

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Phänotypisierung Mycobacterium tuberculosis spezifischer T-Zellen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Vedat Yildirim

aus München

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. F. Kern
 2. Prof. Dr. med. Th. Kamradt
 3. Prof. Dr. rer. nat. A. Thiel

Datum der Promotion: 03.06.2012

Zusammenfassung

Auch im 21. Jahrhundert stellt die Tuberkulose eine ernsthafte Bedrohung der Gesundheit der Weltbevölkerung dar. Obwohl die Problematik der Tuberkulose in den Entwicklungsländern weitaus größer ist als in Westeuropa, bringt die zunehmende Globalisierung die Gefährdung durch die Tuberkulose auch vor unsere Türen.

Zwar existieren neue, hochwertige Testverfahren zur Diagnostik der Tuberkulose, diese beruhen auf Messungen der T-Zell-Antwort auf die Exposition mit Antigenuntereinheiten des Tuberkuloseerregers wie z.B. ESAT-6 oder CFP-10. Weiterhin besteht jedoch die Problematik der unzureichenden Differenzierung zwischen latenter und akuter Tuberkulose im klinischen Alltag. Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Methoden soll anhand spezifischer T-Zell-Charakterisierungen diese Problematik entscheidend verbessert werden.

CD4-T-Zellen von Patienten und Kontrollprobanden wurden zum einen mit Tuberkulose Antigen (ESAT-6) und zum anderen mit PPD (Purified Protein Derivate), einem für den Mendel-Mantoux-Hauttest gereinigtem Proteingemisch, stimuliert und anschließend nach Vorhandensein spezifischer Oberflächenmarker für naive bzw. Gedächtnis-T-Zellen mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Die Immunantwort der T-Zellen auf die Tuberkulose Antigene wurde durch Nachweis von Interferon-Gamma überprüft.

Der kostimulatorische Marker CD27 zeigte sich hier als entscheidend. CD27 wird im Rahmen der Reifung von T-Zellen nach Antigenexposition herabreguliert, wenn die T-Zelle in das Stadium der Gedächtnis-T-Zelle übergeht.

Es konnte gezeigt werden, dass gesunde, BCG geimpfte Probanden signifikant mehr CD27 positive CD4 T-Helferzellen aufweisen als Patienten mit akuter Tuberkulose.

Des Weiteren konnten Patienten mit latenter Tuberkulose ebenfalls anhand von CD27 von akut infizierten Tuberkulosepatienten unterschieden werden. Sie zeigten eine vermehrte Anzahl CD27 positiver CD4 T-Helferzellen im peripheren Blut. Die Anzahl CD27 positiver CD4 T-Helferzellen bei den latent infizierten Patienten lag unterhalb der

Zellzahl der gesunden, BCG geimpften Probanden.

Mit Hilfe des kostimulatorischen T-Zell Markers CD27 ist es somit möglich, eine akute Tuberkuloseinfektion nachzuweisen. Es gelang zudem erstmals, eine Differenzierung zwischen latent und akut infizierten Tuberkulosepatienten anhand von T-Zell-Oberflächenmarkern des peripheren Blutes zu erreichen. Diese neue Methode der Tuberkulosedagnostik ist einfach anwendbar und stellt somit eine Alternative zu anderen klinischen Testverfahren dar.

Ergänzend wurden typische Chemokinmuster einer akuten pulmonalen Tuberkuloseinfektion ermittelt. Patienten mit einer akuten pulmonalen Tuberkulose zeigten nach der Stimulation mit PPD und ESAT-6 einen signifikant höheren Anteil des Chemokins IP-10 in den Überständen als die gesunden Kontrollen.

Auch MIP-1 α zeigte bei Patienten mit einer akuten pulmonalen Tuberkulose nach der Stimulation mit PPD einen höheren Anteil in den Überständen als die gesunden Kontrollen (nicht signifikant). Nach der Stimulation mit ESAT-6 konnten die Patienten mittels MIP-1 α jedoch nicht von den Kontrollen differenziert werden.

Die sichere Unterscheidung zwischen latent infizierten und akut an Tuberkulose Erkrankten ist für die Behandlung der Patienten und die Prävention von entscheidender Bedeutung und kann die Bekämpfung der Tuberkulose einen weiteren Schritt voranbringen.

Schlagwörter:

Tuberkulose, CD27, T-Zellen, Zytokine

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	12
1.1	Die Geschichte der Tuberkulose	12
1.2	Erreger und Epidemiologie	12
1.3	Ablauf und Stadien	15
1.4	Klinik und Diagnostik	17
1.4.1	Interferon-Gamma Release Assays	19
1.5	Das angeborene und adaptive Immunsystem	20
1.5.1	Antigenerkennung durch T-Zellen	23
1.5.2	Immunantwort gegen <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
1.5.3	Die Rolle der Rezeptoren und Chemokine bei der Tuberkulose	28
1.6	Ziele der Arbeit	32
2	Material und Methoden	34
2.1	Materialien	34
2.1.1	Probanden	34
2.1.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien	35
2.1.3	Chemikalien, Pufferlösungen, Medien, Lösungen	36
2.1.4	Antikörper	38
2.1.5	Peptide und Antigene	39
2.1.6	Verwendete Geräte	40
2.1.7	Verwendete Software	41
2.1.8	Anmerkung zur Datenerhebung und Auswertung	41
2.2	Methoden	42
2.2.1	Isolation von peripheren monozytären Blutzellen	42
2.2.2	Stimulation antigenspezifischer T-Zellen unter Verwendung von PBMC	42
2.2.3	Oberflächenmarker- und intrazelluläre Zytokinfärbung	43

2.2.4	Zytokinmessung in den Überständen	44
2.2.5	Durchflusszytometrie	45
2.2.6	Statistische Auswertung	46
2.2.7	Datenanalyse	46
3	Ergebnisse	49
3.1	Zusammenfassung	49
3.2	Phänotypisierung PPD spezifischer CD4 T-Zellen	50
3.3	Expression des Oberflächenmarkers CD27 auf Tuberkulin spezifischen CD4 T-Zellen	50
3.4	Expression des Oberflächenmarkers CD27 auf Tuberkulin spezifischen CD4 T-Zellen – verblindete Zweitstudie	57
3.5	Veränderungen der Expression von Oberflächenmarkern treten bei behandelten Patienten sehr langsam auf	66
3.6	Die Zytokine IP-10 und MIP-1 α können Patienten mit einer Abstrich und/oder Kultur positiven LTB von gesunden Kontrollen unterscheiden	68
4	Diskussion	71
4.1	Diskussion der Methodik zur Isolation, Stimulation und Identifikation der T-Zellen	71
4.1.1	Präparation und Isolierung von PBMC	71
4.1.2	Antigenstimulation	72
4.1.3	Identifizierung der T-Zell Subpopulation	73
4.2	T-Zell-Spezifisierung mittels Oberflächenmarkern zur Differenzierung von Tuberkulosepatienten	75
4.3	Chemokinbestimmung zur Differenzierung zwischen akuter pulmonaler Tuberkulose und gesunden Kontrollen	77
4.4	Relevanz von CD27 für die klinische Anwendung	79
4.5	Ausblick	80
4.6	Literaturliste	81
4.7	Danksagung	89
4.8	Lebenslauf	90
4.9	Eidesstattliche Erklärung	92

Meiner Familie gewidmet

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AIDS	Aquired immune deficiency syndrome
Ak	Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCG	Bacille Calmette-Guérin
CD	Cluster of differentiation
CFP-10	Culture Filtrate Protein 10
KR	Komplementrezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DC	Dendritische Zelle
DZK	Deutsches Zentralkomitee
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-Like-Immuno Sorbent Assay
ESAT-6	Early Secreted Antigenic Target-6
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Federal drug administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HNK	Humane natürliche Killerzelle

ICS	Intracellular cytokine staining
IFN- γ	Interferon-Gamma
IGRA	Interferon-Gamma release Assay
IL	Interleukin
IP-10	Chemokin interferon induced protein of 10 kDa
LAM	Leukozyten Adhäsionsmolekül
LTB	Lungentuberkulose
LTBI	Latent Tuberkulose Infiziert
MCP-1	Monozyten chemoattraktives Protein-1
MHC-I	Major histocompatibility complex I
MHC-II	Major histocompatibility complex II
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein-1 α
Mtb	Mycobacterium tuberculosis
NCAM	Neutrales Zelladhäsionsmolekül
NKZ	Natürliche Killerzelle
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPD	Purified Protein Derivate (Tuberkulin)
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
RKI	Robert Koch Institut
STIKO	Ständige Impfkommission

TACO	Tryptophanaspartathaltiges Coatprotein
TB	Tuberkulose
TC	T-Zelle
TCT	Thorakales Computer Tomogram
TCR	T-Zellrezeptor
TGF	Transforming growth factor
TH1	T-Helferzelle 1
TH2	T-Helferzelle 2
THT	Tuberkulin Hauttest
TLR	Toll-Like-Receptor
TNF- α , β	Tumornekrosefaktor Alpha, Beta
Tr	Regulatorische T-Zelle

1 Einleitung

1.1 Die Geschichte der Tuberkulose

Die Tuberkulose (TB) ist eine der ältesten bekannten Infektionserkrankungen der Menschheit (1). Es existieren Hinweise auf Tuberkuloseerkrankungen bei 3000 Jahre alten humanen Skelettüberresten aus der Eiszeit (2) als auch bei ägyptischen Mumien aus der Zeit 2050 - 500 v. Chr. (3). Hippokrates beschrieb die Krankheit (ca. 460 - 375 v. Chr.) mit dem Begriff Phthisis (Schwindsucht), da die Erkrankung mit allgemeinem körperlichem Verfall einhergeht.

1832 gab der deutsche Arzt Lukas Schönlein (1793 - 1864) (4) der Krankheit den heutigen Namen Tuberkulose, da in den Lungen der Verstorbenen charakteristische Läsionen, so genannte Tuberkel, zu finden waren. Erst im Jahre 1882 wurde durch den deutschen Bakteriologen Robert Koch *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), der Erreger der TB entdeckt (5).

1.2 Erreger und Epidemiologie

Die TB ist eine meldepflichtige Infektionserkrankung, die weltweit vorkommt. Der Erreger ist ein säurefestes, aerobes, unbewegliches, nicht sporenbildendes, stäbchenförmiges Bakterium aus der Familie Mycobacteriaceae. Mykobakterien sind etwa 0,4 µm breit und 3 - 4 µm lang (Abbildung 1). Sie besitzen keine Exotoxine oder Virulenzfaktoren (6).

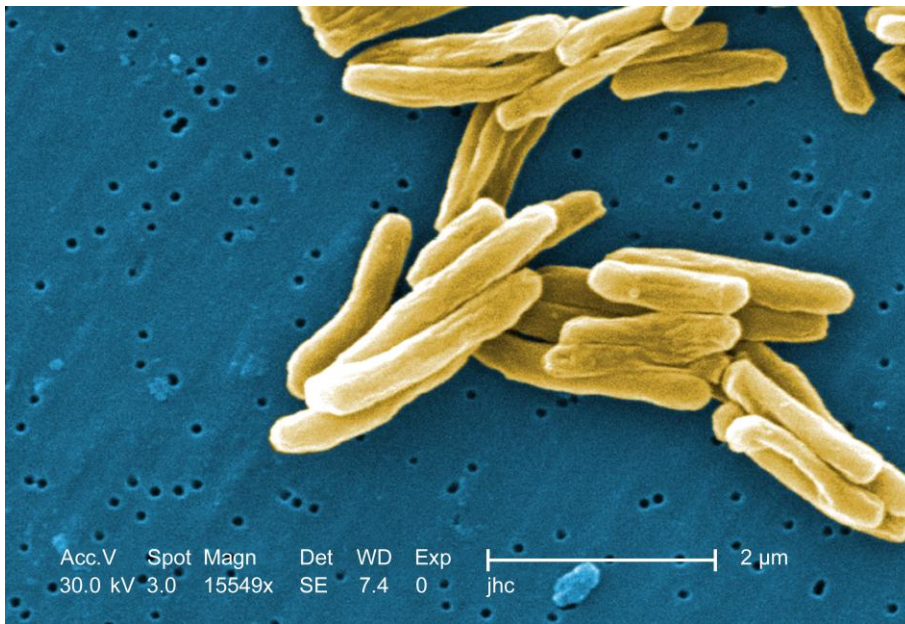


Abbildung 1: EM-Aufnahme des Bakteriums (7)

Nahezu alle Tuberkuloseinfektionen werden durch das Mtb ausgelöst. Aufgrund von genetischen und biochemischen Gemeinsamkeiten werden die Erreger der klassischen TB in einem Komplex zusammengefasst.

Der Mtb-Komplex umfasst das *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. microti* und *M. pinnipedii*. Lediglich in 1 % der Fälle ist das *Mycobacterium bovis* der Verursacher der Infektion. Die Übertragung der Bakterien erfolgt in ca. 90 % der Fälle durch Tröpfchen beim Ausstoß tuberkulosehaltiger Aerosole beim Husten, Niesen oder Sprechen eines Patienten mit offener Lungentuberkulose (LTB). Der häufigste Ort der Erstmanifestation einer TB ist die Lunge. Es kann jedoch nahezu jedes Organ von der TB betroffen sein.

Etwa ein Drittel der Weltbevölkerung hatte im Laufe des Lebens Kontakt zum Erreger der TB und ist somit als infiziert zu betrachten. Jedes Jahr erkranken weltweit ca. 9 Millionen Menschen an der TB und ca. 2 Millionen sterben an den Folgen der Erkrankung.

Nach Erstkontakt mit dem Tuberkulosebakterium tritt in 30 – 40 % der Fälle sofort eine

akute Tuberkuloseinfektion auf. Insgesamt erkranken lediglich ca. 5 - 10 % der mit Mtb infizierten Menschen im Laufe ihres Lebens an der TB. Nach einer Exposition mit dem Erreger wird wahrscheinlich bei den meisten Betroffenen durch immunologische Abwehrreaktionen die Ausbreitung der Mykobakterien lebenslang verhindert, ohne dass dadurch die Mykobakterien vollständig abgetötet werden (8).

Prädisponierende Faktoren für eine akute Infektion oder Reaktivierung sind immunsupprimierende Erkrankungen wie z.B. eine Infektion mit HIV, ein Diabetes mellitus, ein chronisches Nierenversagen oder starke immunsuppressive Therapien im Rahmen von Organtransplantationen oder onkologischen Therapien (9;10).

Besonders problematisch ist die Situation in den Entwicklungsländern und den Staaten Osteuropas (Abbildung 2). Die meisten Tuberkulosefälle treten derzeit in Südostasien und Afrika auf. In Afrika besteht zusätzlich das Problem, dass die Zunahme der Tuberkuloseerkrankungen eng mit der AIDS Pandemie einhergeht.

Aufgrund der heutigen globalen Vernetzung der Länder lassen sich die Probleme der TB nicht auf bestimmte Länder und Regionen der Welt beschränken, sondern sind ein weltumspannendes sozioökonomisches und sozioökologisches Problem.

In Deutschland wurden im Jahr 2009 insgesamt 4.444 (Vorjahr: 4.512) Tuberkulosefälle registriert, was einer Inzidenz von 5,4 pro 100.000 Einwohner entspricht (Vorjahr: 5,5). Somit setzte sich auch im Jahre 2009 der rückläufige Trend fort (11).

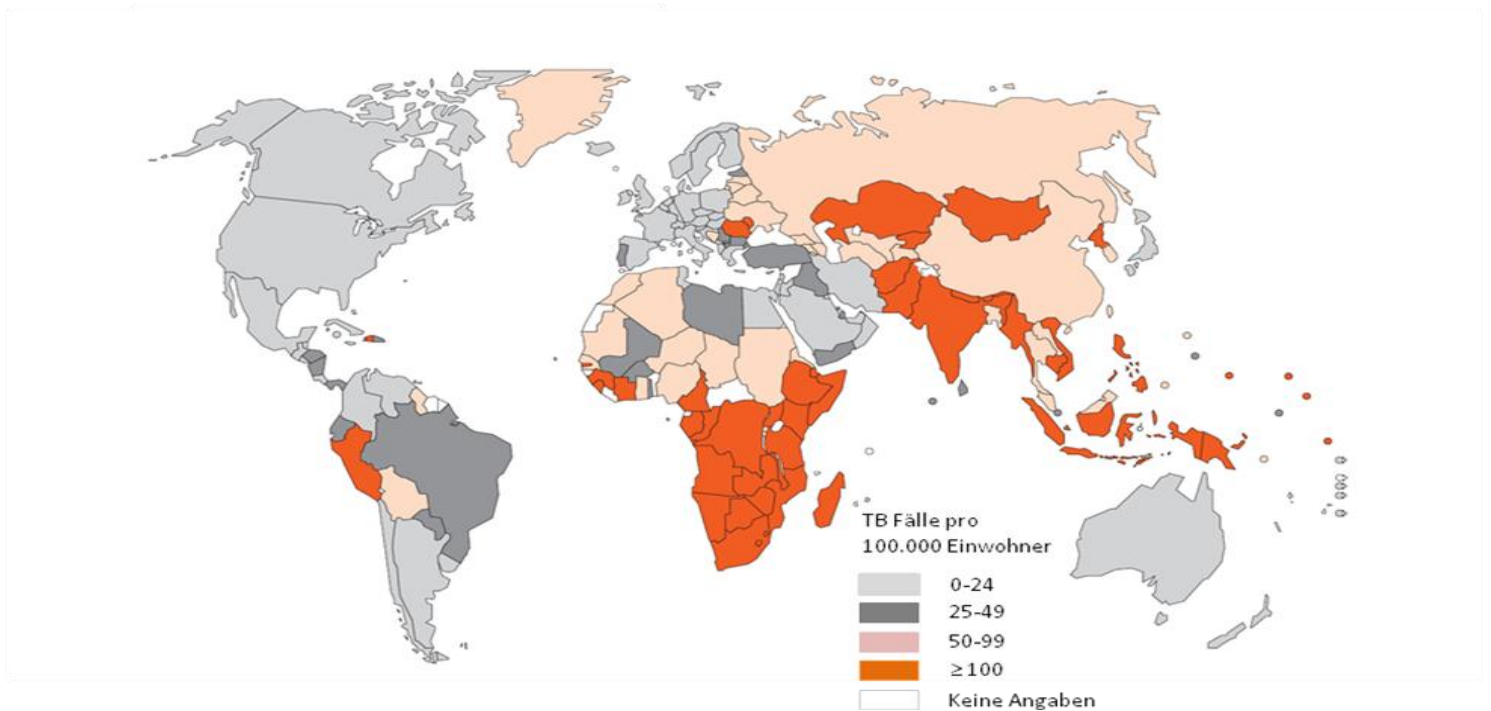


Abbildung 2: Das weltweite Risiko der TB. Die meisten TB Fälle traten im Süden des afrikanischen Kontinents (südlich des Äquators) sowie in Teilen Asiens und Russlands auf. Die zweithäufigsten Fälle traten in Afrika nördlich des Äquators sowie in Russland und China auf. Die höchsten Tuberkuloseraten innerhalb der europäischen Union traten in Rumänien auf (12).

1.3 Ablauf und Stadien

Die Primärinfektion bleibt für den Betroffenen meist unbemerkt. Nach dem Eindringen des Erregers in den Organismus, meistens über die Lunge, kommt es im Rahmen eines initialen Entzündungsprozesses in der Lunge mit Lymphknotenreaktion zur Primärtuberkulose. Diese heilt in ca. 90 % der Fälle aus.

Die zunächst in Makrophagen (Alveolarmakrophagen) eingeschlossenen Tuberkelbakterien hören auf sich zu teilen. Allerdings können einige Bakterien in sogenannten Granulomen (entzündungsbedingte, narbenartige Verdickungen, bedingt durch Ansammlung von Epitheloid-, Mononukleären- oder Riesenzellen) überleben, und zu einem späteren Zeitpunkt eine Postprimärtuberkulose auslösen.

In wenigen Fällen heilt die Primärinfektion nicht ab und kann durch bronchokanalikuläre Ausbreitung zu einer progredienten TB mit Ausbildung einer azinös-nodösen und verkäsenden Bronchopneumonie und zur Entstehung einer tuberkulösen Pleuritis führen. Heilt die Infektion nicht spontan aus, kann es durch Einbruch der Tuberkelbakterien in die Blutbahn oder über den Ductus thoracicus in die Lymphbahnen zu einer Streuung kommen. In Abhängigkeit vom Immunstatus des Individuums kann man dann drei Stadien der Tuberkuloseerkrankung unterscheiden.

Das Stadium der blanden hämatogenen Streuung ist gekennzeichnet durch Absiedelung von Tuberkelbakterien in verschiedene parenchymatöse Organe (Gehirn, Niere, Knochen, Gelenke). Auch hier ist eine Reaktivierung nach vielen Jahren möglich. In der Lunge sind die Absiedelungsorte der Tuberkelbakterien meist die Lungenspitzen mit Ausbildung sogenannter Simon-Spitzenherde, die oft unter Bildung einer subpleuralen Narbe ausheilen.

