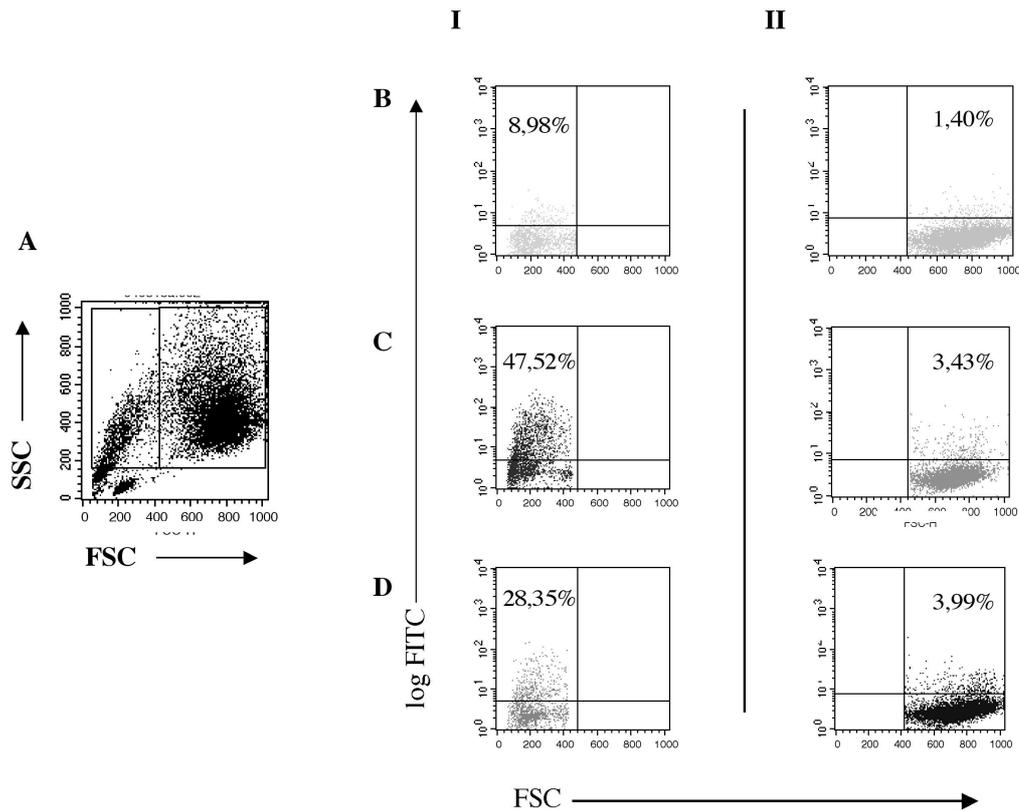


Abb. 4: Induktion von Apoptose in *N. farcinica*-infizierten DCs.

DCs wurden 48 h mit Nocardien bzw. für die Negativkontrolle mit Medium inkubiert, anschließend erfolgte mit Hilfe des TUNEL-Assays der Nachweis apoptotischer Zellen. A: Darstellung von Größe (FSC) gegen Granuliertheit (SSC); B-D: Darstellung des Anteils TUNEL-positiver Zellen an kleinen, granulierten Zellen (I) im Vergleich zu großen, granulierten Zellen (II); B: nicht infizierte Zellen; C: infizierte Zellen (MOI 0,1); D: infizierte Zellen (MOI 0,01). Dargestellt ist ein repräsentatives von vier erfolgten Experimenten.

Um zu untersuchen, ob die apoptotischen Zellen zuvor Nocardien phagozytiert hatten, wurde diese Zellpopulation mittels Poly-BCG-Serum gefärbt. Es zeigte sich, dass auch die apoptotischen DCs Nocardien internalisiert hatten. Dabei ließ sich, vergleichbar zu den Ergebnissen mit lebenden DCs, eine positive Korrelation zwischen der eingesetzten MOI und dem Nachweis Poly-BCG-positiver Zellen belegen (Abb. 5). Der apoptotische Effekt von *N. farcinica* ist somit wahrscheinlich auf direkte Interaktion der Zellen mit den Bakterien zurückzuführen.

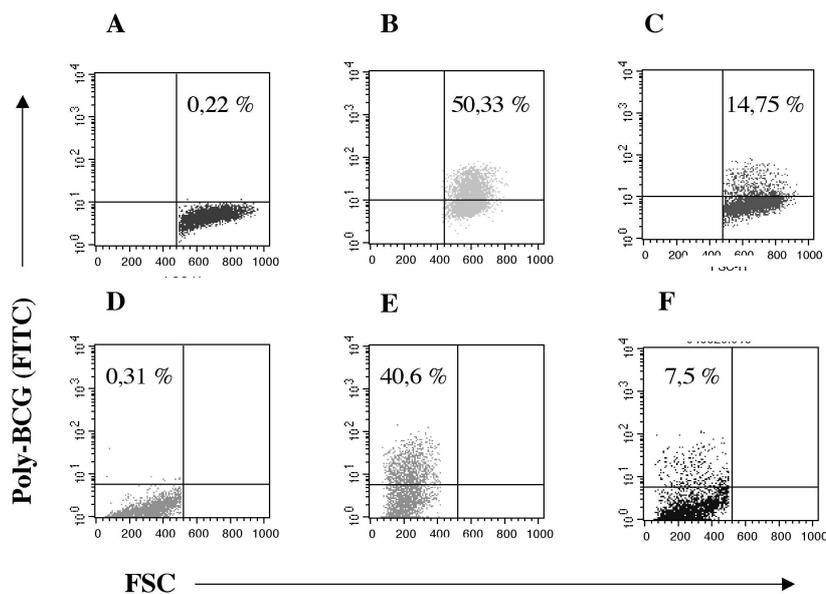


Abb. 5: Nocardien induzieren MOI-abhängig durch eine direkte Interaktion in DCs Apoptose. DCs wurden 48 h mit Nocardien, bzw. für die Negativkontrolle mit Medium inkubiert. Nach 2 Tagen erfolgte die Permeabilisierung der Zellen und die intrazelluläre Anfärbung der Nocardien mittels Poly-BCG-Serum. A-C: lebende DCs; D-F: abgestorbene DCs; A + D: nicht infizierte DCs; B + E: infizierte DCs (MOI 0,1); C + F: infizierte DCs (MOI 0,01). Dargestellt ist ein repräsentatives von vier erfolgten Experimenten.

3.4 *N. farcinica* überlebt nicht in DCs

Mit der intrazellulären FACS-Färbung kann nicht unterschieden werden, ob die intrazellulär nachweisbaren Bakterien leben oder durch die DCs abgetötet wurden. Für *N. asteroides* wurde gezeigt, dass neutrophile Granulozyten und Makrophagen diese Spezies nicht abtöten (35), für DCs und Nocardien existieren bisher keine Daten. Daher wurden DCs zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit *N. farcinica* lysiert und das Wachstum von Nocardien aus dem Zelllysat auf Kochblutplatten beurteilt.

Je höher die MOI desto länger waren einzelne lebende Nocardien anzüchtbar. Nach 10 Tagen war kein Wachstum von Nocardien mehr nachweisbar. *N. farcinica* überleben somit nicht intrazellulär in DCs (Abb. 6).

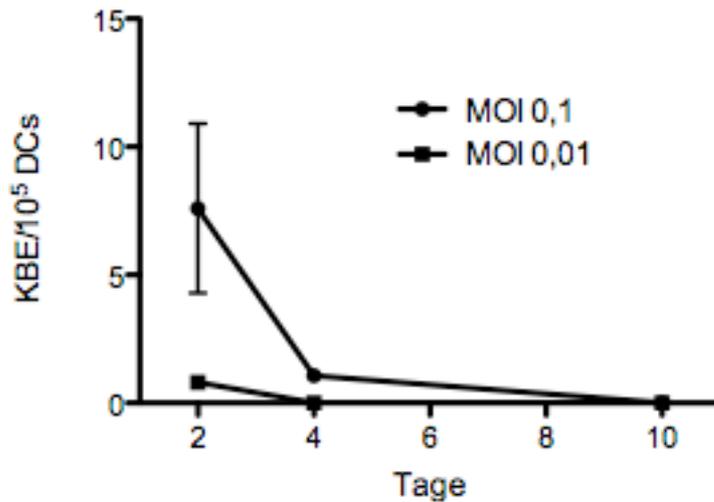


Abb. 6: Nachweis intrazellulär lebender Nocardien in Abhängigkeit von der Zeit und der eingesetzten MOI.

DCs wurden 10 Tage mit *N. farcinica* MOI 0,1 und MOI 0,01 inkubiert. Nach 2, 4 und 10 Tagen wurden DCs der Kultur entnommen und lysiert. Der Nachweis von lebenden Nocardien erfolgte durch Anzucht auf Kochblutagar-Platten. Die KBE beziehen sich auf 1×10^5 DCs. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 repräsentativen Experimenten.