Das Stadium der Miliartuberkulose tritt meist bei abwehrgeschwächten Individuen auf und ist durch das Auftreten von 1 - 2 mm großen Granulomen gekennzeichnet, die in nahezu allen Organen auftreten können.

Die Tuberkulosesepsis (Landouzy-Sepsis) entsteht ebenfalls vor allem bei Patienten mit geschädigtem Immunsystem und ist durch das Auftreten von nekrotisierenden Entzündungen in zahlreichen Organen gekennzeichnet. Sie hat häufig einen letalen Ausgang.

1.4 Klinik und Diagnostik

Die Klinik der TB kann sehr vielgestaltig sein. Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust sind typische Symptome einer akuten Tuberkuloseinfektion. Diese Symptome können aber auch bei vielen anderen Erkrankungen wie z.B. rheumatologischen oder neoplastischen Erkrankungen vorliegen. Pulmonale Symptome wie Husten, Hämoptysen oder Dyspnoe können bei der akuten TB fehlen, so dass die Primärinfektion mit dem Erreger der TB des Öfteren unerkannt bleibt.

1895 entdeckte der deutsche Physiker Wilhelm Konrad Röntgen (13) das Röntgenverfahren, so dass die Möglichkeit zur Diagnostik der LTB bestand. Auch heute noch wird beim Verdacht einer Tuberkuloseinfektion eine Röntgenaufnahme des Thorax in zwei Ebenen angefertigt. Der typische Röntgenbefund einer Tuberkuloseerkrankung zeigt dickwandige, hohlraumartige Veränderungen, die in erster Linie die Lungenoberfelder betreffen (apikale und posteriore Segmente). Andere Erkrankungen wie zum Beispiel Nocardiosen, Aktinomykosen, Sarkoidose, Wegener'sche Granulomatose oder auch maligne Erkrankungen können ähnliche röntgenologische Veränderungen hervorrufen (14).

Ein weiteres Verfahren zum Nachweis der TB ist die mikroskopische Untersuchung von Sputum und Magensaft auf säurefeste Stäbchen (Ziehl-Neelsen Färbung), die jedoch nur eine offene TB ausschließen kann (15). Nukleäre Amplifikationsverfahren hingegen, wie z.B. die PCR aus biologischem Material, können zusammen mit dem klinischen und radiologischen Befund eine „wahrscheinliche“ Tuberkuloseerkrankung anzeigen.

Eine Bestätigung der Erkrankung kann nur der kulturelle Erregernachweis erbringen, der weiterhin als Goldstandard in der Diagnostik der TB gilt. Ein kultureller Erregernachweis benötigt aufgrund der langen Generationszeit der Tuberkulosebakterien von 16 - 20 Stunden eine Anzuchtzeit von 3 - 4 Wochen. Für ein sicheres Ergebnis müssen die Kulturen bis zu 8 Wochen inkubiert werden. In dieser Zeit kann eine Therapie zwar begonnen werden, ist aber bei negativer Diagnose eine unnötige Belastung für den Patienten. Umso wichtiger werden in der klinischen

Diagnostik immunologische Testverfahren, welche im Weiteren näher aufgeführt werden.

Die Diagnose einer latenten TB-Infektion (LTBI) mit dem *Mycobacterium tuberculosis* beruht auf einer allergischen Reaktion vom verzögerten Typ (Typ-IV-Allergie). Es werden von sensibilisierten T-Lymphozyten nach Stunden oder Tagen Lymphokine freigesetzt, die wiederum weitere Leukozyten zum Ort des Geschehens locken und in diesem Bereich eine Gewebsreaktion auslösen.

Die Typ-IV-Allergie ist eine zelluläre Reaktion. Diese Reaktion wird durch das verwendete PPD (seit 2005: PPD RT 23 SSI) im Rahmen des Tuberkulinhauttest (THT) ausgelöst, und zeigt einen Kontakt mit dem Mtb an (16). Die Injektion einer geringen Menge von Tuberkulin (purified protein derivate oder PPD) führt bei Menschen, die Kontakt zum Bakterium gehabt haben oder mit BCG geimpft worden sind, innerhalb von 24 bis 72 Stunden zu einer T-Zell-abhängigen lokalen Entzündungsreaktion. Diese Reaktion wird durch inflammatorische CD4-T-Zellen (TH1) vermittelt, die im Bereich der Injektionsstelle ins Gewebe eindringen. Sie erkennen gebundene Peptide die durch MHC-II Komplexe präsentiert werden und setzen inflammatorische Zytokine frei.

Zur Diagnostik der LTBI stand bis vor kurzem lediglich der THT zur Verfügung. Der THT Test wurde durch den deutschen Felix Mendel und dem Franzosen Charles Mantoux Anfang des 20. Jahrhunderts in Deutschland und Frankreich eingeführt und wird deshalb auch Mendel-Mantoux-Test genannt.

Der Test hat jedoch Nachteile. Zum einen die niedrige Spezifität von nur 35 % und die Sensitivität von nur knapp 65 %. Zum anderen ist die Interpretation des positiven Hauttests wegen der Kreuzreaktionen mit einer früher durchgeführten Tuberkuloseimpfung (BCG-Impfung) oder Kontakt mit Umweltmykobakterien (nicht tuberkulöse Mykobakterien) schwierig. Zudem kann nicht zuverlässig zwischen einer latenten und einer akuten TB-Infektion unterschieden werden. Der Test sagt lediglich aus, dass die Testperson Kontakt mit dem Erreger hatte. Seit einiger Zeit gibt es neue immunologische Testverfahren, die durch Messung spezifischer T-Zellreaktionen auf Mtb-Komplex-Antigene eine Diagnose ermöglichen.

1.4.1 Interferon-Gamma Release Assays

Neue Testverfahren zur spezifischeren Diagnostik quantifizieren die Interferon- γ -Freisetzung von mononukleären Zellen aus dem Blut nach Kontakt mit Mtb spezifischen Antigenen aus der „Region of Difference - 1“ (RD - 1) des mykobakteriellen Genoms.

Diese Tests sind als enzyme-linked-immunosorbent Assay (ELISA) QuantiFERON-TB Gold Test und enzyme-linked-immunospot (ELISpot) T Spot TB-Test im Handel und werden bereits in vielen Kliniken und Laboren eingesetzt.

Der QuantiFERON-Test basiert auf dem quantitativen Nachweis von IFN- γ . TB spezifische Antigene des Mtb-Komplex (ESAT-6, CFP-10 und TB 7.7) werden mit dem Blut des Patienten über Nacht inkubiert. T-Zellen mit spezifischer Aktivität gegen diese Antigene setzen nach Stimulation IFN- γ frei, welches anschließend mit einem ELISA Reader im Überstand gemessen wird.

Beim ELISpot-Test können direkt sensibilisierte T-Zellen über ihre Zytokin Freisetzung nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum QuantiFERON-Test werden periphere monozytäre Blutzellen (PBMC) aus dem Vollblut isoliert und in Platten inkubiert. In den Mikrotiterplatten des Tests befinden sich die TB spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10. Werden nun die isolierten und gereinigten PBMCs der Testperson hinzugefügt, kommt es, stimuliert durch die auf den Testplatten befindlichen Antigene, zur Freisetzung von Zytokinen, die sich an spezifische Antikörper anlagern. Nach einer Inkubation über Nacht in CO₂ Atmosphäre und Waschung des ersten Ansatzes, wird dann mit einem zweiten, Farbstoff gekoppeltem Antikörper gefärbt. Dabei dockt dieser zweite Antikörper an einem anderen Epitop des Zytokins an und kann durch die Farbmarkierung detektiert werden. Vorteile der genannten Verfahren sind, dass die Tests unabhängig vom Impfstatus der Testperson sind. Die Ergebnisse liegen binnen 24 Stunden vor, ein weiterer Arztbesuch für den Patienten entfällt.

Die Sensitivität und Spezifität dieser Tests ist weit höher als die des herkömmlichen THT, aber ein entscheidender Nachteil bleibt: auch sie können nicht zwischen einer akuten und einer latenten Tuberkuloseinfektion unterscheiden.

Zu erwähnen ist auch, dass alle heute existierenden immunologischen TB-Tests vor allem auf die Höhe (Quantität) der T-Zell Antwort abzielen. Dem diagnostischen Potential der Qualität der T-Zellantwort hingegen wurde bisher wenig Beachtung geschenkt. Dies beinhaltet die Expression von Oberflächenmarkern, die Funktionalität der mykobakteriellen Antigene und auch die Definition der spezifischen T-Zell-Antwort im Rahmen der ausgelösten Immunreaktion.

1.5 Das angeborene und adaptive Immunsystem

Jeder Kontakt des Organismus mit einem Antigen bewirkt eine Reaktion des Immunsystems. Die daraus resultierende Immunreaktion lässt sich aufteilen in die angeborene und die erworbene Immunreaktion.

Die angeborene Immunität ist sofort verfügbar und schützt den Wirt vor Erregern die sowohl extrazellulär als auch intrazellulär vorliegen. Dabei werden Mikroorganismen phagozytiert und prozessiert, Effektormechanismen (inflammatorische Zytokine z. B. TNF) induziert und die Anlockung und Aktivierung von Entzündungszellen durch z.B. Chemokinsekretion bewirkt. Die erworbene Immunität übernimmt mit zeitlicher Verzögerung mit spezialisierten Zellen (Tabelle 1) die weitere Abwehr gegen Krankheitserreger.

	Angeborenes (“unspezifisches”) Immunsystem	Adaptives (“spezifisches”) Immunsystem
Funktion	Entzündung / Abwehr	Antigenerkennung
Zellen	Myeloide Zellen Neutrophile Granulozyten Eosinophile Granulozyten Basophile Granulozyten Monozyten / Makrophagen NK-Zellen	Lymphozyten B-Zellen T-Zellen (CD4 / CD8)
Humoral	Komplement Lektine Zytokine Defensine	Immunglobuline Zytokine

Tabelle 1: Vergleich von angeborenem und adaptivem Immunsystem

Beim erstmaligen Kontakt eines Antigens mit dem Organismus, wird dieses Antigen über verschiedene Rezeptoren von den antigenpräsentierenden Zellen (APZ) des Immunsystems aufgenommen. Dies wird als Internalisierung bezeichnet. Falls das Antigen bereits in der APZ ist, ist der Schritt der Internalisierung nicht notwendig.

Nach dieser Internalisierung werden die Antigene intrazellulär durch Proteolyse fragmentiert. In den normalen Körperzellen werden die synthetisierten, körpereigenen Proteine durch ein Proteasom fragmentiert und anschließend durch einen Transportkomplex (TAP1/TAP2) ins endoplasmatische Reticulum transportiert.

Peptide, die aus Körperzellen stammen, werden im endoplasmatischen Reticulum an MHC-I-Proteine gebunden und in Vesikeln zur Plasmamembran transportiert und dort präsentiert (17). Körperfremde Antigene werden in den APZ nach der rezeptorvermittelten Endocytose durch Lysosomen zu Peptiden fragmentiert. Nach der Fusionierung mit Vesikeln, die aus dem Golgi-Apparat stammen und MHC-II-Proteine enthalten, erfolgt die Bindung an MHC-II-Proteine und der Transport an die Zelloberfläche.

MHC-I- bzw. MHC-II-Proteine unterscheiden sich dabei sowohl in der Funktion als auch im Aufbau. MHC-I-Proteine befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen und präsentieren wie oben beschrieben intrazellulär synthetisierte Proteine. Damit ist das Immunsystem in der Lage die eigenen Körperzellen zu erkennen. Sind diese Körperzellen durch Viren oder Bakterien befallen, die den Proteinbiosynthesapparat der Körperzellen in den eigenen Dienst stellen, werden körperfremde Peptide präsentiert und das Immunsystem erkennt diese als fremd und kann reagieren.

MHC-II-Proteine werden nur auf B-Lymphozyten, Makrophagen und den Langerhans-Zellen des Immunsystems exprimiert. Alle diese Zellen werden APZ genannt. Sie präsentieren Antigene, die wie oben beschrieben von extrazellulär aufgenommen worden sind.

Bei der Immunreaktion der TB kommt es zu einem Zusammenspiel zwischen angeborener und erworbener Immunität. Die Alveolarzellen der Lunge (unspezifisches Immunsystem) agieren als APZ und nehmen das Bakterium auf, um es dann anschließend nach Prozessierungsvorgängen im Rahmen der spezifischen Immunantwort den T-Zellen zu präsentieren. Die T-Zellerkennung ist hochkomplex und bis zum heutigen Tag noch nicht bis in alle Einzelheiten geklärt.

1.5.1 Antigenerkennung durch T-Zellen

T- bzw. B-Lymphozyten sind die zellulären Komponenten des erworbenen Immunsystems. Sie können durch Antigenerkennung und Präsentation zwischen potentiell pathogenen und nicht pathogenen Organismen unterscheiden und eine entsprechende Immunreaktion einleiten.

Die Zahl der Lymphozyten, die sich im peripheren Blut nachweisen lässt ist gering (ca. 1 %). Der weitaus größte Teil (ca. 99 %) der ca. 10^{12} Lymphozyten im gesamten Körper befinden sich im Thymus, im Knochenmark und in den Lymphknoten.

B-Lymphozyten haben einen Anteil von ca. 10 % an den zirkulierenden Lymphozyten. Nachdem diese Zellen eine Differenzierung durchgemacht haben, werden sie beim Kontakt mit einem Antigen aktiviert und wandeln sich zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen um. Diese können dann spezifische, gegen das Antigen gerichtete Immunglobuline oder Antikörper bilden und diese an das Blut abgeben.

T-Lymphozyten haben einen Anteil von ca. 70 % an den im Blut zirkulierenden Lymphozyten. Der T-Zellrezeptor, der auf der Plasmamembran dieser Zellen zu finden ist, kann Antigene binden die mit Hilfe der MHC-Komplexe präsentiert werden. Eine optimale Bindungsfähigkeit erreicht der Rezeptor nur zusammen mit einem Korezeptor. Dieser Korezeptor kommt in zwei unterschiedlichen Formen vor und charakterisiert jeweils die T-Lymphozyten-Subtypen und deren Funktion. Ca. 20 % der T-Lymphozyten können jedoch keiner der Subtypen zugeordnet werden.

T-Lymphozyten, die den Korezeptor CD8 tragen, sind zytotoxische T-Lymphozyten. Ihr T-Zellrezeptor reagiert mit MHC-I-Proteinen. T-Lymphozyten, die den Korezeptor CD4 tragen, sind T-Helferzellen (TH1, TH2). Ihr T-Zellrezeptor reagiert mit MHC-II-Proteinen. TH1-Zellen produzieren vor allem IFN- γ und TNF- β . TH2-Zellen produzieren vor allem IL-4, IL-5 und IL-13. Die TH1-Zellen sind besonders für die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene verantwortlich. Die TH2-Zellen sind wichtig für die Abwehr von extrazellulären Bakterien. Dabei helfen die von TH2-Zellen produzierten Zytokine den B-Lymphozyten bei der Differenzierung.

Neuere Daten und Untersuchungen stellen diese Aufteilung der T-Zellen in Frage und bringen eine neue T-Zell-Population ins Spiel, die der CD4 positiven Effektorzellen TH17 (18). Die Entwicklung dieser Population wird durch TH1 und TH2 typische Zytokine (IFN-Gamma und IL-4) supprimiert. Zytokine wie TGF-Beta und IL-6 hingegen führen zur Entstehung dieser T-Zell Subpopulationen (19;20).

Als regulatorische T-Zellen (Tr-Zellen) werden die TH3-Helferzellen und weitere regulatorische T-Zellen wie Tr1-Zellen, bezeichnet. TH3-Zellen sind typisch durch ihre TGF-Beta Produktion, wohingegen die regulatorischen T-Zellen vor allem das antiinflammatorische Zytokin Interleukin-10 produzieren. Die regulatorischen T-Zellen lassen sich anhand der Zytokinmuster und Oberflächenmarker noch in weitere Untergruppen unterteilen (21) und bilden so ein komplexes System im Rahmen von Entzündungsreaktionen.

Untersuchungen haben gezeigt, dass bei der Immunabwehr gegen das Mtb B-Zellen keine Rolle spielen, T-Zellen hingegen sehr wichtig sind.

1.5.2 Immunantwort gegen *Mycobacterium tuberculosis*

Bei der TB versucht das unspezifische Immunsystem zunächst, Mtb nach Aufnahme durch Alveolarmakrophagen (AM) oder dendritischen Zellen (DZ) zu eliminieren. Hierzu wird der Erreger von den genannten Zellen nach Rezeptorvermittlung phagozytiert. Die AM besitzen in ihren Granula zytotoxische Effektormoleküle, wie z.B. saure Phosphatasen, Kathepsine, Lysozyme, β -Glucuronidasen, β -Galaktosidasen, Arylsulfatasen, saure Ribonukleasen und Phospholipasen (22;23), mit deren Hilfe sie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffradikale produzieren, welche direkte antimikrobielle Aktivität besitzen (24-26).

Die Zellen selber sind im Rahmen der Immunreaktion nicht fähig, das Bakterium vollständig zu eliminieren. Auch weitere Makrophagen und DZ, die durch verschiedene

Chemokine an den Ort der Infektion gelockt werden, können dies nicht bewirken. Der Komplex aus Makrophagen und Mykobakterien wird Granulom genannt (Abbildung 3). In ihnen ruht der Erreger, ohne dass er zerstört wurde. Eine Reaktivierung zu einem späteren Zeitpunkt ist möglich.

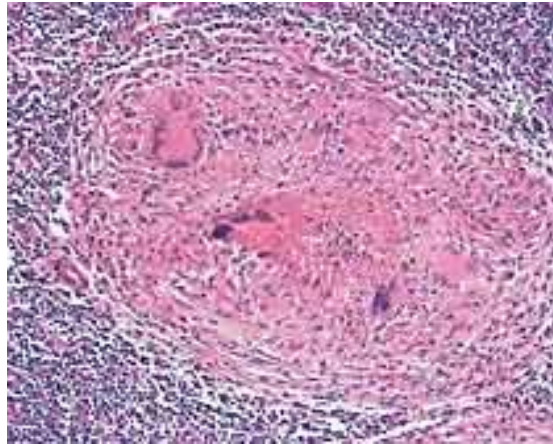


Abbildung 3: Granulom in einem Lymphknoten. Deutlich erkennbar ist die Einschmelzung im Zentralbereich des Granuloms. Diese besteht aus Makrophagen und Mykobakterien. Die Mykobakterien sind nicht vollständig zerstört sondern ruhen und können reaktiviert werden (27).

Zusätzlich zur angeborenen Immunität setzt das erworbene Immunsystem ein, welches bei der TB eine wesentliche Rolle spielt. Die APZ nehmen den Erreger auf, prozessieren ihn und präsentieren ihn anschließend über den MHC-I Rezeptor.

Der Kontakt zwischen dem Mtb und den APZ wird über verschiedene Oberflächenrezeptoren vermittelt.

Heute weiß man, dass mindestens drei so genannte Toll-like-Rezeptoren (TLR) an der Interaktion des Bakteriums mit den APZ beteiligt sind (28) und somit einen wichtigen Teil der unspezifischen Abwehr darstellen. TLR9 z.B. interagiert mit CpG (Cytosin-

Guanin-Dinukleotiden) der mykobakteriellen DNA (29;30). TLR2 und - 4 erkennen verschiedenen Zellwandbestandteile, z.B. Lipoarabinomannan (LAM) und weitere Lipoproteine (31;32) (Abbildung 4).

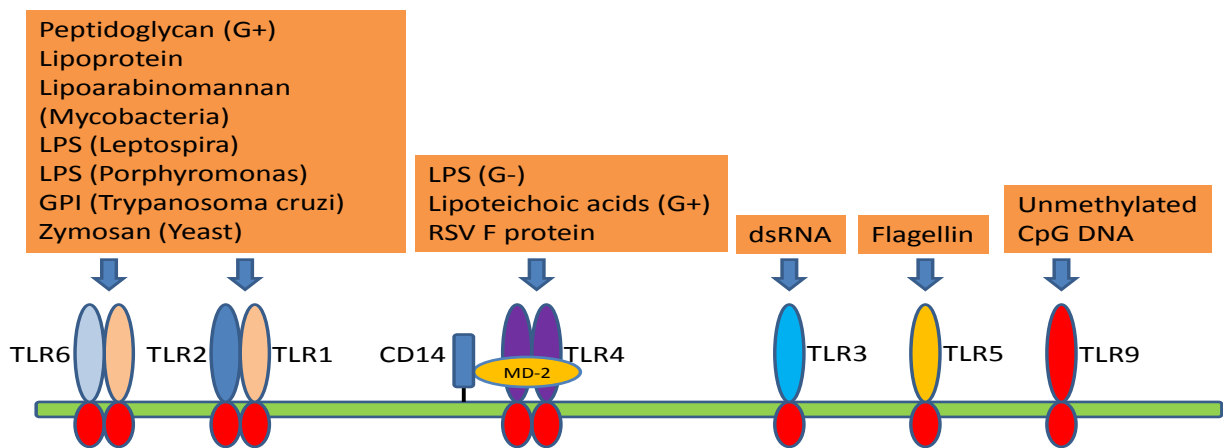


Abbildung 4: Toll-like-Rezeptoren (TLR) und Ihre Liganden. Modifiziert nach (33). Toll-like Rezeptoren spielen bei Immunreaktionen des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle. Als PRRs (Pattern Recognition Receptors) erkennen sie PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Der Rezeptor TLR4 erkennt z.B. Lipopolysaccharide (LPS) nur, wenn CD14 und MD-2 ebenfalls am Rezeptor angedockt haben. TLR2 erkennt eine Vielzahl an Strukturen im Zusammenspiel mit anderen TLRs. TLR3 ist bei der Erkennung von Doppelstrang RNA beteiligt. TLR5 ist für die Erkennung von bakteriellem Flagellin zuständig. TLR9 erkennt bakterielle DNA.