3.5.1 Aktivierung von DCs durch *N. farcinica*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass DCs Nocardien aufnehmen, stellte sich die Frage, ob die DCs aktiviert werden. Analysiert wurde die Expression der Oberflächenmoleküle MHC-II, CD14, CD25, CD40, CD80, CD83 und CD86. Wie Zytokin-stimulierte DCs zeigten auch *N. farcinica*-stimulierte DCs eine Hochregulation von MHC-II-Molekülen, CD40, CD80 und CD86 und waren im Gegensatz zu naiven DCs positiv für CD25 und CD83. Gleichzeitig waren sie wie unstimulierte DCs negativ für CD14 (Abb. 7). Je höher die eingesetzte MOI war, desto mehr Reifungsmarker wurden hochreguliert. Nicht aktivierte DCs exprimierten wenig MHC-II, CD40, CD80 und CD86 und waren weitestgehend negativ für CD25 und CD83. *N. farcinica* ist folglich, in Abhängigkeit von der eingesetzten MOI, ein Reifungsstimulus für DCs. Für die Aktivierung von DCs ist schon eine geringe Konzentration (MOI 0,1) ausreichend.

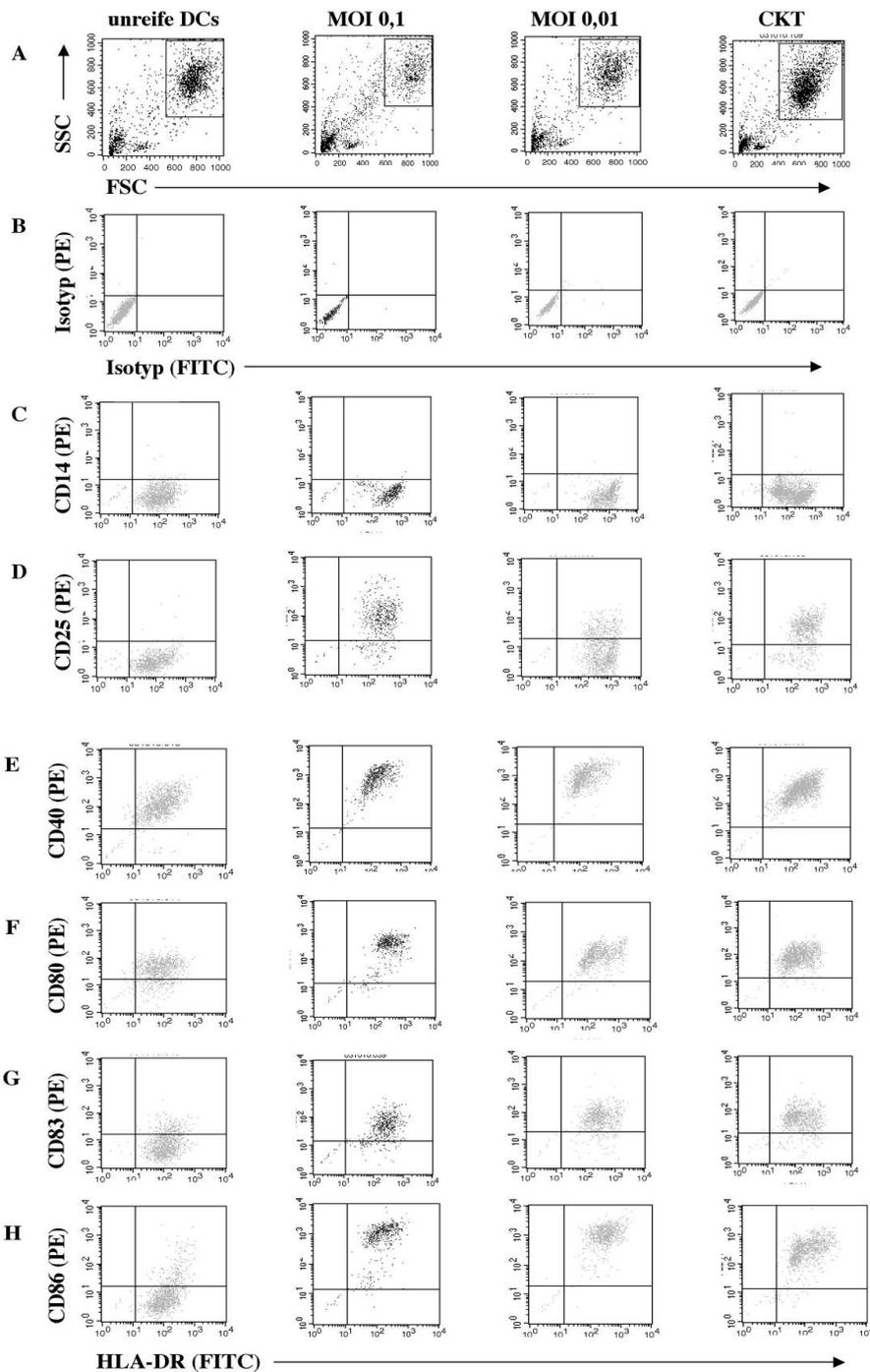


Abb. 7: Aktivierung humaner DCs durch *N. farcinica*

DCs wurden 48 h mit *N. farcinica*, für die Negativkontrolle mit Medium und für die Positivkontrolle mit reifungsstimulierenden Zytokinen (CKT) inkubiert. Nach 2 Tagen erfolgte mit Hilfe spezifischer Ak gegen Reifungsmarker auf DCs die Phänotypisierung. A: Darstellung von Größe (FSC) gegen Granuliertheit (SSC); B: Darstellung der Isotypkontrolle; C-H: Nachweis von CD14, CD25, CD40, CD80, CD83 und CD86 für die Konditionen nicht infizierte DCs, mit Nocardien inkubierte DCs (MOI 0,1 und MOI 0,01) und Zytokin-

stimulierte DCs (Spalten von links nach rechts). Dargestellt ist ein repräsentatives von vier erfolgten Experimenten.

3.5.2 Aktivierung von DCs auch ohne intrazelluläre Aufnahme von Nocardien

Bisher konnte gezeigt werden, dass *N. farcinica* von DCs aufgenommen wird und dass die Inkubation der Zellen mit diesen Bakterien zur Reifung der DCs führt. Daraus wurde die Fragestellung abgeleitet, ob nur DCs ausreifen, die Nocardien aufgenommen haben oder auch solche, bei denen keine Nocardien intrazellulär nachweisbar sind. Für diesen Zweck wurde die intrazelluläre Poly-BCG-Färbung mit dem Nachweis der reifungsspezifischen Oberflächenmarker CD25 und CD83 kombiniert.

Es zeigte sich hierbei, dass der Hauptanteil der Zellen sowohl gereift war als auch Nocardien aufgenommen hatte (Abb. 8). Es reiften jedoch auch Zellen aus, in denen sich keine Nocardien nachweisen ließen. Bei einer MOI 0,1 weisen 40-50 % der gereiften DCs intrazellulär keine Nocardien auf, bei der niedrigen MOI 0,01 sogar 80-90 % der gereiften DCs. Somit ist für den Reifungsprozess die Aufnahme der Nocardien nicht notwendig, sondern auch der Kontakt mit *N. farcinica* stellt einen ausreichenden Reifungsstimulus dar.

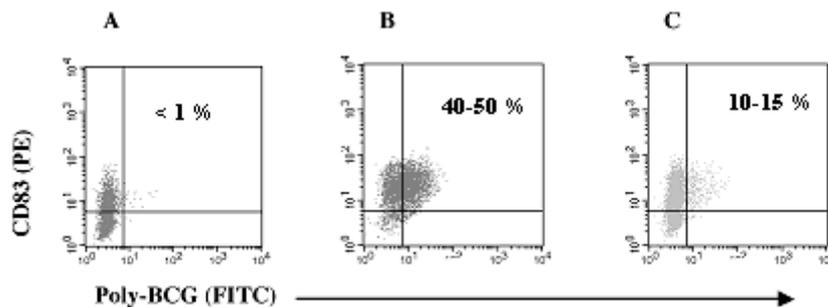


Abb. 8: Aktivierung von DCs durch Kontakt zu *N. farcinica*.

DCs wurden 48 h mit Nocardien, bzw. für die Negativkontrolle mit Medium inkubiert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen permeabilisiert, mit dem Poly-BCG-Serum inkubiert und anschließend mit monoklonalen Ak gegen CD25 und CD83 phänotypisiert. Darstellung Poly-BCG-positiver (FITC) gegen CD83-positive (PE) Zellen; A: unstimulierte DCs; B: DCs + *N. farcinica* (MOI 0,1); C: DCs + *N. farcinica* (MOI 0,01). Dargestellt ist ein repräsentatives von vier erfolgten Experimenten.