Neben diesen Rezeptoren gibt es weitere Rezeptoren, die bestimmte Wirtsmoleküle wie Surfactant und Komplement (IgG), die zuvor auf der Oberfläche der Mykobakterien gebunden waren, erkennen. Für den weiteren Verlauf der Infektion (intrazelluläre Aktivierung) ist es wichtig, welchen Rezeptor das Bakterium für die Aufnahme in die

APZ benutzt. Wird der Erreger über Fc-rezeptorvermittelte Phagozytose (IgG opsonierte Erreger) aufgenommen, kommt es zu einer Aktivierung antimikrobieller Abwehrsysteme der Makrophagen (34). Wird der Erreger hingegen über den Komplementrezeptor 3 (CR 3) aufgenommen, kommt es zu keiner solchen Aktivierung. Dieser zweite Weg ist eine wichtige Strategie des Bakteriums, um sich in die Wirtszelle zu schleichen, ohne eliminiert zu werden (35). Das Bakterium besitzt zudem membranständiges Cholesterol. Dieses erleichtert zum einen das Andocken des Bakteriums an den Makrophagen, zum anderen ermöglicht es den Einbau eines tryptophanaspartathaltigen Coatproteins (TACO), das wiederum die Phagolysosomenreifung verhindert (36).

Wie bereits erwähnt, beruht die Strategie des Mtb darauf, der Vernichtung durch das Immunsystem zu entgehen. Zum einen stoppt es die Phagosomenreifung in einer frühen Phase, zum anderen verhindert es die Bildung der Phagolysosomen. Indem das Immunsystem die Erreger in die APZ aufnimmt und mykobakterielle Antigene den T-Zellen präsentiert versucht es, das adaptive Immunsystem zu aktivieren (37;38). Im weiteren Verlauf kommt es zur Sekretion von Zytokinen (IL-12 und IL-18), die eine T-Helfer-Zellantwort (TH1) auslösen und mit kostimulatorischen Molekülen wie CD40 und B7 die spezifische Immunantwort anstoßen.

Neben diesen Möglichkeiten des Bakteriums, sich vor seiner Vernichtung zu schützen, löst der Erreger auch Signale in den APZ aus, um die Sekretion des inhibitorischen IL-10 durch die APZ zu bewirken. Die Ausschüttung dieses Interleukins erfolgt nach Interaktion des mykobakteriellen LAM mit dem Rezeptor DC-SIGN (DC-spezifisches ICAM3-greifendes Non Integrin, CD 209) (39-41).

Die Rolle der CD4 T-Zellen in der Kontrolle der TB wurde durch die HIV Pandemie demonstriert. Während nur 10 % der latent mit TB Infizierten, aber klinisch gesunden Individuen während ihres Lebens eine aktive TB entwickeln, steigt dieses Risiko auf 10 % pro Jahr bei HIV infizierten Menschen (42). Diese Beobachtung zeigt, dass CD4 T-Helfer Zellen (TH1-Zellen), welche bei HIV Infizierten zunehmend weniger werden, eine zentrale Rolle in der Kontrolle der TB spielen. Während der Aktivierung können diese CD4 T-Zellen IFN- γ freisetzen, das dann Monozyten befähigt, intrazelluläre Mykobakterien zu zerstören. Die anschließende Produktion von TNF- α durch die

Monozyten ist essentiell, um Mykobakterien in den Granulomen zu halten (37). Verschiedene andere Immunzellen, die auch CD8 T-Zellen beinhalten, scheinen bei der Kontrolle der TB mitzuwirken (8), werden in dieser Arbeit jedoch nicht betrachtet.

1.5.3 Die Rolle der Rezeptoren und Chemokine bei der TB

Jede Zelle hat auf ihrer Oberfläche spezifische Rezeptoren, die Aufschluss über den Aktivierungsgrad, die Funktion und die Herkunft der Zelle geben können. Mit Hilfe dieser Rezeptoren ist es möglich, spezielle Strategien des Immunsystems bei der Abwehr von Krankheiten zu untersuchen und zu verstehen (Abbildung 5).

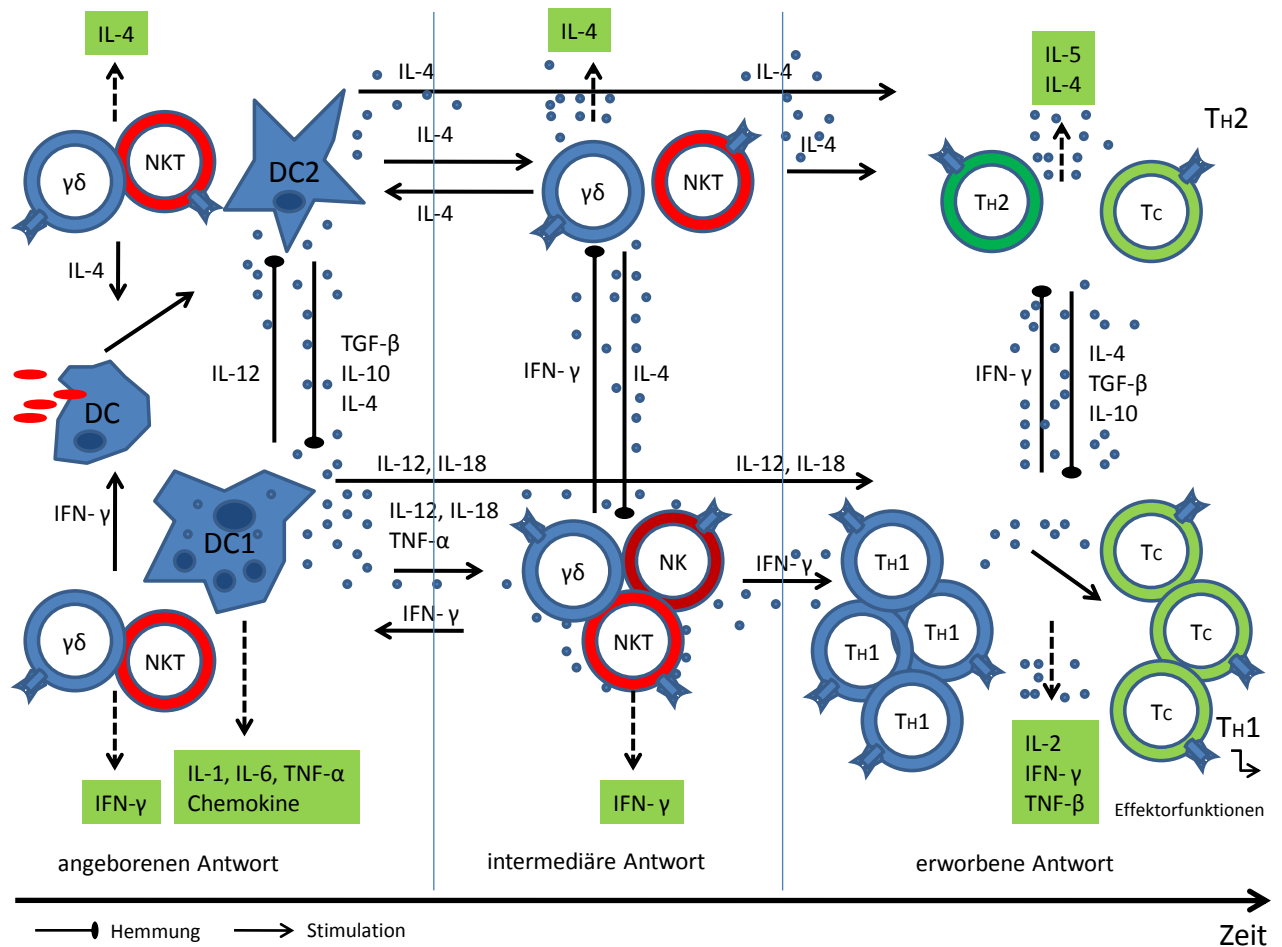


Abbildung 5: Beteiligung der verschiedenen Immunzellen bei der Tuberkuloseabwehr und ihr zeitlicher Verlauf. Modifiziert nach (43)

CD27 ist ein Rezeptor, der auf der T-Zelloberfläche von Gedächtniszellen exprimiert wird und als Kostimulationsrezeptor dient. Dieser Rezeptor wird herabreguliert, wenn sich T-Zellen von naiven, nicht mit Antigenen in Kontakt gewesenen Zellen zum Memory Stadium entwickeln. CD27 bindet an CD70 und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der B-Zellaktivierung und Immunglobulinsynthese (44). CD27 (transmembranes Glykoprotein) wird von T-Zellen, Thymozyten, B- und NK-Zellen exprimiert (45-49). Es gehört der Superfamilie der TNF-R/NGF-R an (50) und sein Ligand CD70 wird unter anderem auf aktivierten CD4 positiven T-Zellen im RO

positiven Kompartiment exprimiert (51). Die Isoform CD45RA wird auf naiven T-Zellen und CD45RO auf Memory T-Zellen exprimiert. Bei einer T-Zellrezeptor (TCR) Stimulation wird CD27 hochreguliert und nach längerer Stimulation wieder runter reguliert. Bereits in früheren Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass die CD27-CD70 Interaktion ein wichtiges Signal für die Zytokinproduktion und Induktion von aktivierenden Antigenen ist (52).

Das CD57 (HNK-1 (human natural killer-1), LEU-7) ist ein Oberflächenmarker, der auf zytotoxischen T-Zellen, natürlichen Killerzellen, Untergruppen von T-Zellen und B-Zellen gefunden wird und die Isoform des neutralen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) darstellt.

Der TCR ist ein α : β -Heterodimer und erkennt Peptide, die an MHC gekoppelt präsentiert werden. Der Rezeptor kann allerdings die Information über die Bindung nicht an die Zelle weiterleiten. Um dies zu ermöglichen, sind im funktionstüchtigen Rezeptorkomplex die α : β -Heterodimere mit einem Komplex aus vier anderen Signalketten (zwei ϵ -, einer δ -, einer γ -Kette) assoziiert, die man insgesamt als CD3 bezeichnet. Dieser Komplex ist für die Expression der antigenbindenden Ketten sowie für die Signaltransduktion in die Zelle notwendig. Zusätzlich liegt eine ζ -Kette als Homodimer im Zytoplasma vor, die die Information ins Zellinnere überträgt (53).

Wie bereits erwähnt, ist die Aufgabe der angeborenen Immunität, Monozyten und Zellen der erworbenen Immunität (T-Zellen) an den Ort der Infektion zu locken. Dies bewerkstelligt das Immunsystem durch die Sekretion von Chemokinen. Chemokine sind kleine Chemoattraktor-Proteine, die durch Bindung an einen siebenfach transmembran-gelagerten, heterotrimeren und G-Protein gekoppelten Rezeptor die Signaltransduktion auslösen (54). Je nach Spezifität werden die Rezeptoren in vier Klassen eingeteilt (CR, CCR, CXCR und CX3CR).

CCR4 (Chemokin-Rezeptor 4, CD194) und CCR5 (Chemokin-Rezeptor 5, CD195) sind Rezeptoren aus der Familie der Chemokinrezeptoren. CCR4 kann durch die CC-Chemokine CCL 2 (MCP-1), CCL 4 (MIP-1 β), CCL 5 (RANTES), CCL 17 (TARC) und CCL 22 aktiviert werden. CCR5 kann durch CCL 3 (MIP-1 α), CCL 4 (MIP-1 β), CCL 5 (RANTES) und CCL 8 (MCP-2) aktiviert werden (55;56). Beide Rezeptoren spielen bei

der Immunreaktion gegen die TB eine wichtige Rolle. Durch Bindung von Chemokinen an den Rezeptor wird dieser aktiviert und löst eine Wanderung der Zellen aus, die den Rezeptor exprimieren. Dabei bewegen sich die Zellen in Richtung der höchsten Chemokinkonzentration (Chemotaxis). Das Mtb bewirkt eine schnelle Expression einer Vielzahl von Chemokinen. Diese können bereits 2 Stunden nach der Infektion mit dem Bakterium bestimmt werden (57).

Die Unterteilung der Chemokine erfolgt über die Anzahl und Anordnung ihrer Cysteinreste. C-Chemokine haben ihr Cystein in γ -Position, CC-Chemokine in β -Position. Zu den CC-Chemokinen gehören unter anderem MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES. Diese Chemokine werden von Makrophagen, die auf virulente Mykobakterien reagieren, exprimiert (55;58). CXC Chemokine haben das Cystein in α -Position (IL-8, IP-10). CXCL10, ein Chemokin der CXC Chemokine, wird auch Interferon- γ induzierbares Protein 10 genannt (IP-10). Es wird exprimiert von Lymphozyten und Monozyten und ist involviert in die Wanderung der TH1-Zellen zu inflammatorischen Regionen durch die Interaktion mit dem Chemokinrezeptor CXCR3 (59;60).

Das Chemokin CCL3 (MIP-1 α) wird von Makrophagen exprimiert, wenn diese mit bakteriellen Endotoxinen in Kontakt kommen. Als inflammatorisches Protein spielt es bei der Abwehr der TB eine wichtige Rolle (61). In früheren Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) von Tuberkulosepatienten erhöhte Konzentrationen von MCP-1, IL-8 und RANTES vorliegen (62). Bei DNA-Analysen konnte nach Infektion von Makrophagen mit Mtb eine Hochregulation der mRNS für MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8 und RANTES nachgewiesen werden (63). Die genauen Mechanismen, die bei der Abwehr der TB eine Rolle spielen, konnten noch nicht detailliert geklärt werden.

1.6 Ziele der Arbeit

In unserer Arbeit haben wir uns auf die Problematik der eindeutigen Diagnostik und Differenzierung der Tuberkuloseinfektion konzentriert und versucht, moderne Alternativen der Diagnostik zu finden.

Ein Schwerpunkt der Arbeit war die eindeutige Identifizierung von Individuen mit latenter Mtb Infektion und erkrankten Patienten.

Tuberkulin, welches im Rahmen des TB-Hauttestes eingesetzt wird, enthält mehr als 200 unterschiedliche mykobakterielle Antigene. Zudem enthält es auch Antigene des für die BCG Impfung verwendeten *M. bovis*. Die induzierte T-Zellantwort ist somit unspezifisch hinsichtlich der diagnostischen Aussagekraft.

Außerdem existieren immunologische Tests, wie der Elispot-TB und QuantiFERON-TB Gold Test, die latent infizierte Personen unabhängig vom Impfstatus zuverlässig erkennen können. Diese sogenannten Interferon-Gamma Release Assays (IGRAs) zeigen T-Zellantworten auf Mtb spezifische ESAT-6 und CFP-10 Proteine. Dies ist zurzeit der Goldstandard, um eine LTBI zu entdecken. Diese Tests sind jedoch für die Diagnose der akuten TB ungeeignet (64;65). Sie können jedoch zwischen TB infizierten und BCG geimpften Personen unterscheiden.

Zurzeit gibt es keinen schnellen und zuverlässigen immunologischen Test, der zwischen der akuten und der latenten TB unterscheiden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, ob mittels Oberflächenantikörpern auf den T-Zellen ein Muster ermittelt werden kann, um Patienten die akut mit dem Erreger infiziert sind, und einer Behandlung zugeführt werden müssen, zu erkennen. Hierzu werden CD4 T-Zellen aus peripherem Blut von Patienten und Probanden auf Vorhandensein von bestimmten Oberflächenmarkern untersucht, die im Rahmen einer Immunantwort, verursacht durch Mykobakterien, exprimiert werden. Für die Stimulation benutzten wir PPD und das TB spezifische ESAT-6. Für die Unterscheidung der verschiedenen immunologischen Zellen verwendeten wir eine Auswahl an klassischen Oberflächenmarkern für naive/Memory T-Zell Differenzierung und untersuchten die IFN-

γ -Produktion, um die T-Zellen zu identifizieren.

Ergänzend sollen typische Chemokinmuster einer akuten pulmonalen TB-Infektion ermittelt werden. Die Zytokinproduktion wird in den entnommenen Überständen der stimulierten Ansätze mittels xMAP multiplex Technologie (Luminex) gemessen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Probanden

Es wurden Blutproben von 27 Probanden für die Initialstudie sowie von 31 Probanden für die verblindete Zweitstudie untersucht. Die Patienten befanden sich in stationärer Behandlung in der Lungenklinik Lostau gGmbH, Lindenstr. 2, 39291 Lostau. Die Blutentnahmen erfolgten im Zeitraum von Januar 2005 bis Oktober 2006. Kontrollblutproben wurden von freiwilligen gesunden Probanden entnommen.

Das Blut der Patienten wurde in Citratröhrchen abgenommen. Die Weiterverarbeitung erfolgte innerhalb von 4 Stunden.

Die Patienten / Probanden die in die erste Studie eingeschlossen waren, wurden für die Auswertung der Ergebnisse in 4 Gruppen eingeteilt. Patienten mit Abstrich und/oder Kultur positiver LTb, latent TB infizierte (nicht BCG geimpft), stark exponierte Probanden (BCG geimpft) und gesunde nicht exponierte Probanden (BCG geimpft). Details zu den Personengruppen der Initialstudie sind der Tabelle 4 (Abschnitt 3.3) zu entnehmen.

Die Diagnose einer LTbI wurde definiert durch eine positive Antwort auf den THT ohne Vorliegen einer BCG Impfung. Die Definition einer hohen Exposition ist gegeben durch engen regelmäßigen Kontakt zu TB-Patienten. Dabei handelt es sich um Krankenhauspersonal mit regelmäßigem direktem Kontakt zu TB-Patienten, z.B. im Rahmen der Durchführung von BALs bei TB-Patienten, oder Angehörige, die über längere Zeit im gleichen Haushalt mit TB-Patienten gelebt haben. Alle in unsere Untersuchung eingeschlossenen Personen (TB-Patienten, Kontrollen, gesunde Spender) wurden in der Kindheit BCG geimpft. Lediglich die als latent infiziert eingestuft Probanden (positive Antwort auf Tuberkulin) waren nicht BCG geimpft.

Nach Abschluss der ersten Studie führten wir eine verblindete prospektive Studie durch, um die Ergebnisse der ersten Studie zu bestätigen. Bei dieser Studie wurden die Diagnosen der Probanden durch einen verantwortlichen Arzt der Klinik kodiert und waren dem Labor bis zum Versuchsende nicht bekannt. Nach Abschluss dieser zweiten Studie wurden die Ergebnisse unserer Untersuchung in schriftlicher Form dem Studienbeauftragten mitgeteilt und anschließend von ihm entschlüsselt.

Details zu den Personengruppen der Blindstudie sind der Tabelle 5 (Abschnitt 3.4) zu entnehmen.

Die Abstrich- und Kulturtests wurden im Labor der Lungenklinik Lostau standardisiert durchgeführt. Die Lungenbiopsien im Rahmen der Bronchoskopie wurden im Institut für Pathologie der Lungenklinik Lostau begutachtet. Die vorliegenden Röntgenaufnahmen wurden von einem Facharzt für Pneumologie und einem Facharzt für Radiologie der Lungenklinik Lostau befundet.

Alle teilnehmenden Personen wurden über die Studien informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin lag vor.