3.5.3 Lösliche Faktoren in *N. farcinica*-stimulierten Zellkulturüberständen haben keinen Einfluß auf die DC-Aktivierung

DCs können durch Zytokine, z.B. TNF- α , aktiviert werden (siehe Abb. 7). Um zu untersuchen, ob DCs auch durch Zytokine, die von mit Nocardien inkubierten DCs sezerniert wurden, oder durch von Nocardien produzierten löslichen Stoffen aktiviert werden, wurden DCs mit steril filtrierten Überständen aus Zellkulturansätzen, bei denen DCs für 48 h mit *N. farcinica* stimuliert worden waren und ausgereift waren, inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Überstände aus DC-Zellkulturen, die für 48 h mit Zytokinen stimuliert worden waren, als Negativkontrolle Überstände von unstimulierten DC-Zellkulturen eingesetzt.

Wurden DCs mit *N. farcinica* in einer MOI<1 stimuliert, so führten deren Zellkulturüberstände nicht zu einer Aktivierung unreifer DCs. CD25 und CD86, hier stellvertretend als typische Reifungsmarker dargestellt, wurden nicht hochreguliert. Überstände von DCs mit Medium führten ebenfalls zu keiner Expression von CD25 und CD86. Es zeigte sich jedoch eine Aktivierung von DCs durch die Überstände aus der DC-Zellkultur, bei der DCs 48 h mit Zytokinen stimuliert worden waren (Abb. 9). Bei einer niedrig eingesetzten MOI aktivieren somit Nocardien DCs nicht durch die Synthese von Zytokinen. Auch tragen von Nocardien produzierte lösliche Stoffe nicht zur Reifung bei.

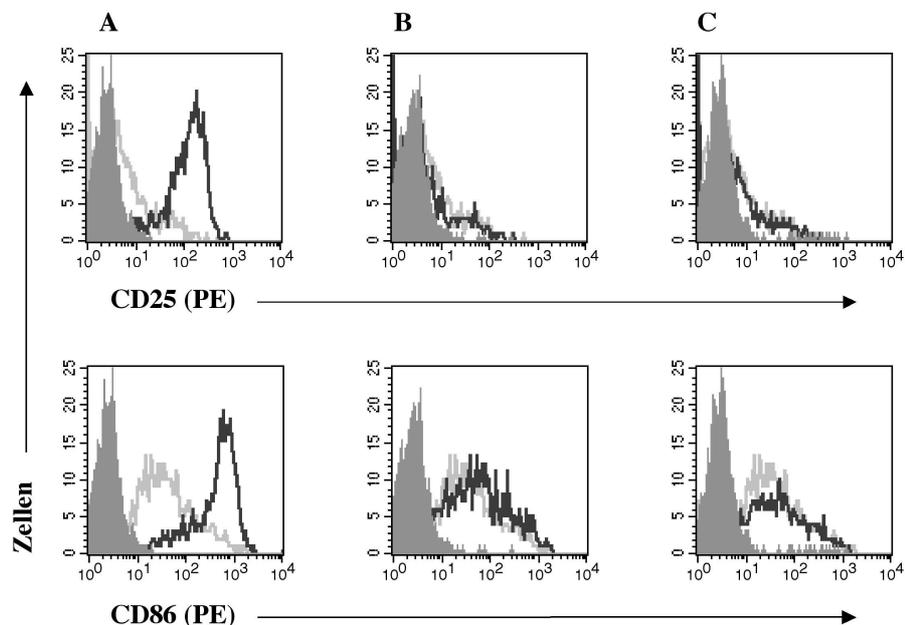


Abb. 9: DCs werden durch Stimulation mit Überständen aus DC-Nocardia-Kokulturen, bei denen DCs für 48 h mit Nocardien in MOIs<1 inkubiert wurden, nicht aktiviert.

Die Überstände aus DC-Zellkulturen mit Nocardien, Medium (Negativkontrolle) und reifungsstimulierenden Zytokinen (Positivkontrolle) wurden nach 48 h Inkubation gewonnen.

Unreife DCs wurden für 48 h mit diesen Überständen inkubiert, anschließend erfolgte die Phänotypisierung der DCs. Dargestellt sind mit Nocardien- bzw. Zytokin-Überständen stimulierte DCs (dunkle Linie) gegen die unstimulierten DCs der Negativkontrolle (helle Linie) sowie die DCs der Isotypkontrolle (ausgefüllter Graph). A: Zytokine als Stimulus; B: *N. farcinica* MOI 0,1 als Stimulus; C: *N. farcinica* MOI 0,01 als Stimulus. Dargestellt ist ein repräsentatives von vier erfolgten Experimenten.

3.5.4 Aktivierung von DCs nach Inkubation mit inaktivierten Nocardien

Da lösliche Substanzen von lebenden syntheseaktiven Nocardien keine Rolle in der Initiierung des Reifungsprozesses spielen, stellte sich die Frage, ob DCs durch den Kontakt zu inaktivierten Bakterien reifen. Hierzu wurden Nocardien durch Antibiotika und Hitze inaktiviert, bevor sie zur Inkubation mit DCs eingesetzt wurden. An Tag 2 der Inkubation erfolgte die Beurteilung der Oberflächenmarker der DCs. Auch bei Stimulation mit inaktivierten Nocardien zeigte sich konzentrationsabhängig der für aktivierte DCs typische Phänotyp (Abb. 10), d.h. MHC-II, CD25, CD40, CD80, CD83 und CD86 wurden hochreguliert (hier beispielhaft für CD25 und CD86 gezeigt). Für die Aktivierung von DCs durch Nocardien werden folglich keine stoffwechselaktiven, lebenden Bakterien benötigt.

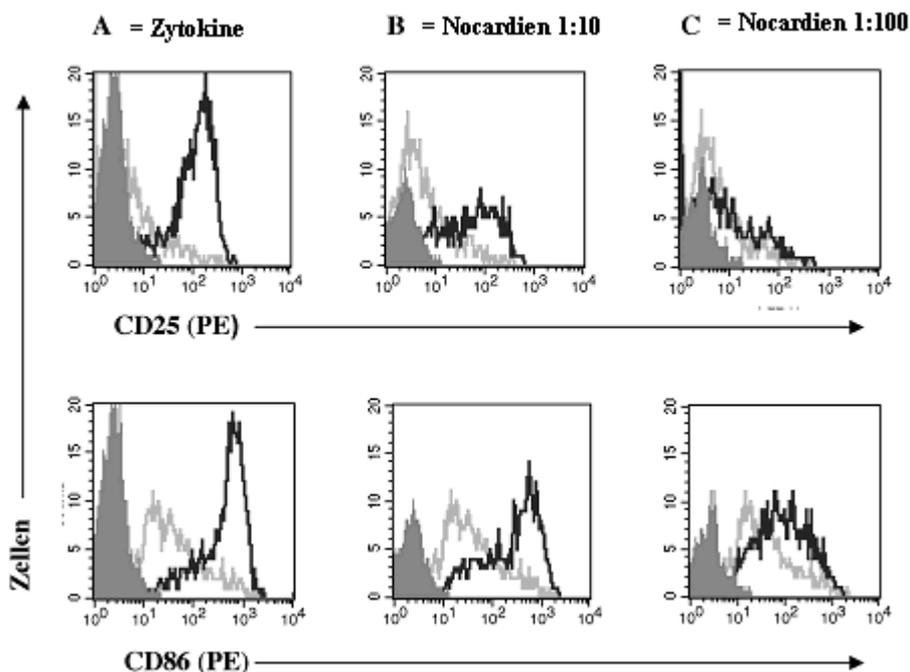


Abb. 10: Aktivierung von DCs durch inaktivierte Nocardien.

Nocardien wurden inaktiviert, anschließend erfolgte die Inkubation von DCs mit den inaktivierten Bakterien im Verhältnis 1:10 und 1:100. Für die Negativkontrolle wurden DCs mit Medium und für die Positivkontrolle mit reifungsstimulierenden Zytokinen inkubiert. Nach 2 Tagen erfolgte die Phänotypisierung. Dargestellt sind jeweils mit Nocardien bzw. Zytokinen stimulierte DCs (dunkle Linie) gegen unstimulierter DCs der Negativkontrolle (helle Linie) sowie die Isotypkontrolle (ausgefüllter Graph). A: Stimulus = Zytokine; B: Stimulus = *N. farcinica* MOI 0,1; C: Stimulus = *N. farcinica* MOI 0,01. Dargestellt ist ein repräsentatives von vier erfolgten Experimenten.

3.6 Gesteigerte T-Zellproliferation durch *N. farcinica*-stimulierte DCs

Bisher wurde gezeigt, dass Nocardien DCs aktivieren und für die T-Zellaktivierung wichtige kostimulatorische Moleküle wie CD40 und CD83 hochregulieren.

Um zu untersuchen, ob mit Nocardien stimulierte DCs T-Zellen aktivieren, wurden MLR-Assays durchgeführt. Hierzu wurden naive T-Zellen mit DCs inkubiert, die zuvor 48 h mit Nocardien, Medium oder Zytokinen stimuliert wurden. Die Proliferation von T-Zellen wurde anhand des ³H-Thymidin-Einbaus bestimmt.