2.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

10 ml Citrat-Monovetten (Glas)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
0.5, 1.5, 2.0 ml Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2070 Falcon - Röhrchen (50 ml, Polypropylen)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Pipettenspitzen zu 10, 100 und 100 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
sterile Pipettenspitzen (5 und 10 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

2052 Falcon - Röhrchen (5 ml, Polypropylen)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
14 ml „Cellstar“ - Polypropylen-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
14 ml Polyethylen - Röhrchen mit Decke	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Sterile Transferpipetten (3,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Chemikalien, Pufferlösungen, Medien, Lösungen

Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Brefeldin A (BFA)	Sigma, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Pierce, Rockford, USA
Ethyldiamin tetra - Essigsäure (EDTA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Natrium Azid (NaN ₃)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aqua dest.	Braun, Melsungen, Deutschland
BD FACS Lysing Solution	BD, San Jose, USA
BD FACS Permeabilizing Solution 2	BD, San Jose, USA
Ficoll-Paque	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Na - Heparin (Liquemin [®])	Roche, Eppstein, Deutschland

Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Humane Immunglobulin - Lösung (Octagam®)	Octapharma, Langenfeld, Deutschland
Sterile phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Dulbeccos, Gibco, Großbritannien
Unsterile phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Hausapotheke der Charité
1640 RPMI-Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland

Zellkulturmedium:

1640 RPMI-Medium + 10 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 I.E.
Penicillin/Streptomycin

EDTA-Lösung:

PBS + 2 mM EDTA

PFA-Fixationslösung:

PBS + 1 % (w/v) PFA

Wasch-Puffer:

PBS + 0.5 % (w/v) BSA, 0.1 % (w/v) NaN₃

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Konjugation	Spezies	Hersteller
anti-CD3	Pacific Blue (PB)	Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD4	AmCyan	Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD4	PE-Texas-RED (ECD)	Maus	Beckman-Coulter (Krefeld, Germany)
anti-CD8	PE-Cyan7	Maus	Caltag (Hamburg, Germany)
CCR4	Phycoerythrin (PE)	Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
CCR5 (CD 195)	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanate (FITC)	Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-IL2	FITC	Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-IL2	PE	Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD27	FITC	Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD28	FITC	Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD57	PE	Maus	Beckman-Coulter (Krefeld, Germany)
anti-CD62L	PE	Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD3	Peridine-Chlorophyll (PerCP)	Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-IFN- γ	Allophycocyanine (APC)	Maus	BD Pharmingen, Heidelberg

Tabelle 2: Verwendete Antikörper zur Oberflächenfärbung und intrazellulären Färbung

2.1.5 Peptide und Antigene

Antigen	Hersteller
Purified Protein Peptid (PPD)	Statens Serum Institut, Kopenhagen
Early secretory antigenic target 6 (ESAT-6)	Hergestellt im Institut für Theoretische Biologie, Berlin

Tabelle 3: Verwendete Peptide

2.1.6 Verwendete Geräte

Für die Messungen wurde ein Durchflusszytometer FACS-LRS II (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) benutzt (Abbildung 6).

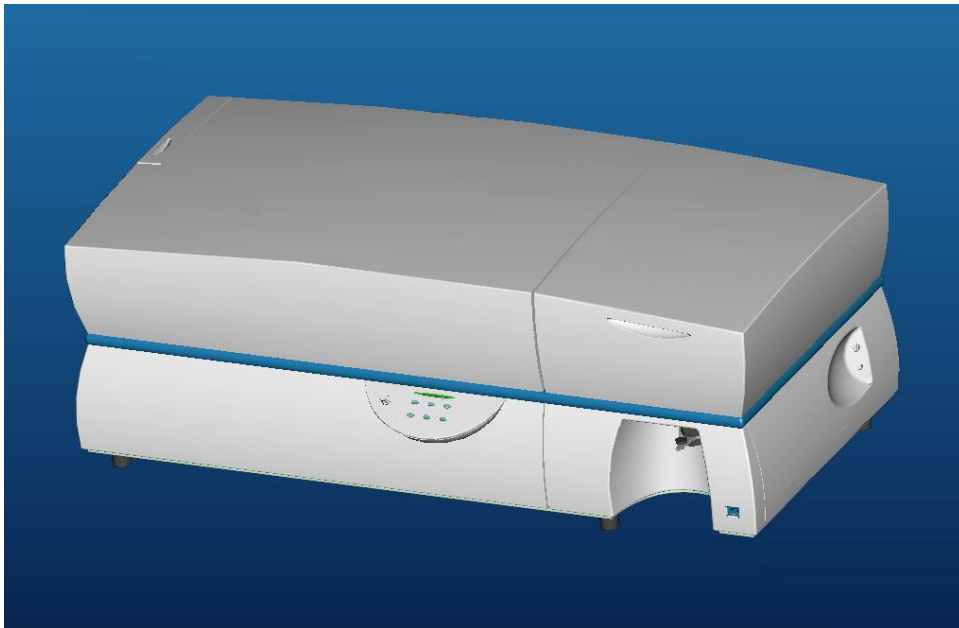


Abbildung 6: BD LSR II flow cytometer der Firma BD. Quelle: BD

Absaugpumpe Laboport

Neuberger, Freiburg, Deutschland

Brutschrank EG 110 R

Jouan, Saint Nazaire, Frankreich

Lichtmikroskop

Olympus, Tokio, Japan

Neubauer Zählkammer

Brand, Wertheim, Deutschland

Pipettierhilfe Pipettus standard

Hirschmann, Eberstadt, Deutschland

Wasserbad (beheizt)

Grant, Cambridge, Großbritannien

Zentrifuge, Centrifuge 5810

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Kühlzentrifuge CR422

Jouan, Saint Nazaire, Frankreich

2.1.7 Verwendete Software

FACSDiva Software	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Office 2003	Microsoft, USA
SPSS 11.5	SPSS Inc., Chicago, USA

2.1.8 Anmerkung zur Datenerhebung und Auswertung

Die Datenerhebung und die Auswertung erfolgten in enger Kooperation mit Herrn Mathias Streit. Der Großteil, der in der Initialstudie erhobenen Ergebnisse erfolgte durch meine Person mit Unterstützung durch Herrn Streit. Die Daten der Blindstudie wurden zum Großteil durch Herrn Streit mit meiner Unterstützung erhoben und ausgewertet.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation von peripheren monozytären Blutzellen

Die Isolation der peripheren monozytären Blutzellen (PBMC) erfolgte aus peripherem venösem Citrat-Vollblut. Bei der Herstellung und Isolierung der PBMC aus Vollblut wurde die Dichtegradienten-Zentrifugation mittels Ficoll-Paque (Dichte: 1.078 g / ml bei 20 °C) benutzt.

Zunächst wurden hierfür 14 ml „Cellstar“-Polypropylen-Röhrchen mit 3 ml Ficoll beschickt. Dann erfolgte die vorsichtige Überschichtung mit 10 - 15 ml Vollblut verdünnt mit PBS im Verhältnis 1:1. Anschließend wurden die Röhrchen bei 1000 g bzw. 2400 rpm für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Die zwischen Plasma und Ficoll befindliche Zellschicht (PBMC) wurde unter sterilen Bedingungen entnommen und dreimal mit sterilem PBS gewaschen (3 Waschschrirte, 210 g / 10 min.). Die Zellen wurden anschließend in einem 50 ml Polypropylenröhrchen mit Zellkulturmedium auf eine Zellkonzentration von 2.0×10^6 Zellen/ml eingestellt.

2.2.2 Stimulation antigenspezifischer T-Zellen unter Verwendung von PBMC

Die Stimulation der aus dem Vollblut isolierten PBMCs erfolgte mit PPD und ESAT-6. PPD wurde vom Statens Serum Institut, Kopenhagen hergestellt. Das verwendete ESAT-6 Peptid Set wurde durch unseren Kollaborationspartner R. Volkmer im Institut für Theoretische Biologie hergestellt (21 Peptide, 15 Aminosäuren Länge, 11 Überlappungen zwischen Peptiden, beinhaltet das Swiss-Prot. Q57165 Sequenz). Die Peptide wurden in DMSO aufgelöst. Die Endkonzentration für jedes der 21 ESAT-6 Proteine lag bei 1 µg / ml. Die Endkonzentration für PPD lag bei 10 µg / ml.

Für die Stimulation wurden 10 µl PPD und 4 µl ESAT-6 pro 2.0×10^6 Zellen/ml verwendet. Die Ansätze wurden jeweils auf eine Gesamtmenge von 500 µl mit Kulturmedium aufgefüllt. Pro Ansatz wurde eine Negativkontrolle mitgeführt (2.0×10^6 Zellen/ml + 2 µl DMSO). Die Proben wurden mit 5 Grad Neigung von der Horizontalen bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre im Brutschrank für 2 Stunden inkubiert. Nach 2 Stunden wurde jedem Röhrchen 2 µl Brefeldin A zugegeben.

Anschließend erfolgte die weitere Inkubation über 14 Stunden mit 5 Grad Schräglage von der Horizontalen bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre im Brutschrank. Somit lag eine Gesamtinkubationszeit von 16 Stunden vor. Danach wurde die Inkubation durch Zugabe von 3 ml PBS (4 °C) gestoppt.

Die Ansätze wurden für 8 min. bei 430 g / 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert und anschließend die Überstände verworfen. Die Zellen wurden resuspendiert und unter Zugabe von 2 mM EDTA-Lösung erneut bei 37 °C im Wasserbad für 10 min inkubiert, um durch die Entziehung von Ca²⁺ die Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion an die Röhrchenwand zu verringern. Anschließend erfolgte die Resuspension unter Zugabe von Waschpuffer für die Zytokinfärbung.

2.2.3 Oberflächenmarker- und Intrazelluläre Zytokinfärbung

Zur Identifizierung der für die IFN-γ-Produktion verantwortlichen Zellpopulation in der PBMC Population erfolgte eine Oberflächenantikörperfärbung spezifisch für CD4+ T-Zellen bestehend aus 10 µl anti-CD3-PerCP, 10 µl anti-CD4-PE und 0.5 µl anti-CD8-APC. Nach Zugabe der Antikörper erfolgte die Inkubation für 30 min auf Eis unter Lichtabschluss.

Anschließend wurde nach Zugabe von 3 ml Waschpuffer für 8 min. bei 430 g / 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert, und die Pellets wurden nach vorsichtigem Dekantieren wieder resuspendiert. Vor der nun folgenden intrazellulären Färbung wurden die Zellen permeabilisiert. Es erfolgte die Zugabe von 1 ml Permeabilisierungslösung (Verdünnung 1:10 → 1 ml Perm 2 + 9 ml destilliertes Wasser) mit anschließender Inkubation (10 min

unter Lichtabschluss und Raumtemperatur). Nach erneuter Zugabe von 3 ml Waschpuffer wurde für 8 min. bei 430 g / 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert, und die Pellets wurden nach vorsichtigem Dekantieren wieder in Suspension gebracht.

Nach Permeabilisierung der Zellen erfolgte die intrazelluläre Färbung mit 10 µl anti-IFN-γ-FITC für 30 min auf Eis unter Lichtabschluss.

Vor der anschließenden Fixierung der Zellen wurden diese erneut gewaschen. Zur Fixierung wurde 1ml PFA in jedes Röhrchen gegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen durch 5-minütige Zugabe von 1 % PFA-Lösung refixiert, nochmals gewaschen und anschließend durchflusszytometrisch gemessen.

2.2.4 Zytokinmessung in den Überständen

Zur Bestimmung der Zytokinproduktion in den Überständen der stimulierten PBMCs wurden die Röhrchen nach der zweistündigen Inkubation nicht mit Brefeldin A versetzt, sondern lediglich 500 µl 10 % FCS zugegeben. Anschließend wurden diese Röhrchen für 14 weitere Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Überstände für 8 min. bei 430 g / 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert, anschließend mit einer sterilen Pipette entnommen und in ein ebenfalls steriles 2052 Falcon-Röhrchen überführt. Bis zur Messung wurden die Röhrchen bei minus 80 °C gelagert. Die Messungen wurden von Frau Dr. Rodica Lenkei (Cario Diagnostik AB, St Görans Hospital, Stockholm, Sweden) mit einem bead-array (Lincoplex) by Linco Research (Stockholm, Sweden) und einem Luminex-xMAP System durchgeführt.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Differenzierung von in Suspension befindlichen Zellen nach deren morphologischen Eigenschaften wie Zellgröße und Granularität. Diese Eigenschaften verursachen beim Passieren eines monochromatischen, kohärenten und gebündelten Laserstrahls eine unterschiedliche Streuung des Lichtes. Die Unterscheidung der verschiedenen Antigene innerhalb und außerhalb einer Zelle gelingt durch Bindung von antigenpezifischen, mit Fluorochrom markierten Antikörpern. Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper, emittiert die Zelle - angeregt durch das Laserlicht - Licht eines bestimmten Wellenlängenspektrums.

Damit die zu untersuchenden Zellen nicht zeitgleich den Laserstrahl (Argonlaser 488 nm) durchwandern, müssen die Zellen zunächst in eine Reihe gebracht werden. Dies geschieht mit Hilfe der hydrodynamischen Fokussierung. Die Zellen werden in eine laminäre Strömung gebracht, treten einzeln in die Messkammer ein und treffen auf den monochromatischen Laserstrahl. Dabei verursacht die Größe der Zellen eine unterschiedliche Lichtstreuung nach vorne (FSC = forward scatter) und die Granularität eine unterschiedliche Lichtstreuung zur Seite (SSC = sideward scatter).

Durch geeignete Detektionseinheiten (Fotomultiplier) werden die gestreuten und emittierten Lichtsignale in elektrische Impulse umgewandelt, verstärkt und durch Prozessoren aufbereitet. Jedes registrierte Ereignis entspricht einer Zelle. Diese Ereignisse können mit Hilfe von Computerprogrammen in Dot-Plots (Punktwolkendarstellung) visualisiert werden. Durch Definition von polygonalen Regionen in den Dot-Plots können gezielt Zellpopulationen ausgewählt werden. Durch logische Verknüpfung definierter Regionen „Gates“ können die Zellpopulationen weiter differenziert und durch Dot-Plots farbkodiert dargestellt werden.

Alle Messungen wurden am Durchflusszytometer FACS-LRS II (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) durchgeführt. Es wurden 250000 gefärbte Zellen pro Tube aufgezeichnet. Vor jeder Messung wurde das Durchflusszytometer mittels definierter

Farbstofflösungen kalibriert (Kompensation) um die spektrale Überlappung zu minimieren.

Für die Analyse der gemessenen Datensätze wurde die FACSDiva Software der Firma BD eingesetzt. Der prozentuale Anteil der IFN- γ positiven CD4 T-Zellen wurde durch eine standardisierte Auswertung ermittelt.

Für die weitere Analyse wurden die IFN- γ /CD3/CD4 positiven Zellen bestimmt und in Prozent der gesamten CD4 T-Zellen dargestellt. Von dieser Prozentzahl wurden die Prozentsätze der IFN- γ positiven T-Zellen bei den unstimulierten Proben abgezogen. Anschließend wurden die CD4/IFN- γ positiven Zellen in Bezug auf weitere Oberflächenmarker analysiert.

2.2.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Datensätze benutzten wir die Software SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, USA). Unterschiede zwischen gepaarten Stichproben wurden durch den Wilcoxon-Test analysiert. Um Anschlusswerte zu definieren, wurden Receiver Operating Characteristics, (ROC)-Analysen, benutzt. Unterschiede zwischen unpaaren Ansätzen wurden durch den Mann-Whitney U-Test ermittelt.

2.2.7 Datenanalyse

Das Ziel dieser Experimente war die Identifizierung und Quantifizierung von positiven und negativen Ereignissen bezogen auf die gesamten Ereignisse.

Zunächst wurden die Lymphozyten in einem Diagramm, bei dem die Zellgröße (FSC) gegen die Granularität (SSC) dargestellt wird, erfasst (Abbildung 7).

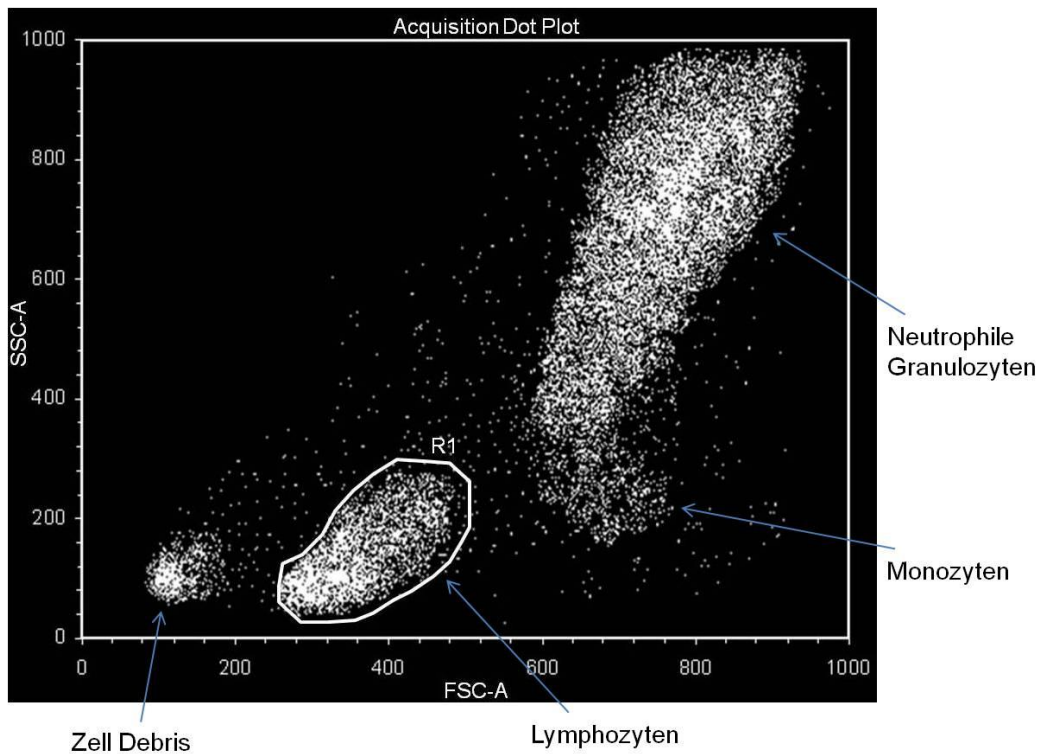


Abbildung 7: Dot Plot der aufgezeichneten Ereignisse einer Messung. In Abhängigkeit der Zellgröße und Granularität lassen sich so die verschiedenen Zellen in der Probe identifizieren.

Im nächsten Schritt wurden die Lymphozyten in einem CD3 gegen CD4 Diagramm analysiert und ein Gate (R2) um die CD3/CD4 positiven Lymphozyten gesetzt (Abbildung 8). Anschließend wurden die CD4 T-Lymphozyten in weiteren Gates untersucht.

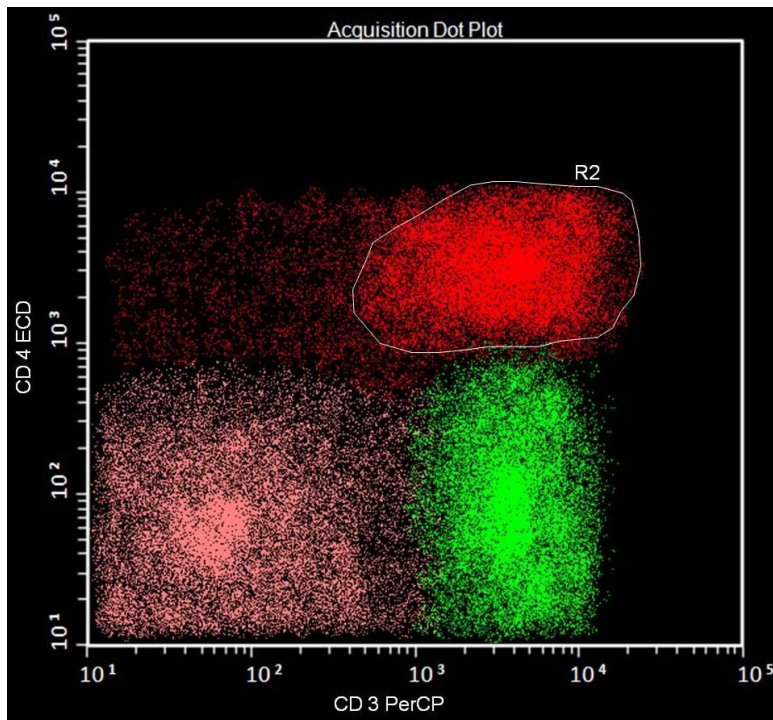


Abbildung 8: Darstellung der Zellen aus der Region R1 der Abbildung 7. Region R2 zeigt die CD3 und CD4 positiven Lymphozyten.

3 Ergebnisse

3.1 Zusammenfassung

Wir untersuchten die Expression von CD27 auf reaktiven CD4 T-Zellen, welche nach der Stimulation mit Tuberkuloseantigenen Interferon-Gamma produzieren. CD27 spielt als Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der T-Zelldifferenzierung indem es kostimulatorische Signale für naive T-Zellen gibt. Außerdem ist CD27 ein Kostimulationsrezeptor, der vor allem auf naiven, noch nicht mit Antigen in Kontakt gewesenen, CD4 T-Zellen exprimiert wird. Die verminderte Expression von CD27 kann den Übergang einer naiven CD4 T-Zelle zu einer CD4 Memory T-Zelle anzeigen (66).

Es konnte gezeigt werden, dass humane CD4 T-Zellen, die mit dem Mtb-Antigen in Kontakt gewesen sind, den Kostimulationsrezeptor CD27 deutlich vermindert aufweisen. Patienten mit positiver Mtb-Kultur zeigten einen signifikant höheren Anteil an CD27 negativen PPD spezifischen CD4 T-Zellen im Vergleich mit latent infizierten Patienten. Die Ergebnisse konnten in einer verblindeten Zweitstudie bestätigt werden.

CD27 konnte somit erstmals als Surrogatmarker zur Unterscheidung zwischen latent und akut infizierten Patienten beschrieben werden.

Ergänzend wurden typische Chemokinmuster einer akuten pulmonalen TB-Infektion ermittelt. Eine Vorauswahl verschiedener Chemokine zeigte, dass IP-10 und MIP-1 α eine Unterscheidung zwischen akuter pulmonaler TB und gesunden Kontrollen ermöglichen. Patienten mit einer akuten pulmonalen TB zeigten nach der Stimulation mit PPD und ESAT-6 einen signifikant höheren Anteil des Chemokins IP-10 in den Überständen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Auch MIP-1 α zeigte bei Patienten mit einer akuten pulmonalen TB nach der Stimulation mit PPD einen höheren Anteil in den Überständen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (nicht signifikant). Nach der Stimulation mit ESAT-6 konnten die Patienten mittels MIP-1 α jedoch nicht von den Kontrollen differenziert werden.

3.2 Phänotypisierung PPD spezifischer CD4 T-Zellen

Zur Differenzierung der T-Zellen wurden Oberflächenmarker benutzt, die für die jeweiligen Stadien der T-Zelldifferenzierung typisch sind. Das Charakteristikum der T-Zellen ist der TCR mit dem der Oberflächenmarker CD3 assoziiert ist. CD4 wird auch auf Monozyten exprimiert. Allerdings mit geringerer Dichte als auf CD4 positiven T-Zellen.

CD28 wird von 60-80 % der CD3 positiven T-Zellen exprimiert. 95 % der CD4 T-Zellen tragen dieses Antigen, während nur 50 % der CD8 T-Zellen CD28 positiv sind. CD28 spielt eine wichtige Rolle in der Adhäsion zwischen T- und B-Zellen über seinen Liganden CD80 und CD86.

Die Koexpression von CD4 und CD45 RA Antigenen ermöglicht die Identifizierung der naiven Subpopulation von CD4 T-Lymphozyten. Ruhende T-Zellen exprimieren den Homing-Rezeptor CD62L (L-Selektin), der die Zirkulation der T-Zellen durch die Lymphknoten vermittelt.

3.3 Expression des Oberflächenmarkers CD27 auf Tuberkulin spezifischen CD4 T-Zellen

In der Abbildung 9 wird die Expression von klassischen Markern der T-Zelldifferenzierung (67;68) auf PPD reaktiven CD4 T-Zellen bei einem Patienten mit Abstrich und/oder Kultur positiver LTB (akute TB) gezeigt.

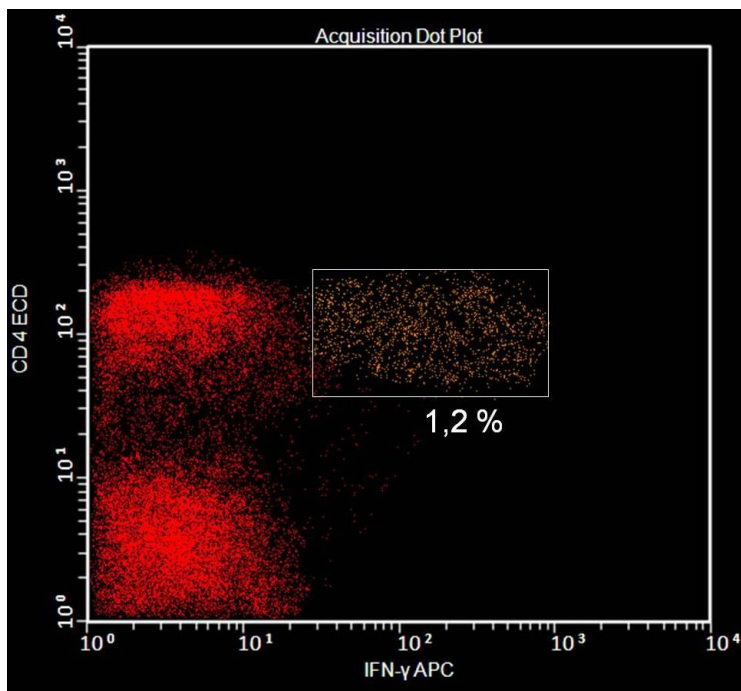


Abbildung 9: Die Abbildung zeigt die Expression von Interferon-Gamma der CD4 positiven T-Zellen eines Tuberkulosepatienten nach Stimulation mit PPD.

Die Expression des Kostimulationsrezeptors CD27 ist in Abbildung 10 dargestellt (grün hervorgehobene Events).

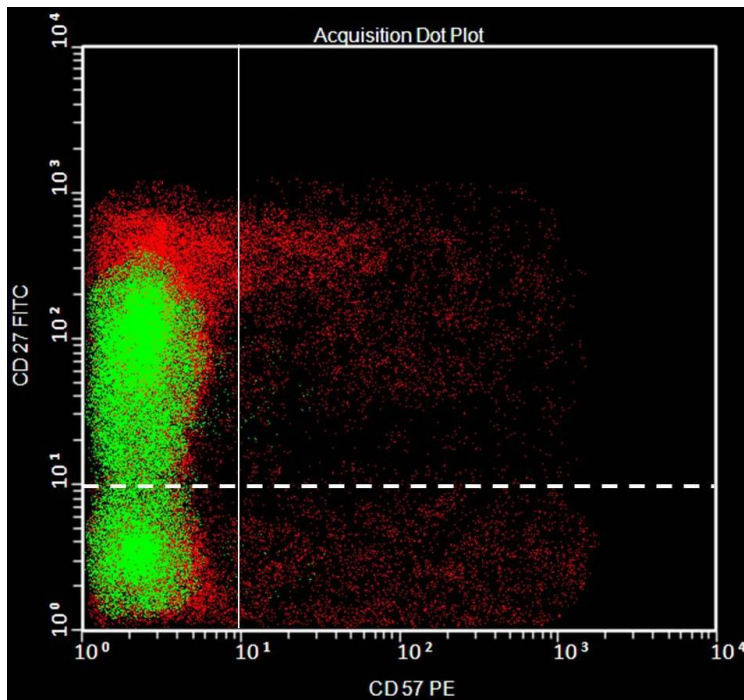


Abbildung 10: Die Abbildung zeigt nur die CD4 positiven T-Zellen. Tuberkulin reaktive, Interferon-Gamma produzierende CD4 T-Zellen sind grün hervorgehoben. Die horizontale unterbrochene Linie zeigt die Grenze die für die CD27 Positivität gesetzt wurde.

Wie weiter oben beschrieben, ist CD27 ein Rezeptor, der auf der T-Zelloberfläche exprimiert wird und als Kostimulationsrezeptor dient. Dieser Rezeptor wird herabreguliert, wenn sich T-Zellen von naiven, nicht mit Antigen in Kontakt gewesenen T-Zellen zum endlichen Memory Stadium entwickeln.

Der Phänotyp der Tuberkulin reaktiven CD4 T-Zellen (TH1-Zellen) war ähnlich wie in der Kontrollgruppe (BCG geimpft) mit der Ausnahme, dass der Prozentsatz der CD27 negativen, Tuberkulin reaktiven CD4 T-Zellen bei den Patienten mit aktiver TB deutlich höher war. Tabelle 4 zeigt eine Auflistung der in die Initialstudie eingeschlossenen Patienten mit den gemessenen reaktiven CD4 T-Zellzahlen und IFN- γ Level nach Stimulation mit PPD und ESAT-6.

				Stimulation mit PPD (10 µg/ml)		Stimulation mit ESAT-6 (20 µg Peptid pro ml)	
Zuordnung	Code	Alter (Jahre)	Geschlecht	CD4 T- Zellen (%)	IFN- γ (IU)	CD4 T- Zellen (%)	IFN- γ (IU)
<i>Patienten mit offener LTB (n = 6)</i>							
1	G.	60	m	0,7060	-	-	-
1	P38	75	w	0,4935	2,39	0,3356	0,00
1	P40	23	w	0,3556	5,57	0,2259	0,07
1	P51	79	w	0,9007	7,50	0,0296	0,006
1	P52	51	m	0,3318	9,57	0,4087	2,04
1	P59	79	w	1,8718	4,78	4,9134	1,62
<i>latent infiziert (n = 5)</i>							
8	K.	35	w	-	0,76	-	-
8	L2	33	m	1,3316	0,17	0,1403	-
8	L4	40	w	0,1567	0,71	0,0660	-
8	K15	69	m	2,5146	-	0,0851	-
8	K16	57	w	0,3504	-	0,0224	-

hochgradig exponiert (n = 10)							
7	K1	48	w	0,1545	-	0,2904	-
7	K2	35	m	0,7412	-	0,1102	-
7	K3	35	w	0,0959	-	0,0199	-
7	K5	48	m	0,0981	-	0,0977	-
7	K7	32	w	0,1032	-	0,1362	-
7	K9	59	m	0,1983	-	0,0811	-
7	K12	31	w	0,6601	0,11	0,0848	0,00
7	K13	39	w	0,4150	1,28	0,000	0,00
7	K14	44	w	0,3359	0,05	0,1556	0,009
7	K18	57	w	0,28480	3,27	0,3998	0,22
nicht exponiert (n = 6)							
6	U.	41	w	0,1150	1,69	-	-
6	C.	37	w	0,2517	-	-	-
6	Ga.	34	w	0,3686	6,80	-	-
6	Ch.	58	w	-	-	-	-
6	Chr.	25	w	-	-	-	-
6	F.	25	w	-	-	-	-

Tabelle 4: In die Initialstudie eingeschlossene Patienten

In der folgenden Abbildung 11 werden die Ergebnisse der initialen Studie gezeigt. Auf der X-Achse sind die eingeschlossenen Probanden in Gruppen dargestellt. N gibt die Anzahl der Probanden in der jeweiligen Gruppe an. Auf der Y-Achse ist die Prozentzahl der CD27 negativen PPD reaktiven CD4 T-Zellen dargestellt.

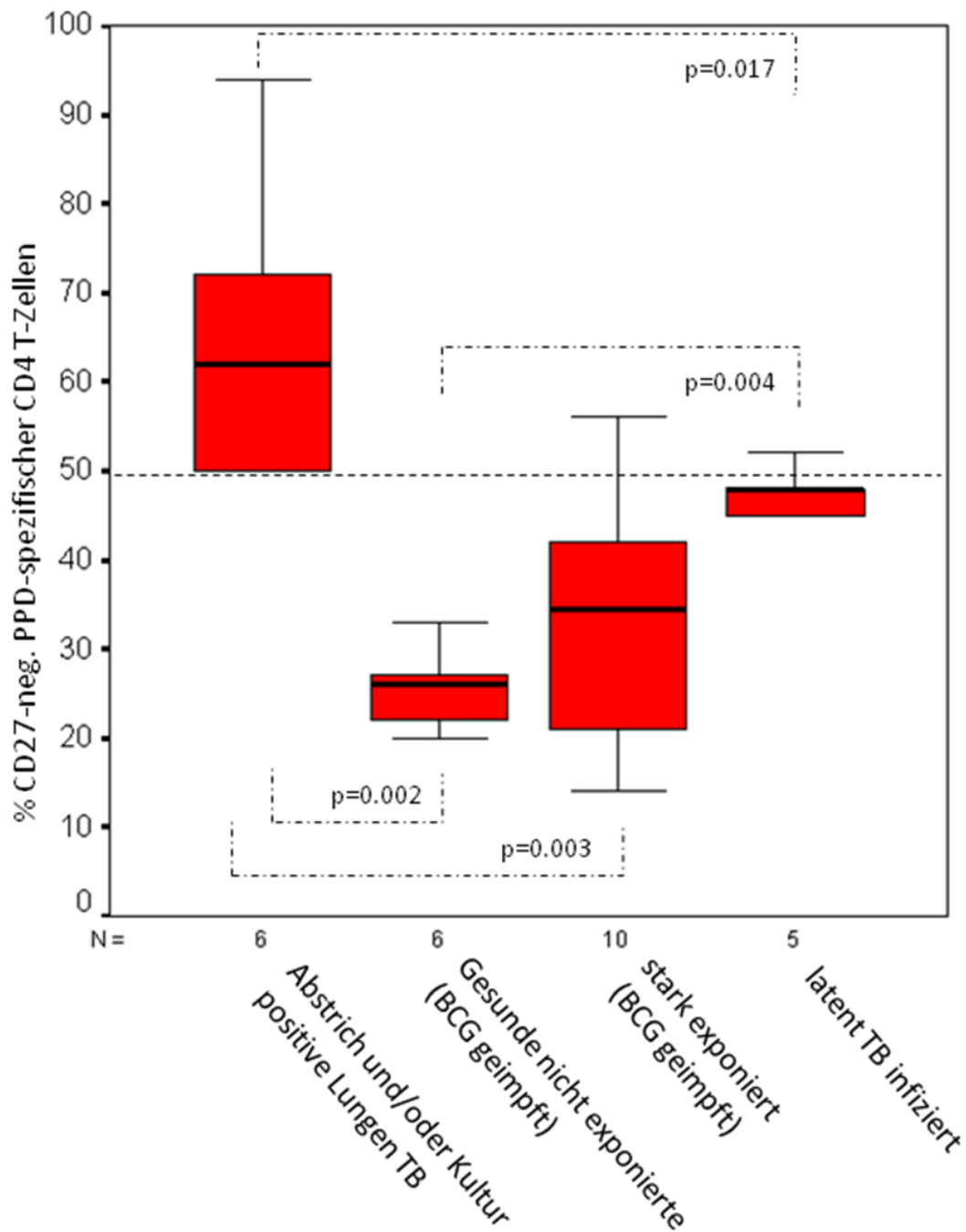


Abbildung 11: Graphische Darstellung (Box-Plots) der Ergebnisse der initialen Studie: Von links nach rechts: Abstrich und/oder Kultur positive LTB (n=6), Gesunde nicht exponierte BCG geimpfte (n=6), stark exponierte BCG geimpfte (n=10), latent mit TB infizierte (n=5). Die Y-Achse zeigt die Prozentzahl der CD27 negativen PPD spezifischen CD4 positiven T-Zellen an.

Patienten mit Abstrich und/oder Kultur positiver LTB können zuverlässig ($p=0,017$) von latent infizierten Patienten unterschieden werden. Besonders deutlich ist die Unterscheidung zwischen Patienten mit Abstrich und/oder Kultur positiver LTB und gesunden nicht exponierten Personen (BCG geimpfte) ($p=0,002$). Interessant ist die Erkenntnis, dass stark exponierte Probanden mit einer hohen Signifikanz ($p=0,003$) von den Patienten mit Abstrich und/oder Kultur positiver LTB unterschieden werden können.

Um eine bessere statistische Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu erhalten, zeigen die in Abbildung 11 dargestellten Boxplots nur die Prozentzahlen auf, die auf den CD4 T-Zellen basieren, die mehr als 50 IFN- γ Events aufweisen (Median 479 Zellen). Die Receiver-Operating-Characteristics (ROC)-Analyse identifizierte einen Schwellenwert von 49 % (Prozentzahl der CD27 negativen / IFN- γ -positiven Tuberkulin reaktiven CD4 T-Zellen). Dieser Schwellenwert ermöglicht die beste Unterscheidung zwischen Patienten und Kontrollen (Sensitivität = 100 %, Spezifität = 85,7 %, positiver prädiktiver Wert = 100 %, negativer prädiktiver Wert = 94 %).

Die Prozentzahl der CD27 exprimierenden TB spezifischen CD4 T-Zellen scheint umgekehrt proportional der steigenden TB-Exposition zu sein. Dabei sind die Prozentzahlen der CD27 positiven T-Zellen sehr hoch in nicht exponierten Individuen, mittelgradig bei latent mit TB infizierten und niedrig in Abstrich und/oder Kultur positiven TB-Patienten. Erwähnenswert ist, dass es keine Korrelation zwischen der Reaktivität auf Tuberkulin (in Prozent der reaktiven Zellen oder IFN- γ Levels in den Überständen) und der Verteilung der CD27-negativen Zellen gab.

3.4 Expression des Oberflächenmarkers CD27 auf Tuberkulin spezifischen CD4 T-Zellen – verblindete Zweitstudie

Um die Möglichkeit der Diagnose der akuten TB basierend auf der Expression des Korezeptors CD27 auf TB spezifischen CD4 T-Helferzellen zu bestätigen, führten wir eine zweite, prospektive und verblindete Studie durch.

Um den Einfluss der klinischen Diagnose auf die Probenanalyse zu vermindern (z.B. die abgrenzende Trennung zwischen CD27 positiven und CD27 negativen Zellen) und damit die Objektivität zu erhöhen, wurden in dieser zweiten Studie die Probenmaterialien im Krankenhaus, aus dem wir die Blutproben für die Analysen erhielten, durch eine Nummer codiert. Klinische Informationen wurden dem Labor nicht mitgeteilt bis die Ergebnisse in schriftlicher Form vorlagen und der Klinik übermittelt wurden. Anschließend erfolgte die Decodierung der Proben durch einen Verantwortlichen der Klinik.

In diese verblindete Studie wurden Patienten mit pulmonaler TB eingeschlossen, die sich innerhalb von 2 Monaten nach Beginn einer TB Therapie (n = 22, frische TB) oder in der Zeit der Nachsorge innerhalb eines Jahres (+/- 1 Monat) nach Beginn der Therapie (n = 9, Nachsorge) befanden.

Diese wurden unterteilt in:

- Gruppe I: Abstrich und/oder Kultur positive LTB (n = 12)
- Gruppe II: Abstrich und Kultur negative LTB (n = 10)
- Gruppe III: LTB die ein Jahr behandelt wurde (n = 9)
- Gruppe IV: Patienten mit anderen Lungen- oder kardiovaskulären Beschwerden (n = 20)

Falls der THT, der bei den meisten der Kontrollpatienten durchgeführt wurde, ein positives Testergebnis (mehr als 5 mm Hautinduration) ergab, war dies ein Ausschlusskriterium (n = 3). Tabelle 5 zeigt die Auflistung der in die Blindstudie eingeschlossenen Patienten mit den entsprechend gemessenen reaktiven CD4 T-Zellzahlen und IFN- γ Level nach Stimulation mit PPD und ESAT-6.

Zuordnung ^a	Code	Alter (Jahre)	Geschlecht	TST (mm)	Stimulation mit PPD (10 µg/ml)		Stimulation mit ESAT-6 (20 µg Peptid pro ml)	
					CD4 T- Zellen (%) ^b	IFN- γ (IU) ^c	CD4 T- Zellen (%) ^b	IFN- γ (IU) ^c
Patienten mit Abstrich und/oder Kultur positiver LTB (n = 12)								
1	B1	45	m	6	0,1430	4,90	0,0158	0,15
1	B3	81	w	10	0,2962	1,33	0,0000	-
1	B11	32	m	-	0,1833	3,77	0,0066	0,00
1	B12	50	w	10	0,1298	4,00	0,0029	0,00
1	B33	31	w	-	0,0143	0,69	0,0010	0,00
1	B48	66	m	-	0,0740	1,42	0,0005	0,00
1	B49	14	m	< 5	0,1031	10,59	0,0007	0,00
1	B52	71	m	< 5	0,1374	1,10	0,0143	0,21
1	B61	28	m	-	0,1411	9,03	0,0494	1,46
1	B75	75	w	35	0,3035	10,23	-	1,00
1	B76	95	m	-	1,2005	4,08	0,0121	0,01
1	B77	28	w	5	0,8713	44,79	0,0439	1,83
Patienten mit Abstrich und Kultur negativer LTB (n = 10)								
3	B21	35	w	20	0,1405	1,99	0,0023	0,00

2	B29	69	m	< 5	0,0012	0,00	0,0013	0,00
2	B40	50	m	10	0,3424	12,89	0,0003	0,00
2	B42	41	m	28	0,1359	5,86	0,0005	0,00
4	B46	71	m	30	0,5766	13,37	0,0360	0,69
2	B47	66	m	< 5	0,0200	0,04	0,0043	0,00
2	B59	64	m	< 5	0,0926	0,43	0,0012	0,00
2	B65	74	m	-	0,0034	0,00	0,0049	0,00
2	B70	70	w	< 5	0,0026	0,03	0,0016	0,00
2	B73	15	m	10	0,0145	0,00	0,0046	0,00
Patienten mit LTB ein Jahr nach Beginn der Therapie (n = 9)								
2	B7	21	m	12	0,1996	6,59	0,0209	0,41
1	B22	50	w	-	0,3246	16,66	0,0023	0,12
1	B27	58	m	16	0,2539	7,79	0,0018	0,00
1	B43	76	w	12	0,7997	3,23	0,0049	0,01
1	B51	36	m	-	0,0221	-	0,0222	-
1	B56	61	w	< 5	0,0417	0,24	0,0178	0,15
1	B57	60	m	< 5	0,0788	2,18	0,0006	0,00
1	B58	37	w	25	0,0308	2,41	0,0252	0,26
1	B60	49	m	5	0,0764	2,59	0,0009	0,00
Kontrollpatienten (n = 17)								

6	B8	44	w	< 5	0,0151	0,00	0,0039	0,00
6	B10	58	m	< 5	0,0471	0,00	0,0161	0,00
6	B15	71	m	< 5	0,0252	0,01	0,0001	-
6	B16	55	w	-	0,0022	0,02	-	0,00
6	B17	40	m	< 5	0,1161	1,00	0,0030	0,00
6	B18	65	w	-	0,0613	0,25	0,0121	-
6	B23	70	m	< 5	0,2552	2,55	0,0060	0,00
6	B24	42	m	< 5	0,0273	0,02	0,0046	0,00
6	B25	76	w	< 5	0,0255	0,00	0,0012	0,00
6	B26	69	w	-	0,0086	0,00	0,0000	7,12
6	B28	64	m	< 5	0,0078	0,23	0,0007	0,00
6	B35	48	m	< 5	0,0058	0,27	0,0013	0,00
6	B36	58	m	-	0,0088	0,16	0,0063	0,00
6	B39	47	m	< 5	0,3653	6,06	0,0040	0,72
6	B41	43	m	< 5	0,0019	0,18	0,0005	0,00
6	B44	73	m	-	0,1972	0,50	0,0243	0,13
6	B55	54	m	< 5	0,035	0,01	0,0017	0,00

Tabelle 5: Eingeschlossene Patienten in der Blindstudie: ^a Zur Diagnose führende Untersuchung: 1 = positive Kultur und/oder positiver mikroskopischer Nachweis, 2 = Nachweis von Mykobakterien in der Biopsie, 3 = Unter Therapie, 4 = positiver Lungenröntgenbefund, TST > 15 mm, positive Antwort auf ESAT-6. ^b Ergebnisse, die mehr als einen positiven Event pro 10000 Zellen aufweisen wurden als positiv gewertet und sind Fett hervorgehoben. ^c Einige dieser Ergebnisse überschreiten die Grenze von 0,35 IU, welche für den QuantiFERON Gold Test (Cellestis) als Grenzwert für ein positives Testergebnis definiert ist.