Mit Nocardien inkubierte DCs stimulierten in Abhängigkeit von der MOI die T-Zellproliferation (Abb. 11). Bei einem DC-T-Zell-Verhältnis von 1:40 führten DCs, die mit Nocardien in einer MOI 1 inkubiert wurden, zu einer vergleichbaren Proliferation wie DCs, die mit proinflammatorischen Zytokinen inkubiert wurden. DCs, die mit Nocardien bei einer MOI 0,1 inkubiert wurden, bewirkten insbesondere ab einem DC-T-Zell-Verhältnis 1:120 eine deutlich verminderte T-Zellproliferation. DCs, die mit Nocardien bei einer MOI 0,01 inkubiert wurden, führten zu keiner wesentlichen T-Zellaktivierung. Der Phänotyp der mit Nocardien inkubierten DCs korreliert somit mit einem verstärkten Potential der Zellen zur T-Zellstimulierung.

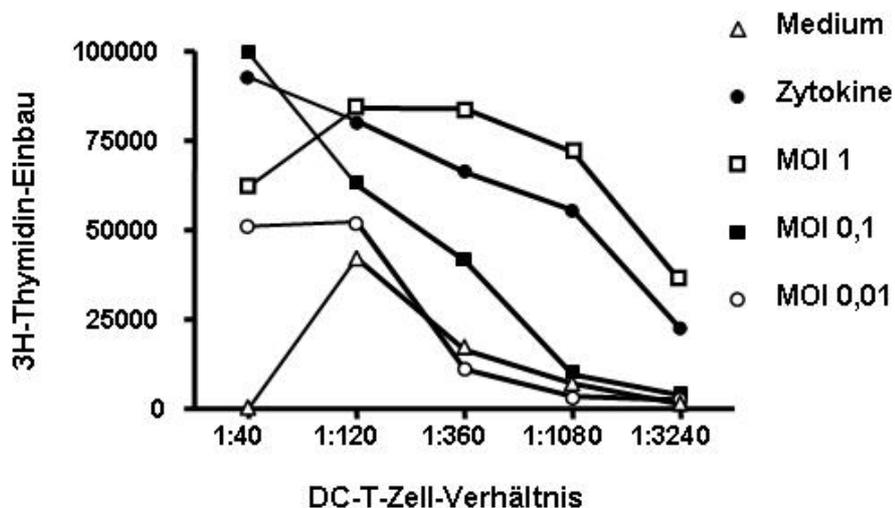


Abb. 11: Gesteigerte T-Zellaktivierung durch Nocardien-aktivierte DCs

DCs wurden 48 h mit Medium (Negativkontrolle), reifungsstimulierenden Zytokinen (Positivkontrolle) bzw. Nocardien (MOI1, MOI 0,1 und MOI 0,01) stimuliert. Anschließend wurden T-Zellen mit den DCs der verschiedenen Konditionen 5 d inkubiert. Nach Zugabe von ³H-Thymidin erfolgte eine weitere Inkubation für 24 h und die anschließende Messung des eingebauten radioaktiven Thymidins.

3.7 Sekretion von IL-10, IL-12p40, IL-12p70 und IL-23

Um zu untersuchen, ob DCs durch den Kontakt zu *N. farcinica* zur Synthese von IL-12 angeregt werden, wurden Überstände aus DC-Zellkulturen, die 48 h mit inaktivierten Nocardien, LPS oder Medium inkubiert wurden, mit Hilfe eines ELISA hinsichtlich ihrer Konzentration an IL-12p40 untersucht.

Die Stimulation von DCs mit Nocardien (Abb.12) führte zu einer ausgeprägten Sekretion von IL-12p40. DCs aus der Mediumkultur sezernierten nur eine vernachlässigbar geringe Menge IL-12p40.

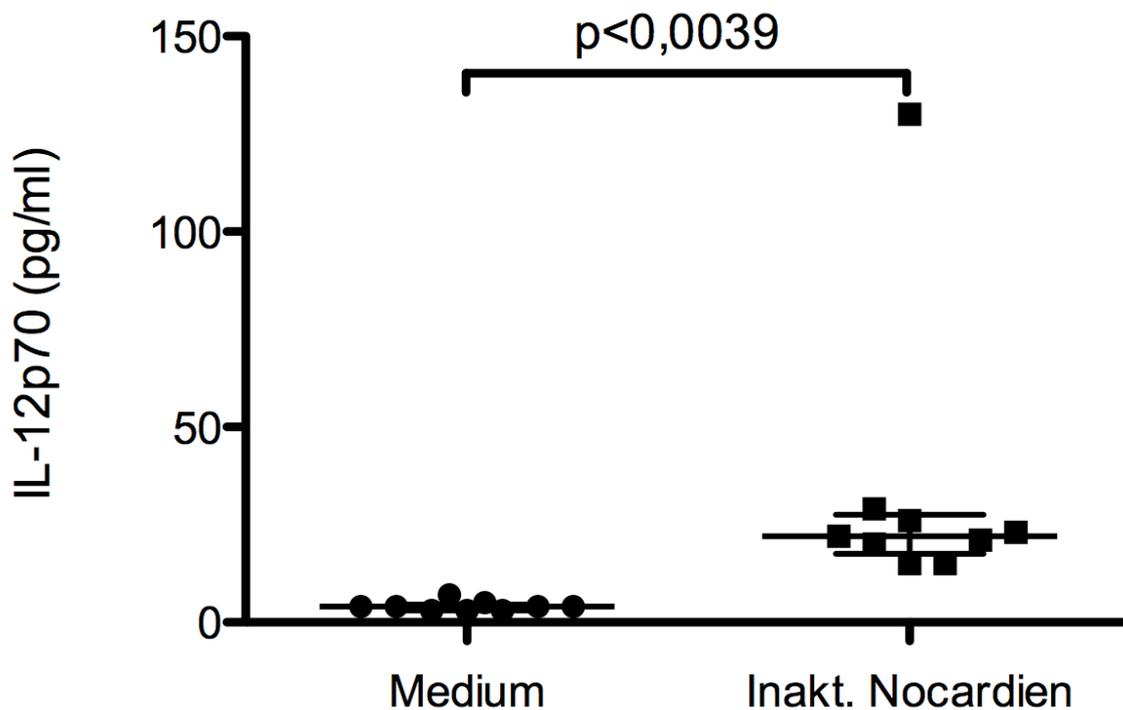


Abb. 13: *N. farcinica*-stimulierte DCs sezernieren IL-12p70

DCs wurden 48 h mit inaktivierten Nocardien bzw. mit Medium inkubiert. Anschließend erfolgte aus den Überständen mit Hilfe eines spezifischen ELISA der Nachweis von IL-12p70.

Nocardien-stimulierte DCs sezernierten etwas doppelt soviel IL-23 wie IL-12p70 (Abb. 14). Die Menge an IL-23 entsprach 0,34% der Gesamtmenge an IL-12p40. DCs, die mit Medium inkubiert wurden, synthetisierten kein IL-23, die Positivkontrolle erfolgte wiederum mit LPS.

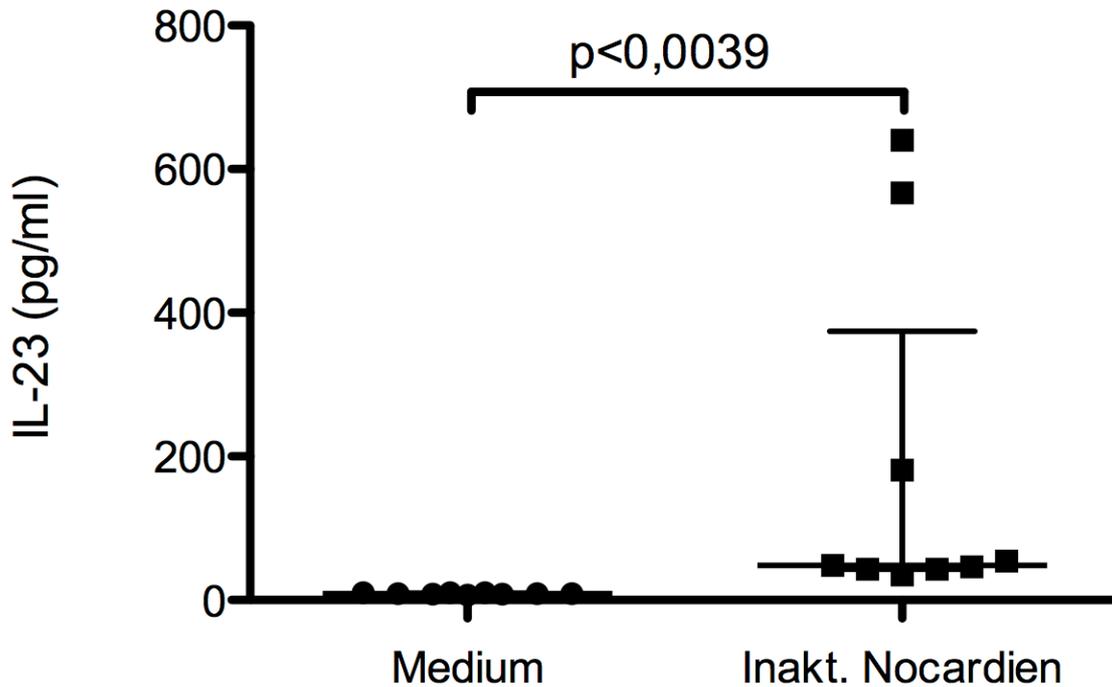


Abb. 14: IL-23-Sekretion durch *N. farcinica*-stimulierte DCs

DCs wurden 48 h mit inaktivierten Nocardien, bzw. mit Medium inkubiert. Anschließend erfolgte mit Hilfe eines spezifischen ELISA aus den Kulturüberständen der Nachweis von IL-23.