Die verblindete Studie bestätigte die Ergebnisse der ersten Studie (Abbildung 12). Patienten mit Abstrich und/oder Kultur positiven LTB konnten leicht von den Kontrollen (BCG geimpft) unterschieden werden ($p=0,000$), aber auch von den Patienten die eine Abstrich und Kultur negative TB (Gruppe II) hatten ($p=0,000$). Bei Verwendung einer Grenze von 48 % (definiert durch die ROC-Analyse) oberhalb derer die Fälle mit Abstrich und/oder Kultur positiven LTB diagnostiziert werden können, liegt die Sensitivität und die Spezifität bei 100 % ($p=0,000$ in beiden Fällen, Chiquadrat Test). Auch der positive und negative prädiktive Wert sind bei 100 %. Bei Verwendung der durch die erste Studie ermittelten Grenze von 49 %, wäre nur ein falsch negativer Befund pro Vergleichsgruppe entstanden. Zwischen den Gruppen II, III und IV war ein Vergleich nicht möglich. Die Tabelle 6 zeigt eine Aufstellung der Ergebnisse.

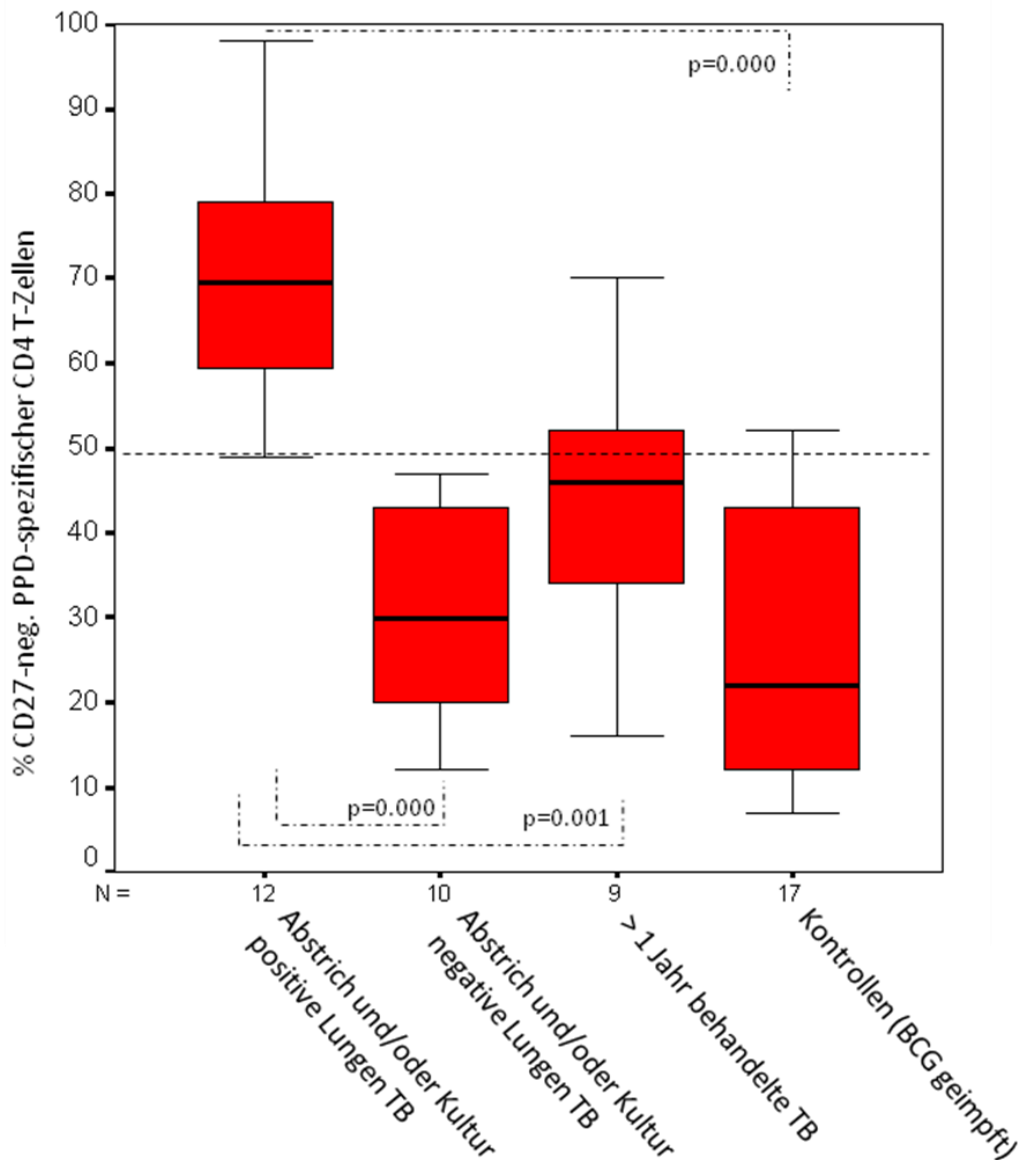


Abbildung 12: Graphische Darstellung (Box-Plots) der Ergebnisse der Blindstudie: Von links nach rechts: Abstrich und /oder Kultur positive LTB (n=12), Abstrich und/oder Kultur negative LTB (n=10) Patienten, die mehr als ein Jahr aufgrund einer LTB behandelt worden sind (n=9), BCG geimpfte Kontrollen (n=17). Die Y-Achse zeigt die Prozentzahl an CD27 negativen PPD spezifischen CD4 positiven T-Zellen.

Gruppe	CD27 negative, PPD reaktive CD4 T-Zellen		Gesamt
	< 48 %	> 48 %	
I	0	11	11
II	6	0	6
III	3	3	6
IV	8	0	8
Gesamt	17	14	31

Tabelle 6: Kreuztabelle der Ergebnisse der Blindstudie. Alle Probanden der Gruppe I (Abstrich und/oder Kultur positive LTB (n = 11)) haben mehr als 48 % CD27 negative, PPD reaktive CD4 T-Zellen. In Gruppe II (Abstrich und Kultur negative LTB (n = 6)) haben alle Probanden weniger als 48 % CD27 negative, PPD reaktive CD4 T-Zellen. In Gruppe III (LTB die ein Jahr behandelt wurde (n = 6)) haben 3 mehr und 3 weniger als 48 % CD27 negative, PPD reaktive CD4 T-Zellen. In Gruppe IV (Kontrollen (n = 8)) haben alle Probanden weniger als 48 % CD27 negative, PPD reaktive CD4 T-Zellen.

Abbildung 13 zeigt die Korrelation zwischen den Prozentzahlen der CD27 negativen IFN- γ produzierenden CD4 T-Zellen im Vergleich nach PPD und ESAT-6 Stimulation.

ESAT-6/PPD Phänotyp Korrelation

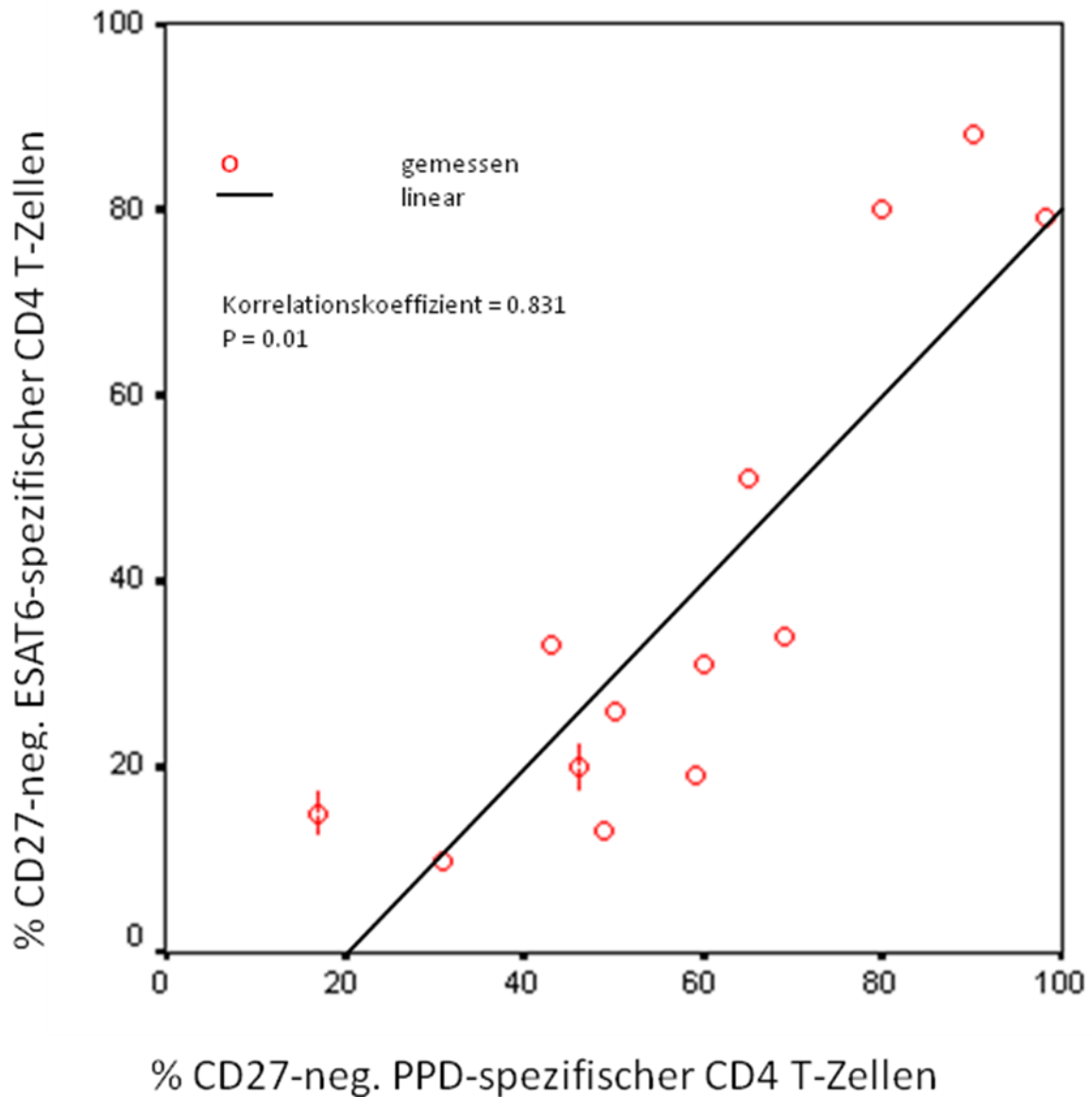


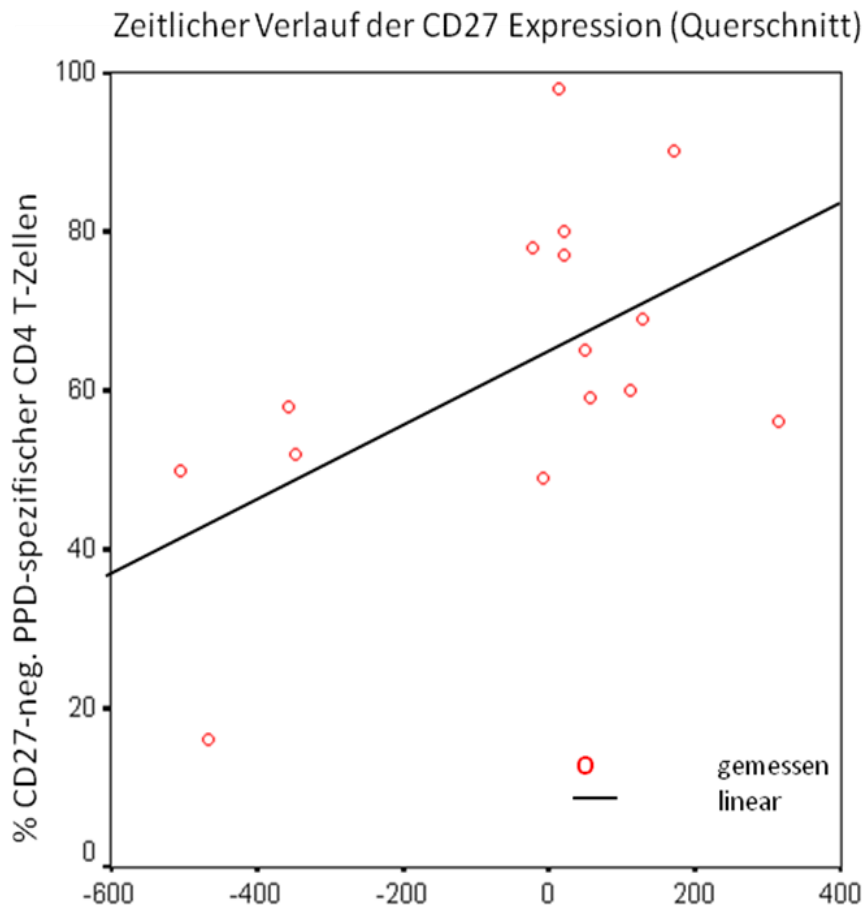
Abbildung 13: Korrelation der ESAT-6 und PPD spezifischen CD4 T-Zellen. Die verminderte CD27 Expression auf PPD und ESAT-6 spezifischen CD4 T-Zellen zeigt eine gute Korrelation.

Im Rahmen der Untersuchungen bemerkten wir, dass der prozentuale Anteil der PPD spezifischen T-Helferzellen, die den Oberflächen Rezeptor CD27 nicht exprimieren (ein Zustand der mit fortgeschrittener T-Zell Differenzierung assoziiert ist) deutlich zwischen den Individuen (Patienten und gesunde Kontrollen) variiert. Die Werte reichen von weniger als 5 % bis zu mehr als 95 %.

3.5 Veränderungen der Expression von Oberflächenmarkern treten bei behandelten Patienten sehr langsam auf

In Gruppe III haben 3 von 4 Patienten mit initialem Abstrich und/oder Kultur positiver LTB etwa 50 Prozent CD27 negativer Tuberkulin reaktiver CD4 T-Zellen. Auch nach einem Jahr der Therapie ist die CD27 Expression nicht wieder auf dem normalen Niveau, obwohl das Intervall zwischen dem Abnahmedatum der analysierten Blutproben und dem der letzten positiven Sputumprobe (Kultur und/oder Mikroskopie) bei jedem Patienten mit der Prozentzahl der CD27 negativen Tuberkulin reaktiven CD4 T-Zellen korreliert (0,562, $p=0,029$) (Abbildung 14).

Um diese Erkenntnisse zu bekräftigen, wurden zusätzliche Proben von Patienten aus der Lungenklinik Lostau mit Abstrich und/oder Kultur positiven LTB angefordert und auf dieselbe Art und Weise wie in der Blindstudie analysiert. Es wurden 7 Proben von den Zeitpunkten zwischen 9 Wochen und einem Jahr nach der ersten Probe entnommen. Die Analyse der 7 Proben zeigte, wie zu erwarten war, dass die CD27 Expression auf PPD reaktiven CD4 T-Zellen sehr stabil in der Zeit der gemessenen Behandlungsintervalle bis zu einem Jahr war.



Intervall zwischen dem Datum der Entnahme der analysierten Blutproben und Datum der Entnahme der letzten positiven Sputumprobe (Tage)

Abbildung 14: Die CD27 Expression auf PPD reaktiven CD4 T-Zellen nimmt sehr langsam ab. Die CD27 Expression auf PPD reaktiven CD4 T-Zellen wurde gegen die Länge des Intervalls zwischen dem Datum der Entnahme der analysierten Blutproben und dem Datum der Entnahme der letzten positiven Sputumprobe (alle Daten stammen aus der Blindstudie) aufgetragen. Die negativen Werte zeigen, dass das Sputum bereits Abstrich und Kultur negativ war als die PPD reaktiven CD4 T-Zellen analysiert wurden. Die positiven Werte zeigen, dass die Sputumproben anhaltend positiv sind und dies im Untersuchungszeitraum bleiben.

3.6 Die Zytokine IP-10 und MIP-1 α können Patienten mit einer Abstrich und/oder Kultur positiven LTB von gesunden Kontrollen unterscheiden

Das Chemokin IP-10 kann nach Stimulation mit PPD Patienten mit akuter pulmonaler TB signifikant von gesunden Kontrollen unterscheiden ($p=0,001$) (siehe Abbildung 15). Werden die Proben mit ESAT-6 stimuliert (siehe Abbildung 16) ist ebenfalls eine signifikante Differenzierung der Patienten von den Kontrollen möglich ($p=0,015$).

Auch das Chemokin MIP-1 α kann nach Stimulation mit PPD die Patienten mit einer akuten pulmonalen TB von den Kontrollen unterscheiden ($p=0,063$), jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 15). Nach der Stimulation mit ESAT-6 hingegen ermöglicht der Expressionsgrad des Chemokins MIP-1 α keine Differenzierung von Patienten und gesunden Kontrollen.

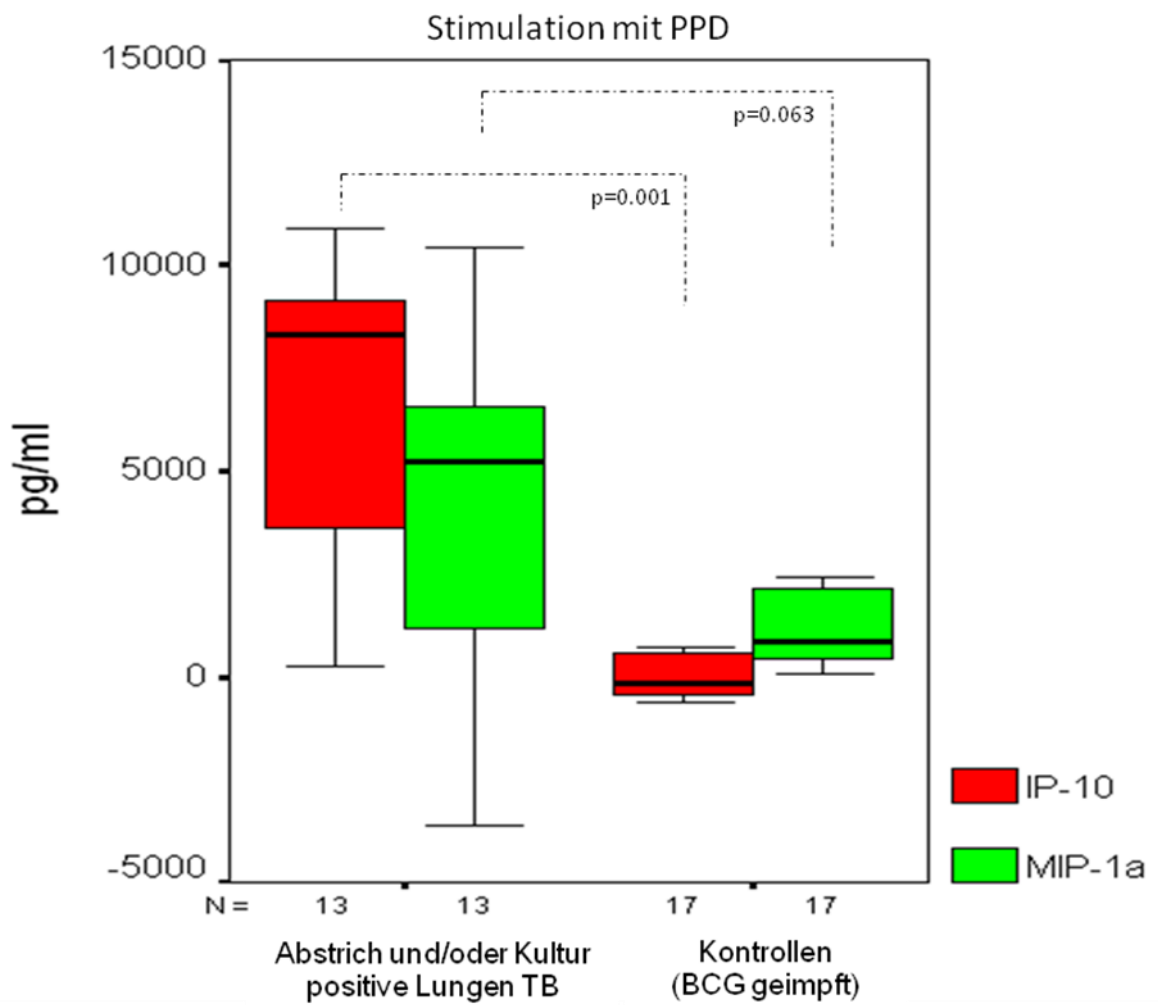


Abbildung 15: IP-10 und MIP-1 α Level in den Überständen nach der Stimulation mit PPD.

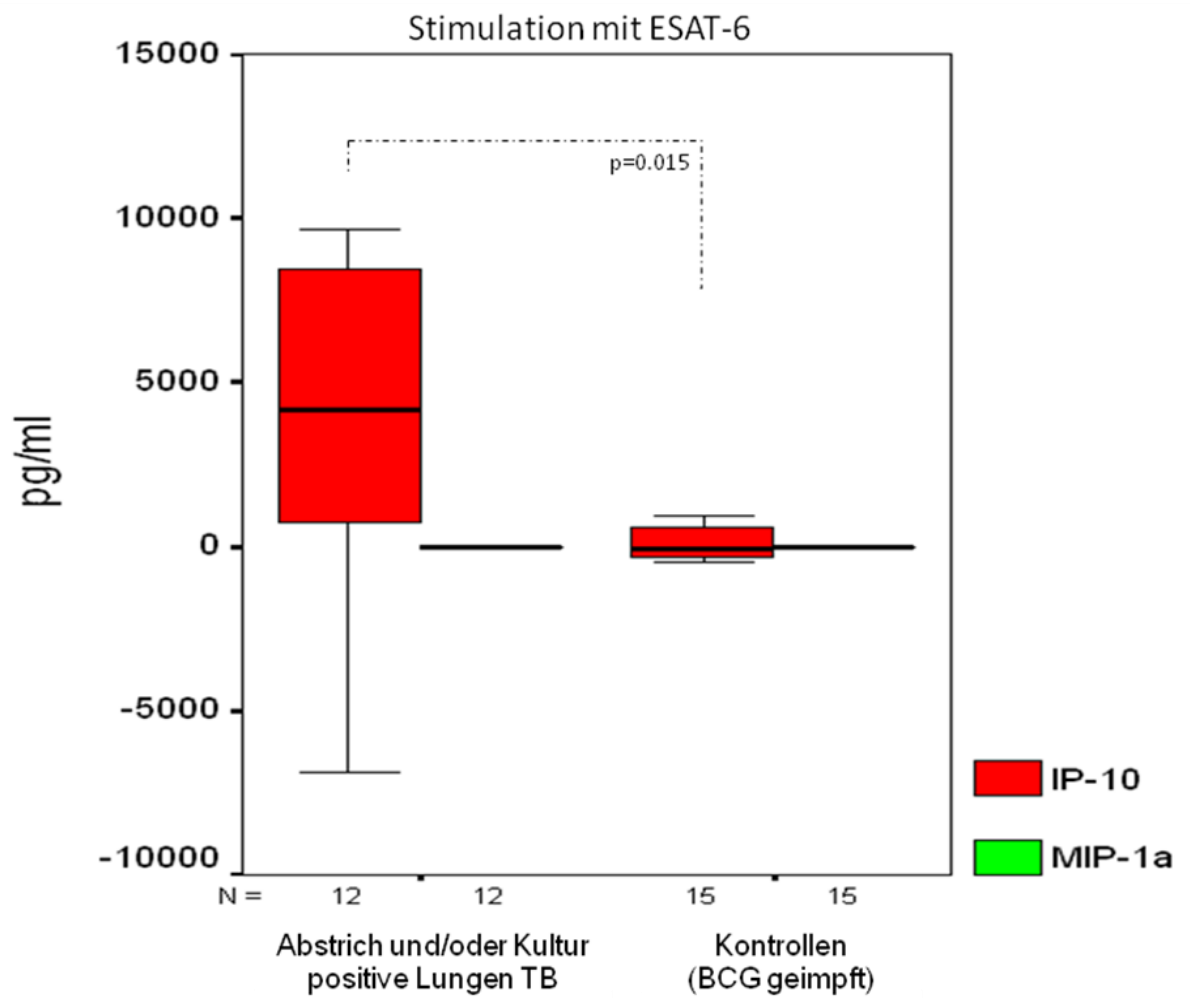


Abbildung 16: IP-10 und MIP-1 α Level in den Überständen bei der Stimulation mit ESAT-6.

4 Diskussion

Mit Hilfe der Kurzzeit *in vivo* Peptidstimulation konnten wir zeigen, dass akut an TB erkrankte Patienten mit einer hohen Sensitivität und Spezifität von latent infizierten Patienten unterschieden werden können. Der Vorteil der Peptidstimulation liegt in der leichten Durchführbarkeit und dem Vorliegen der Ergebnisse nach einer relativ kurzen Zeit.

Durch Messung von Chemokinen in den Überständen konnten bestimmte Muster ermittelt werden, die eine Unterscheidung von Patienten mit akuter pulmonaler TB und gesunden Kontrollen ermöglichen.

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die Ergebnisse der methodischen Arbeiten diskutiert. Anschließend werden einzelne Aspekte der komplexen T-Zell-Antwort gegen Mtb eingehender beleuchtet sowie deren klinische Implikationen diskutiert.

4.1 Diskussion der Methodik zur Isolation, Stimulation und Identifikation der T-Zellen

4.1.1 Präparation und Isolierung von PBMC

Als 1998 *Suni* und Mitarbeiter die Verwendung von Vollblut zur Stimulation von Zellen beschrieben, ging man von einer deutlichen Vereinfachung und Beschleunigung der Peptidstimulation aus (69). Man konnte auf die aufwendige und zeitintensive Isolierung von PBMC verzichten, zumal *Suni et al.* zeigen konnten, dass die T-Zell-Antwort-Frequenzen bei der Stimulation von Vollblut leicht höher ausfielen als bei der Stimulation von isolierten PBMCs.

Dies erklärten *Suni et al.* mit dem physiologischeren Milieu von Vollblut im Gegensatz

zum PBMC. Die Verwendung von Vollblut ist allerdings mit einigen Problemen verbunden. Die Präparation und Isolation von PBMCs zur Durchführung von Zellstimulationen ist bei weitem schwieriger und zeitaufwendiger als die Verwendung von Vollblut. Außerdem gibt es auch aus immunologischer Sicht Nachteile. Bei der Immunreaktion werden Antigene nicht im Vollblut den T-Zellen präsentiert sondern in sekundären lymphatischen Organen und peripheren Geweben. Bestandteile, die sich neben den T-Zellen im peripheren Blut befinden (Proteasen und andere Proteine) können die Antigenaufnahme und Präsentation stören und somit die Messungen verfälschen. Durch die Verwendung von PBMCs können diese Störfaktoren weitgehend unterbunden werden.

Zudem ist die Standardisierung von Zellzahlen im Vollblut weitaus schwieriger zu realisieren als in PBMCs. In Anbetracht dieser Vorteile der PBMCs haben wir uns für die Verwendung dieser entschieden.

4.1.2 Antigenstimulation

Die Antigen-spezifische T-Zell Stimulation mit anschließender intrazellulärer Färbung, die von uns im Rahmen der Versuche verwendet wurde, ist erstmalig im Jahre 1995 von *Picker* und Mitarbeitern vorgestellt worden. Mit dieser Methode war es erstmals möglich, Antigen-spezifische T-Zellen nach einer *ex vivo* Kurzzeitstimulation (6 - 8 h) durch gleichzeitige Färbung von Oberflächenmarkern und intrazellulären Zytokinen mit Hilfe der Methode der Durchflusszytometrie zu charakterisieren und zu quantifizieren (70). Durch die Färbung des Effektorzytokins IFN- γ konnte eine Reaktion auf bestimmte Antigene nachgewiesen werden.

Bei unseren Versuchen haben wir die Stimulation der aus dem peripheren Vollblut isolierten Zellen (PBMC) mit PPD und ESAT-6 durchgeführt.

Kritisch zu sehen ist hierbei, dass eine Stimulation mit PPD unspezifisch für eine TB-

Infektion ist. Die Immunreaktion, die bei der Stimulation mit PPD hervorgerufen wird, kann nicht unterscheiden zwischen einer Infektion mit dem Mtb, einer BCG Impfung oder der Exposition gegenüber anderen Mykobakterien (*Mycobacterium bovis*). Aus diesem Grund haben wir zur Stimulation zusätzlich das weitaus spezifischere ESAT-6 eingesetzt. ESAT-6 zeigt keine Immunreaktion bei einer BCG Impfung oder der Exposition gegenüber anderen Mykobakterien (71).

Neben diesen Vorteilen hat ESAT-6 allerdings einen entscheidenden Nachteil. Die Immunreaktion die durch ESAT-6 hervorgerufen wird, ist für die Diagnose einer aktiven TB-Infektion nicht geeignet. Dieser Nachteil wurde bereits in vorhergehenden wissenschaftlichen Veröffentlichungen über Patienten mit akuter TB und Kontrollen z.B. in Brasilien und Gambia beschrieben (65;72).

Es ist bekannt, dass ESAT-6 Antworten bei der latenten TB höher sind als bei der aktiven TB oder den Kontrollen. Dazu ist zu erwähnen, dass die ESAT-6 Reaktivitäten normalerweise in epidemiologischen Studien gemessen werden, um latente TB-Infektionen zu entdecken, und nicht, um die akute TB zu diagnostizieren (73;74).

4.1.3 Identifizierung der T-Zell Subpopulation

Während die antigenabhängige T-Zelldifferenzierung in den vergangenen Jahren den Schwerpunkt der Tuberkuloseforschung darstellte (67;68;75), schenkte man den verschiedenen Mustern der T-Zelldifferenzierung (Oberflächenmarker wie z. B. CD27), die bei einer Infektion mit dem Mtb auftreten, wenig Beachtung.

Bei der TB scheint die Annäherung an die verschiedenen Muster der T-Zelldifferenzierung sehr interessant zu sein. Besonders in einer BCG geimpften Population, in der eine Immunantwort auf Tuberkulin keine sichere Diagnose einer Infektion mit dem Bakterium darstellt.

CD4 T-Zellen nehmen eine zentrale Rolle in der initialen Abwehr einer TB-Infektion ein,

wohingegen CD8 T-Zellen anscheinend eher in der Kontrolle der Erkrankung von Bedeutung sind (8). Aus diesem Grund haben wir uns in unseren Versuchen ausschließlich mit CD4 T-Zellen und deren Differenzierungsmuster im Rahmen einer TB-Infektion beschäftigt. Zur Identifizierung der T-Zell Subpopulation verwendeten wir IFN- γ . Andere Gruppen wählten für die Identifikation der antigenspezifischen CD4 T-Zellen CD154 (CD44L) als Aktivierungsmarker (76;77). Sie begründen die Verwendung von CD154 mit der Unabhängigkeit der Ergebnisse von der Zytokinproduktion der T-Zellen im Vergleich zur IFN- γ Methode. Gleichwohl konnten beide Methoden identische Ergebnisse erbringen. Somit scheinen beide Methoden trotz der Kritikpunkte vergleichbar und durchaus anwendbar in der klinischen Praxis zu sein.

Naive T-Zellen gelangen mit Hilfe des secondary lymphoid tissue chemokine (SLC) ins Lymphgewebe. Dieses wird von Gefäßendothelien, Stromazellen und APZ im lymphatischen Gewebe exprimiert und bindet an die CCR-Chemokinrezeptoren auf naiven T-Zellen. CCR7 ist ein Rezeptor, der eine Aussage über die Homingfähigkeit (Wanderungsfähigkeit) von CD4-T Zellen gibt. Auf nahezu allen Tuberkulin-reaktiven CD4 T-Zellen konnten wir eine geringe CCR7 und hohe CD28 Expression erkennen. Das Fehlen der Homingmarker CCR7 und CD62L aber das gleichzeitige Vorhandensein des Kostimulatorischen Moleküls CD28 weist darauf hin, dass es sich bei den von uns gemessenen CD4 T-Zellen um naive, noch nicht homingfähige, jedoch bereits aktivierte (CD28+) T-Zellen handelt.

Der direkte Kontakt von T-Lymphozyten aus der BAL mit freien Mykobakterien könnte eine wichtige Rolle bei der Triggerung und Unterhaltung der T-Zelldifferenzierung sein (78). Dies könnte durch AM, die über Toll-Like-Rezeptoren oder verwandte Signalwege gesteuert werden, erfolgen (32;79;80). Aus den vorliegenden Patientendaten kann zudem vermutet werden, dass die Prozentzahl der CD27 exprimierenden, PPD reaktiven CD4 T-Zellen abhängig von der Dauer der Exposition des bronchoalveolären lymphatischen System mit dem Antigen ist.

Es muss durch weitere Versuche geklärt werden, ob der Anteil der CD27 negativen CD4 T-Zellen durch das Abwandern dieser Zellen an den Ort der Infektion, meist die Lungen, bedingt ist.

4.2 T-Zell-Spezifizierung mittels Oberflächenmarkern zur Differenzierung von Tuberkulosepatienten

In unseren Studien zeigte sich, dass die T-Zellen, die in einer Kurzzeit *ex vivo* Stimulation mit PPD oder ESAT-6 stimuliert worden sind, mit der Produktion von IFN- γ , TNF- α oder IL-2 reagieren. Zudem ergaben sich starke Überlappungen in der Zytokinproduktion und die T-Zellen waren mehrheitlich CD4 positiv. Aus diesem Grund haben wir uns auf diese T-Zellen sowie die IFN- γ Produktion konzentriert.

In einer wissenschaftlichen Arbeit aus dem Jahre 2004 wurde in einem Mausmodell gezeigt, dass aus der Lunge isolierte CD27 negative T-Lymphozyten nach der Stimulation mit PPD mehr INF- γ produzieren als CD27 positive T-Lymphozyten (66). Da diese T-Zellen aus der Lunge isoliert worden sind, sind diese Ergebnisse nicht direkt auf unsere Arbeit (Messung im peripheren Blut) übertragbar, aber sie zeigen, dass der Rezeptor CD27 eine wichtige Rolle bei der Immunreaktion gegen das Mtb spielt.

Diese Erkenntnisse konnten wir bei unseren Versuchen bestätigen. Somit scheinen die in dem Mausmodell beobachteten Immunreaktionen auf den Menschen übertragbar zu sein. Bei Abstrich und oder/oder Kultur positiver TB haben mehr als die Hälfte der PPD reaktiven, IFN- γ produzierenden CD4 T-Zellen den Oberflächenmarker CD27 verloren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die CD27 Expression auf *ex vivo* für kurze Zeit stimulierten PPD spezifischen CD4 T-Zellen ein geeigneter Biomarker für die aktive pulmonale TB ist (81).

J. Jiang et al. konnten 2010 diese Ergebnisse bestätigen (76). Sie untersuchten insgesamt 42 Patienten mit einer LTB (Kultur positiv) ebenfalls auf Vorhandensein des Oberflächenmarkers CD27. Dabei zeigten sie, dass CD4 positive T-Zellen bei Patienten mit Kultur positiver LTB signifikant weniger CD27 exprimieren als die T-Zellen PPD positiver Kontrollpatienten. Die anschließende Regressionsanalyse der CD27 exprimierenden CD4 positiven T-Zellen zeigte, dass eine geringe Prozentzahl von CD27 positiven T-Zellen mit einer persistierenden aktiven TB signifikant korreliert.

Diese Daten untermauern unsere Hypothese, dass die CD27 Expression auf CD4

positiven T-Zellen als immunologischer Marker für die persistierende aktive TB verwendet werden kann. Die Tatsache, dass wir keinen höheren Anteil an CD27 negativen PPD reaktiven CD4 T-Zellen bei Abstrich und Kultur negativer TB als bei den Kontrollpatienten beobachtet haben, ist sehr interessant.

Eine Abstrich negative TB könnte sich aus einer TB entwickeln, die mal latent oder aktiv gewesen ist, so dass die Konversion der mehrheitlichen CD27 negativen Phänotypen erst mit der Zeit erworben wurde, bevor die aktive, Abstrich und Kultur negative TB diagnostiziert wird. Dies geschieht in der Regel als Erstdiagnose bei Röntgen-Thorax Aufnahmen im Rahmen andere Erkrankungen. Somit liegt die Erkrankung oft seit mehreren Jahren unentdeckt vor oder ist inaktiv.

Alle Patienten in dieser Gruppe (aktive, Abstrich und Kultur negative TB) hatten typische Befunde in den Thorax Aufnahmen, und 8 der 10 Patienten hatten positive Biopsieergebnisse. Bei zwei Patienten basierte die Diagnose auf einer Antwort auf die eingeleitete Therapie (Regredienz der Läsionen). Bei den anderen Patienten wurde die Krankheitsaktivität nicht untersucht. Der Phänotyp der PPD reaktiven T-Helferzellen war in der Kontrollgruppe und in der mit TB infizierten Gruppe gleich.

In unseren Versuchen nutzten wir die Tatsache aus, dass die BCG Impfung ein einzelner Stimulus ist und die T-Zelldifferenzierung nur limitiert anstößt. Nur eine wiederholte Exposition zum Mtb bewirkt eine weitere Differenzierung. Gerade diese, bei wiederholtem Kontakt zunehmende Differenzierung der T-Zellen, führt uns letztendlich zur Diagnose der TB.

Die Immunreaktion, die bei der BCG Impfung angestoßen wird, stellt dabei den ersten Schritt dar. Erst der wiederholte Kontakt zum Bakterium, aufbauend auf die Impfung, erbringt spezielle Muster, die ausgenutzt werden können um (latent) Infizierte zu entdecken. Da die BCG Impfung in den vielen Ländern nicht mehr angewendet wird, tritt der immunmodellierende Effekt der BCG Impfung mehr und mehr in den Hintergrund.

Das Ausmaß der T-Zell Differenzierung ist abhängig von den Umständen, die zur Infektion führen, der Länge und der Häufigkeit des Kontaktes, und auch der Effizienz der T-Zellantwort.

Es ist zu vermuten, dass diese Faktoren voneinander abhängig sind. Bei den 6 BCG geimpften, nicht exponierten Kontrollen, die in der Abbildung 11 in Abschnitt 3.3 gezeigt werden, übersteigt der Prozentsatz der CD27 negativen PPD reaktiven CD4 T-Zellen nicht die Marke von 35 Prozent. Dies könnte der Grad der Differenzierung sein, der allein durch die Antwort auf die BCG Impfung erreicht wird.

Die Abbildung 11 erweckt den Anschein, dass es bei Personen mit wiederholtem Kontakt zum Mtb zu einer höheren Differenzierung der T-Zellen kommt. Hoch exponierte Personen zeigen ähnliche Level an CD27 negativen PPD reaktiven CD4 T-Zellen wie sie bei latent Infizierten und der akuten Sputum und/oder Kultur positiven TB gefunden werden.

Es ist nicht bekannt, ob der einmalige Kontakt mit dem Mtb Komplex die lebenslange Aufrechterhaltung eines bestimmten Anteils an PPD reaktiven CD4 T-Zellen bewirkt. Unsere Daten lassen aber die Vermutung zu, dass es feine Unterschiede, abhängig vom Grad der Exposition zum Erreger gibt. Ein häufiger Kontakt bewirkt eine stärkere Differenzierung der T-Zellen.

Es könnte sein, dass ein kurzer Kontakt zum Mtb-Komplex für die Aufrechterhaltung eines Minimums an T-Zellantwort verantwortlich ist, wohingegen ein häufiger Kontakt (z.B. Krankenhauspersonal) die weitere Differenzierung der T - Zellen unterstützt.

4.3 Chemokinbestimmung zur Differenzierung zwischen akuter pulmonaler TB und gesunden Kontrollen

Mittels IP-10 und MIP-1 α ist eine Unterscheidung zwischen akuter pulmonaler TB und gesunden Kontrollen möglich. Bereits frühere Veröffentlichung konnten zeigen, dass die aktive TB mit erhöhter IP-10 Expression einhergeht und somit ein geeigneter Biomarker für die TB-Infektion darstellt (82-84).

Ruhwald et al. konnten eine signifikante Differenzierung von akuter pulmonaler TB und

gesunden Kontrollen nachweisen (85). Die Versuche wurden allerdings im Plasma von Vollblut und nicht, wie in unseren Versuchen, mit PBMCs durchgeführt. Die Tatsache dass Vollblut verwendet wurde macht diese Methodik natürlich für die Anwendung im klinischen Alltag deutlich einfacher im Vergleich zur etwas aufwendigeren Isolation der PBMCs, hat jedoch auch methodische Nachteile wie bereits in Abschnitt 4.1.1 diskutiert.