Es konnte gezeigt werden, dass IL-10 die Synthese von IL-12p70 und Expression kostimulatorischer Moleküle hemmt (30). Es wirkt damit als Gegenspieler zu IL-12p70 und vermindert die Fähigkeit von DCs, T-Zellen zu aktivieren. Um zu untersuchen, ob DCs durch Nocardien zur Synthese von IL-10 angeregt werden, wurden die Überstände aus DC-Zellkulturen, die 48 h mit inaktivierten Nocardien inkubiert wurden, mit Hilfe eines ELISA hinsichtlich des Gehaltes an IL-10 untersucht. Nocardien-stimulierte (Abb. 15) DCs sezernierten ca. zwölf Mal mehr IL-10 als IL-12p70, während DCs, die mit Medium inkubiert wurden, keine IL-10-Sekretion zeigten (Abb. 15).

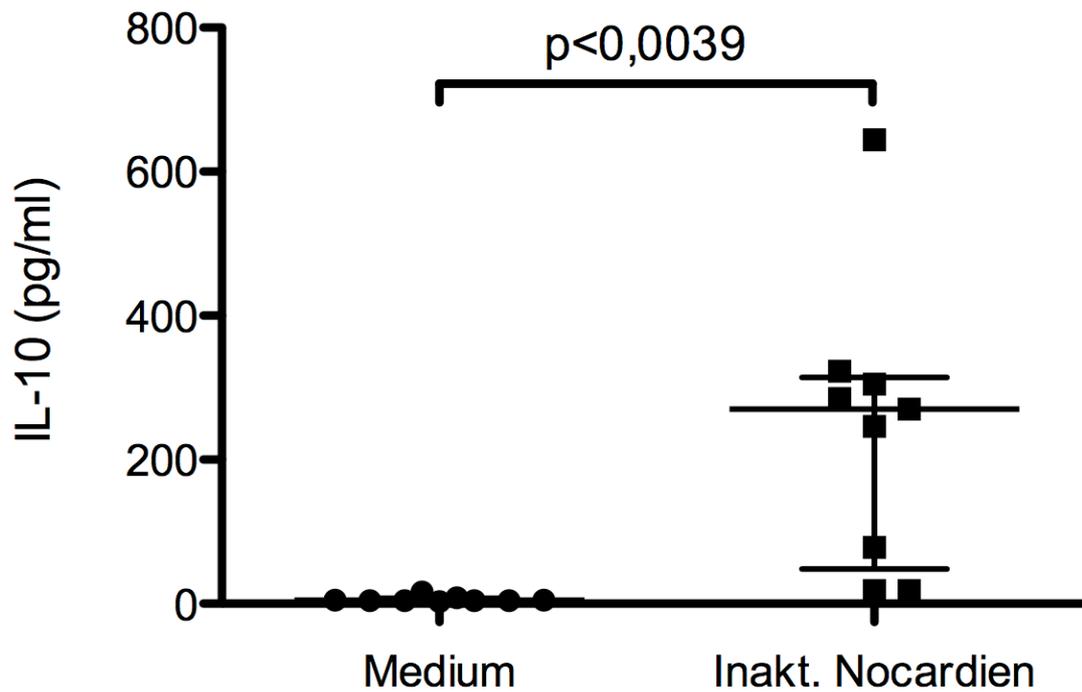


Abb. 15: IL-10-Sekretion durch mit *N. farcinica*-stimulierte DCs

DCs wurden 48 h mit inaktivierten Nocardien und für die Negativkontrolle mit Medium stimuliert. Anschließend erfolgte aus den Zellkulturüberständen mit Hilfe eines spezifischen ELISA der Nachweis von IL-10.

4. Diskussion

Für die Suche nach neuen Adjuvantien, die durch Interaktion mit APCs die Induktion zellulärer Immunantworten verstärken, sind DCs eine wichtige Zellpopulation. DCs sind ein Bindeglied zwischen unspezifischer und spezifischer Immunabwehr und haben einen wesentlichen Einfluss auf die Differenzierung von T-Zellen. Da eine Abwehr von Infektionen mit Nocardien über zelluläre Immunantworten erfolgt (34), sind DCs wahrscheinlich in die Induktion dieser Immunantworten involviert. Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob und in welcher Form DCs durch *N. farcinica* aktiviert werden.

Sowohl lichtmikroskopische Untersuchungen als auch die intrazelluläre Durchflusszytometrie zeigten, dass *N. farcinica* von DCs aufgenommen wird. Auch humane neutrophile Granulozyten können Nocardien phagozytieren. So ließ sich elektronenmikroskopisch in neutrophilen Granulozyten *N. asteroides* darstellen (43). Die Nocardien erschienen intakt, und nach 7,5 h zeigten sich intrazellulär Filamente. Für Makrophagen existieren Daten aus dem Tiermodell. In-vitro-Versuche mit murinen Makrophagen zeigten Phagozytose von *N. asteroides*. Sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch ließen sich Nocardien intrazellulär darstellen (44). Nach Infektion mit dem *N. asteroides*-Stamm 14759 kam es hierbei nach 12-24 h zur Bildung stark verzweigter Filamente innerhalb der Makrophagen. Somit sind DCs, wie auch andere phagozytierende Zellen, in der Lage, Nocardien zu phagozytieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass bei einer MOI 0,01 nach 4 Tagen und bei einer MOI 0,1 nach 10 Tagen keine lebenden Nocardien in DCs mehr nachweisbar waren. Die Nocardien werden somit intrazellulär von DCs abgetötet. In anderen Studien wurde das Überleben von *N. asteroides* in Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten betrachtet. Die Fähigkeit von Makrophagen, Nocardien abzutöten, ist zum einen abhängig von der Virulenz der Nocardien und zum anderen vom Funktionszustand der Makrophagen (45). Der *N. asteroides*-Stamm *GUH-2* verhindert die Phagosom-Lysosom-Fusion und damit ein intrazelluläres Absterben, während der *N. asteroides*-Stamm *10905* von murinen Makrophagen abgetötet wird (46). Werden die Makrophagen jedoch zuvor unspezifisch durch Formalin-abgetötete *N. asteroides GUH-2* in Freund's inkomplettem Adjuvans aktiviert, so ließ sich deren bakteriolytische Aktivität steigern. In-vitro-Versuche mit humanen Monozyten und neutrophilen Granulozyten, welche für 10 h mit den *N. asteroides*-Stämmen *GUH-2* und *14759* in verschiedenen MOI-Stufen (MOI 0,17 bis MOI 10) inkubiert worden waren, zeigten, dass diese Nocardien nicht abtöteten, obwohl intrazellulär das Auftreten radikaler

Sauerstoffmetabolite nachweisbar war (35). Die Unterschiede zwischen den Daten der vorliegenden Arbeit (intrazelluläres Abtöten der Nocardien durch DCs) und zuvor publizierten Studien (intrazelluläres Überleben von Nocardien in Makrophagen) sind vermutlich auf die verschiedenen Zellpopulationen, die unterschiedlichen Nocardien-Spezies, auf deren unterschiedliche Virulenz und auf unterschiedlich lange Beobachtungszeiträume zurückzuführen.

Die Inkubation von DCs mit Nocardien steigerte erheblich den Anteil apoptotischer Zellen. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Kultur von DCs mit *M. tuberculosis* gemacht. Hohe MOIs bewirken ein zunehmendes Absterben der Zellen. Durch den Annexin-V- und den 7-AAD-Nachweis in der Durchflußzytometrie ließ sich zeigen, dass DCs sowohl durch Apoptose als auch durch Nekrose absterben (47). Im Gegensatz dazu führt *M. leprae* selbst bei einer MOI 160 weder zur Apoptose noch zur Nekrose von DCs (48). Apoptose im Rahmen einer Zellaktivierung ist ein normaler Prozeß. Durch Apoptose und die anschließende Phagozytose apoptotischer Zellen können Immunantworten verstärkt werden, so dass dies als ein agonistischer Effekt angesehen werden kann.

Hinsichtlich der Expression der für die Reifung von DCs spezifischen Oberflächenmarker zeigte sich, dass *N. farcinica* schon in niedriger MOI DCs aktiviert. Vergleicht man die Effekte von *N. farcinica* auf DCs mit denen anderer intrazellulärer Erreger, so zeigt sich, dass *M. tuberculosis* (47), *M. leprae* (48) und *Trypanosoma cruzi* (49) die Reifung von DCs verhindern oder mindern. Wenige intrazelluläre Erreger wie *Listeria monocytogenes* (50) und *M. bovis* BCG (51) führen zur Aktivierung von DCs. Vergleichsdaten zur Aktivierung von DCs durch Mykobakterien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Vergleich der Expression von Oberflächenmarkern auf DCs nach Inkubation mit Mykobakterien bzw. Nocardien

| | MOI | HLA-DR | CD83 | CD86 | Referenz |
|------------------------|------|-----------|-------------|-----------|--------------|
| <i>M. tuberculosis</i> | 3 | (↑)gering | (↑)gering | (↑)gering | 47 |
| <i>M. tuberculosis</i> | 10 | → | Keine Daten | → | 57 |
| <i>M. leprae</i> | 40 | ↓ | (↑)gering | → | 48 |
| <i>M. leprae</i> | 160 | ↓ | ↑ | (↑)gering | 48 |
| <i>M. bovis BCG</i> | 1 | ↑ | ↑ | ↑ | 48 |
| <i>N. farcinica</i> | 0,01 | ↑ | ↑ | ↑ | Eigene Daten |
| <i>N. farcinica</i> | 0,1 | ↑ | ↑ | ↑ | Eigene Daten |

Während *M. bovis* BCG schon bei einer MOI 1 zur Aktivierung von DCs führt, werden DCs durch Stimulation mit *M. tuberculosis* bzw. *M. leprae* auch bei hohen MOIs nicht zur Expression aller Reifungsparameter stimuliert. Verglichen mit Mykobakterien sind Nocardien somit potente Reifungsstimuli.

Der adaptive Transfer von Überständen von mit Nocardien inkubierten DCs zu unreifen DCs führte nicht zu einer Aktivierung dieser Zellen. Damit scheinen lösliche Komponenten wie Zytokine oder durch die Bakterien sezernierte Proteine für den durch *N. farcinica* ausgelösten Reifungsprozess von DCs bei niedriger MOI keine wesentliche Rolle zu spielen. Im Gegensatz hierzu sind Zytokine bei der Aktivierung von DCs durch Mykobakterien von großer Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass die Expression der Reifungsparameter auf DCs nach Inkubation mit *M. bovis* BCG (MOI 1,5) unter Zugabe von neutralisierenden Anti-TNF- α -Ak um mindestens 50 % vermindert wird (51). TNF- α ist ein an der Aktivierung von DCs maßgeblich beteiligtes Zytokin (52). Die Unterschiede in der Induktion DC-aktivierender Zytokine zwischen Nocardien und Mykobakterien sind jedoch auch möglicherweise auf die unterschiedlich hohen MOIs zurückzuführen.

DCs, welche mit inaktivierten Nocardien inkubiert wurden, zeigten ein identisches Muster an Reifungsmarkern wie DCs, die mit lebenden Nocardien stimuliert wurden. Um unreife DCs zu aktivieren, werden folglich keine lebenden, stoffwechselaktiven Nocardien benötigt. Da

auch Zytokine und andere lösliche Komponenten bei niedriger MOI keine entscheidende Rolle spielen, scheint der Kontakt mit den Bakterien der auslösende Aktivierungsstimulus zu sein. Diese beobachtete Unabhängigkeit der Reifungsinduktion von löslichen Faktoren ließe sich durch die Verwendung eines Transwell-Systems, in dem DCs auf der einen, und die Bakterien auf der anderen Seite einer semipermeablen Membran kultiviert werden und anschließend die zelluläre Reifung bestimmt wird, bestätigen.

Es ließ sich zeigen, dass nicht nur DCs ausreifen, welche Nocardien phagozytiert hatten. Dieses Ergebnis im Zusammenhang mit den vorausgegangenen Resultaten legt nahe, dass der Prozess der Aktivierung zumindest partiell durch eine extrazelluläre Interaktion zwischen unreifen DCs und Nocardien bedingt ist, und die Phagozytose der Bakterien hierfür nicht unbedingt notwendig ist. Durch Versuche mit dem Mycotoxin Cytochalasin, welches durch Blockade der Mikrofilament-Formation die Phagozytose hemmt, ließe sich diese Annahme untersuchen. Bei Reifung aufgrund eines rein extrazellulären Kontakts wären in Versuchen mit und ohne Cytochalasin-Zusatz keine Unterschiede hinsichtlich der DC-Reifung zu erwarten.

Eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von DCs durch Nocardien können dabei TLRs spielen. Es wurde gezeigt, dass TLR2 Zellwandbestandteile gram-positiver Erreger wie *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae* und *N. coeliaca* erkennt (53). Die Inkubation von Makrophagen mit Zellwandfragmenten von *N. coeliaca* führte zu einer Aktivierung der Zellen und Sekretion von TNF- α . Makrophagen aus TLR2-defizienten Mäusen hingegen zeigten eine abgeschwächte Aktivierung. TLR2 erkennt extrazelluläre Proteine, da DCs durch einen extrazellulären Kontakt zu *N. farcinica* aktiviert werden, erscheint eine TLR2-Beteiligung plausibel. In der Zwischenzeit wurde in der Arbeitsgruppe gezeigt, dass TLR2 auch Strukturen, wahrscheinlich Lipoproteine, von *N. farcinica* erkennt.

Auch für Mykobakterien konnte eine Aktivierung von DCs durch Interaktion mit TLRs nachgewiesen werden. Die Aktivierung von DCs durch *M. bovis* BCG wird auch maßgeblich über TLR2 vermittelt (54). TLR9 besitzt jedoch eine unterstützende Funktion in der Erkennung von *M. bovis* BCG durch DCs. So konnte gezeigt werden, dass DCs von TLR2/TLR9-defizienten Mäusen eine geringere IL-12-Produktion und verminderte T_H1-Antwort induzierten als Zellen TLR2-defizienter Mäuse (54). Verantwortlich dafür scheint ein schnelleres Remodeling der IL-12p40-Promoter-Region mit stärkerer IL-12-Sekretion (55). Die DC-Aktivierung über TLR9 scheint damit ein wichtiger Induktor einer T_H1-Antwort in der Maus zu sein. Zur Aktivierung von DCs durch *N. farcinica* ist ebenfalls ein Zusammenwirken mehrerer TLRs möglich. Weiterführende Versuche mit DCs aus TLR-

knock-out-Mäusen können klären, welche Rezeptoren beteiligt sind. Durch Versuche mit Nocardienbestandteilen ließe sich zudem zeigen, welche die für eine Aktivierung von DCs relevanten Zellwandbestandteile sind. Dies ist insbesondere mit Hinblick auf die Entwicklung von möglichen Adjuvantien von Interesse.

N. farcinica-stimulierte DCs können T-Lymphozyten aktivieren und zur Proliferation anregen. Je höher die eingesetzte MOI war, desto stärker war die Proliferation, jedoch ließ sich auch noch bei einer MOI 0,01 eine Aktivierung von T-Lymphozyten feststellen.

Die verschiedenen Mykobakterien-Spezies unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Potenz, T-Zellen zu aktivieren. DCs, welche 2 Tage mit *M. tuberculosis* mit einer MOI 3 stimuliert wurden, führten im Vergleich zu nicht infizierten DCs nur zu einer geringen Aktivierung naiver T-Zellen, TNF- α stimulierte DCs werden durch anschließende Inkubation mit *M. tuberculosis* (MOI 3) in ihrer Potenz, T-Lymphozyten zu aktivieren abgeschwächt (47). DCs werden somit durch die Inkubation mit *M. tuberculosis* gehemmt in ihrer Fähigkeit, T-Lymphozyten zu aktivieren. Im Gegensatz dazu führten DCs, die 48 h mit der Spezies *M. bovis BCG* mit einer MOI 10 inkubiert wurden, zu einer stärkeren T-Zell-Aktivierung als nicht infizierte und auch als TNF- α -stimulierte DCs (59).