Wir untersuchten zudem, ob eine Unterscheidung zwischen latenter und akuter TB möglich ist. Eine Unterscheidung war weder mittels IP-10 noch mittels MIP-1 α möglich (Ergebnisse hier nicht aufgeführt). Dies wurde auch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt (84). Die IP-10 Spiegel von aktiven und latent infizierten Patienten waren hier erhöht, eine Unterscheidung nach Stimulation mit ESAT-6 war allerdings nicht möglich. Somit stellt sich die Frage der klinischen Relevanz im Vergleich zu den Interferon- γ basierenden etablierten Testsystemen. Allerdings scheinen bei Immunkompromittierten (z.B. HIV-Patienten) die auf Interferon- γ basierenden Tests unzuverlässig zu sein, da die Interferon- γ Produktion wohl mit der Anzahl der CD4 T-Zellen korreliert (86). Hier ist eventuell ein Vorteil von IP-10 im Vergleich zu den gängigen Interferon- γ basierenden Tests zu sehen. Eine Multicenter Studie konnte diese ersten Ergebnisse untermauern (87).

Die Chemokinuntersuchungen der Gruppe um *Ruhwald et al.* (85) lassen vermuten, dass das Chemokin MIP-1 α nach Stimulation mit ESAT-6 als nicht relevant für die weiteren Untersuchungen erachtet wurde. In einer Vorauswahl von 25 Chemokinen wurde MIP-1 α lediglich erwähnt. Auch unsere Untersuchungen von MIP-1 α nach Stimulation mit ESAT-6 konnten keine signifikanten Ergebnisse zeigen.

4.4 Relevanz von CD27 für die klinische Anwendung

Die Expression von CD27 auf mit Antigen stimulierten CD4 T-Zellen könnte für die Überwachung von Patienten, die latent mit dem Mtb infiziert sind, hilfreich sein. Im Gegensatz zu den akut mit TB infizierten Patienten ist bei den latent infizierten Patienten und Kontrollpersonen der Phänotyp der Tuberkulin-reaktiven CD4 T-Zellen informativer als die quantitative Messung der T-Zell Reaktivität oder die Spezifität auf bestimmte Zielproteine.

Mit unseren Erkenntnissen könnte es in der Zukunft möglich sein, eine neue, schnelle und verlässliche immunologische Nachweismethode, basierend auf der Verteilung der CD27 Expression auf spezifischen CD4 T-Zellen im peripheren Blut zu etablieren. Damit kann eine Abstrich und/oder Kultur positive LTB diagnostiziert werden und von den latent mit TB infizierten Patienten differenziert werden.

Vor allem die Tatsache, dass ein möglicher Test in einer mit BCG geimpften Population anwendbar ist, stellt einen großen Vorteil dar. Der Test wäre sehr einfach und würde in der täglichen Routine vor allem dann eine große Hilfe sein, wenn z.B. Sputumproben schwer zu bekommen oder der Sputumabstrich negativ ist, obwohl eine akute Infektion vorliegt.

Desweiteren könnte ein solcher Test auch dabei helfen, unnötige Krankenhausaufenthalte und aufwendige Isolation von Patienten mit dem Verdacht einer TB zu vermeiden, und somit einen wichtigen Beitrag zur Entlastung der öffentlichen Gesundheitskassen leisten.

Weitere Studien und Versuche sind notwendig, um diese ersten Ergebnisse zu bestätigen.

4.5 Ausblick

Seit der Entdeckung des Erregers der TB beschäftigen sich Wissenschaftler mit der Erforschung des Infektionswegs, den Abläufen bei der Immunreaktion und den Möglichkeiten der Prävention durch Diagnostik und Therapie. Auch nach fast 130 Jahren der intensiven Forschung ist es bis heute nicht gelungen, die immunologischen Abläufe in allen Einzelheiten zu verstehen.

Gerade in Zeiten der Globalisierung stellt die TB eine leider wieder wachsende Bedrohung für das Gesundheitssystem dar. Durch die zunehmende Migration kommt es zum einen zur Verbreitung des Erregers, zum anderen erschweren neu auftretende Antibiotikaresistenzen die Therapie.

Aufgrund oben genannter Problematik wird es immer wichtiger, die TB früh zu erkennen um sie effektiv behandeln zu können. Wir konnten in unserer Arbeit erstmals CD27 als Surrogatmarker zur Unterscheidung zwischen latent und akut infizierten Patienten beschreiben. Sowohl die Identifizierung von bestimmten Oberflächenmarkern (CD27), als auch die im Rahmen der Infektion freigesetzten Chemokine (IP-10), stellen bei der Differenzierung von latent und akut infizierten Patienten wichtige Ansatzpunkte dar. Zur Bestätigung unserer Ergebnisse sind weitere Studien (multizentrische) mit mehr Fallzahlen notwendig um diese Marker als relevant für den klinischen Alltag zu testen.

Zudem könnten Untersuchungen sowohl an Lungengewebe als auch an BAL-Flüssigkeit ergänzenden Aufschluss über die immunologischen Vorgänge der CD4 T-Zellmigration liefern. Andere Arbeitsgruppen konnten bereits am Mausmodell zeigen, dass vor allem die CD27 (low) CD4 T-Zellen während einer akuten TB-Infektion in der Lunge, dem Ort der Entzündung, akkumulieren. Zudem weisen sie eine hohe Fähigkeit zur Produktion von IFN-Gamma auf, was auf einen hohen Differenzierungsgrad und auf eine effektive Infektionsabwehr hindeutet (88).

Aufbauend auf unsere Ergebnisse könnte es in Zukunft gelingen, ein neues Testverfahren zu entwickeln, und so auf dem Weg zur Bekämpfung der TB einen Schritt voran zu kommen.

4.6 Literaturliste

- (1) Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med* 2006; 100(11):1862-1870.
- (2) Taylor GM, Murphy E, Hopkins R, Rutland P, Chistov Y. First report of *Mycobacterium bovis* DNA in human remains from the Iron Age. *Microbiology* 2007; 153(Pt 4):1243-1249.
- (3) Zink AR, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1):359-367.
- (4) JOHANN LUKAS SCHOENLEIN, 1793-1864. *Triangle* 1964; 26:173.
- (5) Grange JM, Bishop PJ. 'Uber tuberkulose'. A tribute to Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Tubercle* 1982; 63(1):3-17.
- (6) Barksdale L, Kim KS. *Mycobacterium*. *Bacteriol Rev* 1977; 41(1):217-372.
- (7) Tuberculosis. 2011. Janice Carr, Centers for Disease Control and Prevention.
- (8) Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* 2001; 1(1):20-30.
- (9) Jick SS, Lieberman ES, Rahman MU, Choi HK. Glucocorticoid use, other associated factors, and the risk of tuberculosis. *Arthritis Rheum* 2006; 55(1):19-26.
- (10) Pfeil A, Gajda M, Kaiser WA, Hansch A. [Miliary tuberculosis during therapy with a tumor necrosis factor blocker--modern therapy, an old problem]. *Rofo* 2008; 180(11):1002-1003.
- (11) *Epidemiologisches Bulletin* 11/2011. 2011. Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
- (12) Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing. 2011. WHO Report 2009.
- (13) Eisenberg R, Amorosa JK. The discoverer of x-rays: Wilhelm Conrad Roentgen. *N J Med* 1995; 92(11):723-724.
- (14) Daniel L, Garbe L, Fuentes P, Thomas P. [Pulmonary Wegener's disease mimicking tuberculosis]. *Ann Pathol* 1997; 17(5):350-353.

- (15) Tostmann A, Kik SV, Kalisvaart NA, Sebek MM, Verver S, Boeree MJ et al. Tuberculosis transmission by patients with smear-negative pulmonary tuberculosis in a large cohort in the Netherlands. *Clin Infect Dis* 2008; 47(9):1135-1142.
- (16) Kalsdorf B, Strassburg A, Greinert U, Lotz J, Lange C. [Clinical features and diagnosis of tuberculosis]. *Pneumologie* 2008; 62(5):284-294.
- (17) Charron DJ, Lotteau V. MHC proteins and MHC peptide interactions. *Immunol Ser* 1993; 59:63-84.
- (18) Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6(11):1123-1132.
- (19) Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441(7090):235-238.
- (20) Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441(7090):231-234.
- (21) Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003; 171(12):6323-6327.
- (22) Hocking WG, Golde DW. The pulmonary-alveolar macrophage (first of two parts). *N Engl J Med* 1979; 301(11):580-587.
- (23) Hocking WG, Golde DW. The pulmonary-alveolar macrophage (second of two parts). *N Engl J Med* 1979; 301(12):639-645.
- (24) Kuo HP, Ho TC, Wang CH, Yu CT, Lin HC. Increased production of hydrogen peroxide and expression of CD11b/CD18 on alveolar macrophages in patients with active pulmonary tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 1996; 77(5):468-475.
- (25) Rich EA, Torres M, Sada E, Finegan CK, Hamilton BD, Toossi Z. Mycobacterium tuberculosis (MTB)-stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. *Tuber Lung Dis* 1997; 78(5-6):247-255.
- (26) Wang CH, Liu CY, Lin HC, Yu CT, Chung KF, Kuo HP. Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. *Eur Respir J* 1998; 11(4):809-815.
- (27) Granulom. Pathologie online. 2011.

- (28) Quesniaux V, Fremond C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yeremeev V et al. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect* 2004; 6(10):946-959.
- (29) Iho S, Yamamoto T, Takahashi T, Yamamoto S. Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequences with internal 5'-CpG-3' act directly on human NK and activated T cells to induce IFN-gamma production in vitro. *J Immunol* 1999; 163(7):3642-3652.
- (30) Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, Ishii KJ, Takeshita S, Gursel M et al. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol* 2001; 167(7):3555-3558.
- (31) Means TK, Lien E, Yoshimura A, Wang S, Golenbock DT, Fenton MJ. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol* 1999; 163(12):6748-6755.
- (32) Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1999; 163(7):3920-3927.
- (33) Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1(2):135-145.
- (34) Armstrong JA, Hart PD. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med* 1975; 142(1):1-16.
- (35) Le C, V, Cols C, Maridonneau-Parini I. Nonopsonic phagocytosis of zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infect Immun* 2000; 68(8):4736-4745.
- (36) Gatfield J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 2000; 288(5471):1647-1650.
- (37) Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:93-129.
- (38) Losana G, Rigamonti L, Borghi I, Assenzio B, Ariotti S, Jouanguy E et al. Requirement for both IL-12 and IFN-gamma signaling pathways in optimal IFN-gamma production by human T cells. *Eur J Immunol* 2002; 32(3):693-700.

- (39) Kaufmann SH, Schaible UE. A dangerous liaison between two major killers: Mycobacterium tuberculosis and HIV target dendritic cells through DC-SIGN. *J Exp Med* 2003; 197(1):1-5.
- (40) Tailleux L, Gicquel B, Neyrolles O. [DC-SIGN, a key receptor of Mycobacterium tuberculosis?]. *Med Sci (Paris)* 2003; 19(6-7):658-660.
- (41) Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A et al. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 2003; 197(1):121-127.
- (42) Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* 2003; 163(9):1009-1021.
- (43) Ulrichs T, Kaufmann SH. [Immunology of tuberculosis: impact on the development of novel vaccines]. *Internist (Berl)* 2003; 44(11):1374-1384.
- (44) Lens SM, Tesselaar K, van Oers MH, van Lier RA. Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions. *Semin Immunol* 1998; 10(6):491-499.
- (45) Martorell J, Rojo I, Vilella R, Martinez-Caceres E, Vives J. CD27 induction on thymocytes. *J Immunol* 1990; 145(5):1356-1363.
- (46) Maurer D, Holter W, Majdic O, Fischer GF, Knapp W. CD27 expression by a distinct subpopulation of human B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1990; 20(12):2679-2684.
- (47) Sugita K, Hirose T, Rothstein DM, Donahue C, Schlossman SF, Morimoto C. CD27, a member of the nerve growth factor receptor family, is preferentially expressed on CD45RA+ CD4 T cell clones and involved in distinct immunoregulatory functions. *J Immunol* 1992; 149(10):3208-3216.
- (48) Sugita K, Robertson MJ, Torimoto Y, Ritz J, Schlossman SF, Morimoto C. Participation of the CD27 antigen in the regulation of IL-2-activated human natural killer cells. *J Immunol* 1992; 149(4):1199-1203.
- (49) van Lier RA, Borst J, Vroom TM, Klein H, Van Mourik P, Zeijlemaker WP et al. Tissue distribution and biochemical and functional properties of Tp55 (CD27), a novel T cell differentiation antigen. *J Immunol* 1987; 139(5):1589-1596.
- (50) Camerini D, Walz G, Loenen WA, Borst J, Seed B. The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J Immunol* 1991; 147(9):3165-3169.
- (51) Agematsu K, Kobata T, Sugita K, Hirose T, Schlossman SF, Morimoto C. Direct

- cellular communications between CD45R0 and CD45RA T cell subsets via CD27/CD70. *J Immunol* 1995; 154(8):3627-3635.
- (52) Croft M. Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14(3-4):265-273.
- (53) Gobel TW, Bolliger L. Evolution of the T cell receptor signal transduction units. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 248:303-320.
- (54) Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283(1):R7-28.
- (55) Sadek MI, Sada E, Toossi Z, Schwander SK, Rich EA. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19(3):513-521.
- (56) Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 1990; 347(6294):669-671.
- (57) Rhoades ER, Cooper AM, Orme IM. Chemokine response in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63(10):3871-3877.
- (58) Saukkonen JJ, Bazydlo B, Thomas M, Strieter RM, Keane J, Kornfeld H. Beta-chemokines are induced by *Mycobacterium tuberculosis* and inhibit its growth. *Infect Immun* 2002; 70(4):1684-1693.
- (59) Kaplan G, Luster AD, Hancock G, Cohn ZA. The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J Exp Med* 1987; 166(4):1098-1108.
- (60) Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A et al. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* 1993; 177(6):1809-1814.
- (61) Badewa AP, Quinton LJ, Shellito JE, Mason CM. Chemokine receptor 5 and its ligands in the immune response to murine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2005; 85(3):185-195.
- (62) Kurashima K, Mukaida N, Fujimura M, Yasui M, Nakazumi Y, Matsuda T et al. Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155(4):1474-1477.
- (63) Ragno S, Romano M, Howell S, Pappin DJ, Jenner PJ, Colston MJ. Changes in

- gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Immunology* 2001; 104(1):99-108.
- (64) Cardoso FL, Antas PR, Milagres AS, Geluk A, Franken KL, Oliveira EB et al. T-cell responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 in Brazilian tuberculosis patients. *Infect Immun* 2002; 70(12):6707-6714.
- (65) Vekemans J, Lienhardt C, Sillah JS, Wheeler JG, Lahai GP, Doherty MT et al. Tuberculosis contacts but not patients have higher gamma interferon responses to ESAT-6 than do community controls in The Gambia. *Infect Immun* 2001; 69(10):6554-6557.
- (66) Lyadova IV, Oberdorf S, Kapina MA, Apt AS, Swain SL, Sayles PC. CD4 T cells producing IFN-gamma in the lungs of mice challenged with mycobacteria express a CD27-negative phenotype. *Clin Exp Immunol* 2004; 138(1):21-29.
- (67) Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* 1997; 186(9):1407-1418.
- (68) Wills MR, Okecha G, Weekes MP, Gandhi MK, Sissons PJ, Carmichael AJ. Identification of naive or antigen-experienced human CD8(+) T cells by expression of costimulation and chemokine receptors: analysis of the human cytomegalovirus-specific CD8(+) T cell response. *J Immunol* 2002; 168(11):5455-5464.
- (69) Suni MA, Picker LJ, Maino VC. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1998; 212(1):89-98.
- (70) Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, Treer JR, Waldrop SL, Bergstresser PR et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood* 1995; 86(4):1408-1419.
- (71) Pai M, Dheda K, Cunningham J, Scano F, O'Brien R. T-cell assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: moving the research agenda forward. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(6):428-438.
- (72) Antas PR, Cardoso FL, Pereira KC, Franken KL, Cunha KS, Klatser P et al. T cell immune responses to mycobacterial antigens in Brazilian tuberculosis patients and controls. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99(9):699-707.
- (73) Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Roversi P, Piro R, Meacci M et al. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Lancet* 2006; 367(9519):1328-

1334.

- (74) Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 2001; 357(9273):2017-2021.
- (75) Sallusto F, Langenkamp A, Geginat J, Lanzavecchia A. Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 251:167-171.
- (76) Jiang J, Wang X, Wang X, Cao Z, Liu Y, Dong M et al. Reduced CD27 expression on antigen-specific CD4+ T cells correlates with persistent active tuberculosis. *J Clin Immunol* 2010; 30(4):566-573.
- (77) Wang X, Cao Z, Jiang J, Niu H, Dong M, Tong A et al. Association of mycobacterial antigen-specific CD4(+) memory T cell subsets with outcome of pulmonary tuberculosis. *J Infect* 2010; 60(2):133-139.
- (78) Bienenstock J, McDermott MR. Bronchus- and nasal-associated lymphoid tissues. *Immunol Rev* 2005; 206:22-31.
- (79) Means TK, Jones BW, Schromm AB, Shurtleff BA, Smith JA, Keane J et al. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage responses. *J Immunol* 2001; 166(6):4074-4082.
- (80) Tjarnlund A, Guirado E, Julian E, Cardona PJ, Fernandez C. Determinant role for Toll-like receptor signalling in acute mycobacterial infection in the respiratory tract. *Microbes Infect* 2006; 8(7):1790-1800.
- (81) Streitz M, Tesfa L, Yildirim V, Yahyazadeh A, Ulrichs T, Lenkei R et al. Loss of receptor on tuberculin-reactive T-cells marks active pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE* 2007; 2(1):e735.
- (82) Azzurri A, Sow OY, Amedei A, Bah B, Diallo S, Peri G et al. IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbes Infect* 2005; 7(1):1-8.
- (83) Pokkali S, Das SD, R L. Expression of CXC and CC type of chemokines and its receptors in tuberculous and non-tuberculous effusions. *Cytokine* 2008; 41(3):307-314.
- (84) Whittaker E, Gordon A, Kampmann B. Is IP-10 a better biomarker for active and latent tuberculosis in children than IFN-gamma? *PLoS One* 2008; 3(12):e3901.

- (85) Ruhwald M, Bjerregaard-Andersen M, Rabna P, Kofoed K, Eugen-Olsen J, Ravn P. CXCL10/IP-10 release is induced by incubation of whole blood from tuberculosis patients with ESAT-6, CFP10 and TB7.7. *Microbes Infect* 2007; 9(7):806-812.
- (86) Brock I, Ruhwald M, Lundgren B, Westh H, Mathiesen LR, Ravn P. Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the M. tuberculosis specific interferon-gamma test. *Respir Res* 2006; 7:56.
- (87) Ruhwald M, Dominguez J, Latorre I, Losi M, Richeldi L, Pasticci MB et al. A multicentre evaluation of the accuracy and performance of IP-10 for the diagnosis of infection with M. tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2011; 91(3):260-267.
- (88) Kapina MA, Shepelkova GS, Mischenko VV, Sayles P, Bogacheva P, Winslow G et al. CD27^{low} CD4⁺ T lymphocytes that accumulate in the mouse lungs during mycobacterial infection differentiate from CD27^{high} precursors in situ, produce IFN-gamma, and protect the host against tuberculosis infection. *J Immunol* 2007; 178(2):976-985.

4.7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Kern, nicht nur für die Bereitstellung des interessanten Themas und der kompetenten Führung sowohl während der Forschungsarbeit als auch bei der Erstellung meiner schriftlichen Arbeit, sondern auch für die gute persönliche Betreuung und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen.

Danken möchte ich Herrn Professor Volk, Direktor des Instituts für Medizinische Immunologie, Charité, Campus Virchow-Klinikum, für die freundliche Erlaubnis zur Nutzung der Räumlichkeiten, Geräte und Materialien.

Einen nicht unerheblichen Anteil am Gelingen dieser Dissertation hatte Herr Mathias Streitz, dem ich herzlich danken möchte für die tatkräftige Unterstützung bei der Patientenrekrutierung, Diskussion histopathologischer Befunde sowie die freundliche Bereitstellung von einem Großteil der Daten der Blindstudie.

Darüber hinaus bedanke ich mich vielmals beim gesamten Labor der Medizinischen Immunologie der Charité. Ein stets angenehmes und freundliches Arbeitsklima durfte ich in der gesamten Abteilung der Medizinischen Immunologie der Charité erfahren. Hierfür danke ich auch den ärztlichen Kolleginnen und Kollegen, die mir jederzeit Einblick in aktuelle Krankenakten gewährt haben.

Insbesondere danke ich meiner Familie, meiner Ehefrau und ihrer Familie für die geduldige Unterstützung. Meiner Tochter danke ich für die aufbauenden Momente in der Schlussphase meiner Promotion. Sie alle haben für den seelischen Rückhalt und die moralische Unterstützung gesorgt, ohne die ich nie soweit gekommen wäre.

4.8 Lebenslauf

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

4.9 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Vedat Yildirim, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Phänotypisierung Mycobacterium tuberculosis spezifischer T-Zellen" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

20. April 2012

Vedat Yildirim