Inaktivierte Nocardien regten DCs zur Synthese von IL-12/23p40 an. Vergleicht man die IL-12/23p40- mit der IL-12p70-Sekretion, so zeigt sich jedoch, dass weniger als 1 % des IL-12p40 in der Form IL-12p70 vorliegt. Das Zytokin IL-12 in der heterodimeren Form IL-12p70 ist ein Schlüsselzytokin für die Induktion von T_H1-Antworten (23). Für die Untereinheit IL-12p40 wurde jedoch auch eine agonistische Wirkung in Richtung T_H1-Antwort belegt. So führt IL-12p40 als Homodimer IL-12p80 zur Chemotaxis und zur Aktivierung von Makrophagen, zur Induktion der DC-Migration in regionäre Lymphknoten und zur Synthese von IFN- γ in T-Lymphozyten (56). Zudem ist die Untereinheit IL-12/23p40 Bestandteil von IL-23. Unsere Versuche zeigten, dass mit Nocardien stimulierte DCs auch IL-23 sezernieren. IL-23 ist an der Induktion von T_H17-Zellen beteiligt (26). IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches zu einer raschen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führt, mit dem Ziel akute Infektionen rasch kontrollieren zu können und septische Verläufe zu verhindern. Infektionen mit Nocardien sind beim Immunkompetenten gekennzeichnet durch lokale pyogene Reaktionen, die Induktion von IL-23 und IL-17 durch Nocardien erscheint daher plausibel. In Versuchen mit *M. tuberculosis* konnte außerdem gezeigt werden, dass IL-23 typische T_H1-Effekte unterstützt und die Abwesenheit von IL-12p70 zum Teil kompensieren kann. So konnte gezeigt werden, dass IL-23 IFN- γ -produzierende T_H-Zellen induziert (25). Auch lokale Reaktionen werden durch IL-23

unterstützt. So zeigten IL-17-defiziente Mäuse nach Infektion mit *M. bovis* BCG eine verminderte T_H1-Antwort und waren nicht fähig, organisierte Granulome auszubilden (58). Kommt es durch die Synthese von IL-23 und IL-17 zu einer Aktivierung von T_H17-Zellen, so wandern diese in periphere Gewebe wie die Lunge und bewirken bei erneutem Ag-Kontakt eine Beschleunigung der lokalen Abwehrreaktion.

DCs wurden durch *N. farcinica* auch zur Synthese von IL-10 angeregt. Da IL-10 die Synthese von IL-12p70 hemmt, kann dies möglicherweise die geringe Zytokinsynthese durch Nocardienstimulation erklären. Zudem wird eine autokrine, regulatorische Funktion des IL-10 diskutiert. Auch naive DCs produzieren geringe Mengen IL-10 (30), nach Stimulation der DCs mit LPS oder CD-40-Ligand steigt die IL-10-Synthese an. Vermutet wird, dass sowohl eine spontane Aktivierung ohne bakteriellen Stimulus als auch eine überschießende Aktivierung des Immunsystems verhindert werden soll.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Nocardien DCs aktivieren. Diese Aktivierung ist offenbar durch Kontakt vermittelt. Durch Nocardien aktivierte DCs stimulieren eine verstärkte T-Zellproliferation verglichen mit nicht aktivierten DCs. Während Nocardien DCs nur zu einer geringen Synthese von IL-12p70 anregen, kommt es jedoch zu einer Synthese von IL-12p40 und IL-23. Gleichzeitig wird IL-10 sezerniert. Die Synthese von IL-23 könnte zur Aktivierung von T_H17-Zellen mit der Folge einer verstärkten IFN- γ -Produktion, der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowie der Aktivierung von Makrophagen beitragen. Insgesamt eignen sich auf Nocardien basierende Adjuvantien somit möglicherweise eher für die Induktion von T_H17- als von T_H1-Immunantworten.

5. Zusammenfassung

Bis heute fehlt für viele Infektionskrankheiten ein wirksamer Impfstoff. Ein Hauptproblem liegt in der mangelhaften Induktion starker zellulärer Immunantworten, vermittelt von spezifischen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten, durch die momentan angewandten Impfstrategien. Bessere Ergebnisse sind wahrscheinlich über den Einsatz neuartiger Adjuvantien möglich. DCs spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Differenzierung naiver T-Lymphozyten. Peripher lokalisierte DCs werden durch den Kontakt mit Antigenen aktiviert, wandern anschließend in die T-Zellregionen der drainierenden Lymphknoten und aktivieren dort naive T-Zellen. Die dabei synthetisierten Zytokine haben einen Einfluss darauf, welche Form der Immunantwort initiiert wird. Die Applikation von Mykobakterien mit Antigenen, z.B. im kompletten Freund Adjuvans, führt zu starken zellulären Immunantworten. Gegen den Einsatz der Bakterien als Adjuvans spricht jedoch ihre hohe Toxizität. Nocardien sind eine den Mykobakterien eng verwandte Bakteriengattung, Sie sind jedoch weniger toxisch und besitzen nur eine geringe Pathogenität bei immunkompetenten Individuen. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Interaktion von DCs mit Nocardien, hier *Nocardia farcinica*, im Hinblick auf eine mögliche Verwendung der Bakterien (oder ihrer Bestandteile) als Adjuvans zu untersuchen. Daten hierzu lagen nicht vor.

Zu diesem Zweck wurden humane DCs aus peripheren Monozyten differenziert und mit *N. farcinica* inkubiert. Anschließend erfolgte die Phänotypisierung der Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Außerdem wurden für die Induktion zellulärer Immunantworten essentielle Zytokine im Vergleich mit LPS als potenten DC-aktivierenden Stimulus analysiert. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Analyse von Zytokinen der IL-12-Familie, da diese wesentlich an der T-Zellpolarisierung beteiligt sind. Außerdem wurde das Potential, T-Lymphozyten zur Proliferation anzuregen, in gemischten Leukozytenreaktionen untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass DCs *N. farcinica* phagozytieren und die Bakterien intrazellulär abtöten. Je höher die eingesetzte Bakteriendosis in diesen Versuchen war, desto größer war allerdings auch der Anteil apoptotischer DCs. Mit Nocardien inkubierte DCs wurden jedoch nachhaltig aktiviert, was sich anhand der Expression typischer Reifungsmarker nachweisen ließ. Dabei zeigte sich, dass auch nicht infizierte Zellen ausreifen. Hierfür waren lösliche Stoffe (von den Bakterien sezernierte oder Zytokine) nicht verantwortlich, da sich der DC-aktivierende Effekt von mit Nocardien inkubierten DCs mittels Zellkulturüberstand auf nicht aktivierte Zellen nicht übertragen ließ. Dagegen induzierten inaktivierte Nocardien ebenfalls eine DC-Reifung. Die durch *N.*

farcinica induzierte Aktivierung der DCs spiegelte sich auch in einer verstärkten Aktivierung der Proliferation allogener T-Zellen wieder. Hinsichtlich der Zytokinsekretion zeigte sich, induziert durch die Nocardien, eine ausgeprägte Synthese von IL-12p40, die Menge des IL-23 entsprach dabei ca. dem 7-fachen des IL-12p70-Anteils. Gleichzeitig sezernierten mit Nocardien inkubierte DCs auch IL-10.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *N. farcinica* bereits in geringer MOI humane DCs aktiviert. Die Analyse des Zytokinspektrums von mit *N. farcinica* inkubierten DCs legt nahe, dass die Bakterien bei möglicher Verwendung als Adjuvans eher die Induktion von T_H17- als von T_H1-Immunantworten unterstützen könnten.

Literaturverzeichnis

- (1) WHO. Fact sheet, smallpox . 2009. Ref Type: Electronic Citation
([http:// www.who.int/mediacentre/factsheets/smallpox/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/smallpox/en/index.html))
- (2) WHO. Fact sheet N°114. 2008. Ref Type: Electronic Citation
(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs114/en/>)
- (3) WHO. Fact sheet N°211. 2003. Ref Type: Electronic Citation
(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/>)
- (4) WHO. Fact sheet. 2007. Ref Type: Electronic Citation
(<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr61/en/>)
- (5) WHO. Global tuberculosis control. Report 2008 . 2008. Ref Type: Electronic Citation
(http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/download_centre/index.html)
- (6) WHO. Fact sheet N°34. 2007. Ref Type: Electronic Citation
(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/index.html>)
- (7) Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID. Early efforts at control: variolation, vaccination, isolation and quarantine. *History of International Public Health* 1988; 6:245-276.
- (8) Plotkin SA. Vaccines: past, present and future. *Nat Med* 2005; 11(4 Suppl):S5-11.
- (9) Jenner, E. (1798). *An inquiry into the causes and effects of the Variolae Vaccinae, a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox.* London, Sampson Low. 75p.
- (10) Hof H, Müller RL, Dörries R. *Poxviridae. Mikrobiologie.* Thieme Verlag 2000.
- (11) Pasteur L. De l'attenuation du virus du cholera des poules. *C R Acad Sci Paris* 1880; 91:673-680.

- (12) Calmette A, Guerin C, Breton M. Contribution a l'etude de la tuberculose experimental du cobaye (infection et essais de vaccination par la voie digestive). *Ann Inst Pasteur Paris* 1907; 21:401-416.
- (13) Janeway CA, Travers P. Gezielte Beeinflussung der Immunantwort. *Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag* 1997.
- (14) McCullers JA. Evolution, benefits, and shortcomings of vaccine management. *J Manag Care Pharm* 2007; 13(7 Suppl B):S2-S6.
- (15) Brewer JM. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol Lett* 2006; 102(1):10-15.
- (16) Rosen FS, Steiner LA, Unanue ER. *Dictionary of immunology*. London: The Macmillan PressLtd.; 1989.
- (17) Ramon G. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. *Bull Soc Centr Med Vet* 1925; 101:227-234.
- (18) Kwak LW, Longo DL. Modern vaccine adjuvants. *Infect Immun* 1996.
- (19) Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol* 2004; 82(5):488-496.
- (20) Palucka K, Banchereau J. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol* 2002; 14(4):420-431.
- (21) Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11(4):443-451.
- (22) Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392(6673):245-252.
- (23) Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(2):133-146.
- (24) Kalinski P, Vieira PL, Schuitemaker JH, de Jong EC, Kapsenberg ML. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* 2001; 97(11):3466-3469.

- (25) Khader SA, Pearl JE, Sakamoto K, Gilmartin L, Bell GK, Jelley-Gibbs DM et al. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol* 2005; 175(2):788-795.
- (26) McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 2006; 27(1):17-23.
- (27) Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(3):349-356.
- (28) Janeway CA, Travers P. *Adaptive Immunität gegen Infektionen*. Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag 1997.
- (29) Demangel C, Bertolino P, Britton WJ. Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. *Eur J Immunol* 2002; 32(4):994-1002.
- (30) Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol* 2001; 166(7):4312-4318.
- (31) Martin C. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? *Eur Respir J* 2005; 26(1):162-167.
- (32) Ishii K, Kurita-Taniguchi M, Aoki M, Kimura T, Kashiwazaki Y, Matsumoto M et al. Gene-inducing program of human dendritic cells in response to BCG cell-wall skeleton (CWS), which reflects adjuvancy required for tumor immunotherapy. *Immunol Lett* 2005; 98(2):280-290.
- (33) Barbara A. Brown-Elliott, June M. Brown, Patricia S. Conville, and Richard J. Wallace, Jr. Clinical and Laboratory Features of the *Nocardia* spp. Based on Current Molecular Taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19:259-282.
- (34) Beaman BL, Gershwin ME, Maslan S. Infectious agents in immunodeficient murine models: pathogenicity of *Nocardia asteroides* in congenitally athymic (nude) and hereditarily asplenic (Dh/+) mice. *Infect Immun* 1978; 20(2):381-387.

- (35) Filice GA, Beaman BL, Krick JA, Remington JS. Effects of human neutrophils and monocytes on *Nocardia asteroides*: failure of killing despite occurrence of the oxidative metabolic burst. *J Infect Dis* 1980; 142(3):432-438.
- (36) Filice GA, Beaman BL, Remington JS. Effects of activated macrophages on *Nocardia asteroides*. *Infect Immun* 1980; 27(2):643-649.
- (37) Davis-Scibienski C, Beaman BL. Interaction of alveolar macrophages with *Nocardia asteroides*: immunological enhancement of phagocytosis, phagosome-lysosome fusion, and microbicidal activity. *Infect Immun* 1980; 30(2):578-587.
- (38) Yasumoto K, Yaita H, Ohta M, Azuma I, Nomoto K, Inokuchi K et al. Randomly controlled study of chemotherapy versus chemoimmunotherapy in postoperative lung cancer patients. *Cancer Res* 1985; 45(3):1413-1417.
- (39) Filice GA, Fischer JE. Lack of synergy between phagocytes and antimicrobials against *Nocardia asteroides*. *J Antimicrob Chemother* 1986; 17(3):353-360.
- (40) Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandines induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27:3135-3142.
- (41) Timo Ulrichs, Michael Lefmann, Maja Reich, Lars Morawietz, Andreas Roth, Volker Brinkmann, George A Kosmiadi, Peter Aichele, Helmut Hahn, Veit Krenn, Ulf B Göbel and Stefan HE Kaufmann. Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl-Neelsen-negative *Mycobacterium tuberculosis* organisms and their precise localization in human tissue. *J Pathol* 2005; 205:633-640.
- (42) Eisenblatter M, Disko U, Stoltenburg-Didinger G, Scherubl H, Schaal KP, Roth A et al. Isolation of *Nocardia paucivorans* from the cerebrospinal fluid of a patient with relapse of cerebral nocardiosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9):3532-3534.
- (43) Filice GA. Inhibition of *Nocardia asteroides* by neutrophils. *J Infect Dis* 1985; 151(1):47-56.
- (44) Beaman BL. In vitro response of rabbit alveolar macrophages to infection with *Nocardia asteroides*. *Infect Immun* 1977; 15(3):925-937.

- (45) Black CM, Beaman BL, Donovan RM, Goldstein E. Intracellular acid phosphatase content and ability of different macrophage populations to kill *Nocardia asteroides*. *Infect Immun* 1985; 47(2):375-383.
- (46) Black CM, Beaman BL, Donovan RM, Goldstein E. Effect of virulent and less virulent strains of *Nocardia asteroides* on acid-phosphatase activity in alveolar and peritoneal macrophages maintained in vitro. *J Infect Dis* 1983; 148(1):117-124.
- (47) Hanekom WA, Mendillo M, Manca C, Haslett PA, Siddiqui MR, Barry C, III et al. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. *J Infect Dis* 2003; 188(2):257-266.
- (48) Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M et al. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect Immun* 2002; 70(9):5167-5176.
- (49) Van Overtvelt L, Vanderheyde N, Verhasselt V, Ismaili J, De Vos L, Goldman M et al. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect Immun* 1999; 67(8):4033-4040.
- (50) Kolb-Maurer A, Gentschev I, Fries HW, Fiedler F, Brocker EB, Kampgen E et al. *Listeria monocytogenes*-infected human dendritic cells: uptake and host cell response. *Infect Immun* 2000; 68(6):3680-3688.
- (51) Thurnher M, Ramoner R, Gastl G, Radmayr C, Bock G, Herold M et al. *Bacillus Calmette-Guerin* mycobacteria stimulate human blood dendritic cells. *Int J Cancer* 1997; 70(1):128-134.
- (52) Roake JA, Rao AS, Morris PJ, Larsen CP, Hankins DF, Austyn JM. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J Exp Med* 1995; 181(6):2237-2247.
- (53) Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11(4):443-451.

- (54) von Meyenn F, Schaefer M, Weighardt H, Bauer S, Kirschning CJ, Wagner H et al. Toll-like receptor 9 contributes to recognition of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin by Flt3-ligand generated dendritic cells. Immunobiology 2006; 211(6-8):557-565.
- (55) Pompei L, Jang S, Zamlynny B, Ravikumar S, McBride A, Hickman SP et al. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis is due to use of distinct TLRs. J Immunol 2007; 178(8):5192-5199.
- (56) Cooper AM, Solache A, Khader SA. Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. Curr Opin Immunol 2007; 19(4):441-447.
- (57) Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis. J Immunol 1997; 159(2):635-643.
- (58) Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K et al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin infection. J Immunol 2007; 178(6):3786-3796.
- (59) Cheadle EJ, Selby PJ, Jackson AM. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infected dendritic cells potently activate autologous T cells via a B7 and interleukin-12-dependent mechanism. Immunology 2003; 108(1):79-88.
- (60) de Boer EC, de Reijke TM, Vos PCN, Kurth K-H, Schamhart DHJ. Immunostimulation in the urinary bladder by local application of *Nocardia rubra* cell-wall skeletons (Rubratin) and Bacillus Calmette-Guérin as therapy for superficial bladder cancer: a comparative study. Clinical Infectious Diseases 2000; 31(Suppl 3):109-114.

Abkürzungen

Ag - Antigen

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrom

Ak - Antikörper

APC - Antigen presenting cell = Antigen-präsentierende Zelle

CD - cluster of differentiation

DC - dendritic cell = dendritische Zelle

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

HIV - Human Immunodeficiency Virus

HLA - human leukocyte antigen

IL - Interleukin

KBE - Kolonie-bildende Einheit

LPS - Lipopolysaccharid

MDP - N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine

MHC - major histocompatibility complex

MLR - mixed leukocyte reaction = gemischte Leukozytenreaktion

MOI - multiplicity of infection

PBMC - peripheral blood mononuclear cell

T_H-Zellen - T-Helfer-Zelle

TLR - toll like receptor

TUNEL - TdT-dependent dUPT-biotin nick end labelling assay

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ignatius, für die Überlassung des Themas und insbesondere für die hervorragende Betreuung, Unterstützung und Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Martin Eisenblätter, für seine stets hilfsbereite Unterstützung beim praktischen Arbeiten und in der Herleitung der wissenschaftlichen Arbeitsschritte bedanken.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe und den technischen Mitarbeitern für die immer gewährte und stets freundliche Hilfestellung.

Lebenslauf

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

Erklärung

„Ich, Ariane Buchal, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Nocardia farcinica* aktiviert humane dendritische Zellen und induziert die Sekretion von Interleukin-23“ 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.“

Berlin, 10.10.2011

Ariane Buchal