

AUS DEM FORSCHUNGSZENTRUM BORSTEL  
LEIBNIZ-ZENTRUM FÜR MEDIZIN UND BIOWISSENSCHAFTEN

Abteilung Immunologie und Zellbiologie  
Leitung Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus  
Laborgruppe Immuntherapie  
Leitung PD Dr. Sven Brandau

---

# **Modulation der Immunbiologie humaner dendritischer Zellen durch mykobakterielles mannosyliertes Lipoarabinomannan**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung der naturwissenschaftlichen Doktorwürde  
der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Lübeck

vorgelegt von  
Jessica Mittelstädt

Januar 2007

Datum der Abgabe: 19.01.2007  
Gutachter: Prof. Dr. G. Sczakiel  
PD Dr. S. Brandau  
Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2007

„Alles Gute, was geschieht, setzt das nächste in Bewegung.“

*(Johann Wolfgang von Goethe)*

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>07</b>
1.1.	Steuerung von Immunantworten durch dendritische Zellen	08
1.2.	Die Rolle myeloider Zellen in der mykobakteriellen Infektionsbiologie	14
1.3.	Die mykobakterielle Zellwand	16
1.4.	Interaktionen von Mykobakterien und dendritischen Zellen	19
1.5.	Fragestellung	21
<b>II.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
2.1.	Materialien	23
2.1.1.	Chemikalien und verwendete Substanzen	23
2.1.2.	Puffer, Lösungen und Kulturmedien	23
2.1.3.	Wachstumsfaktoren und Stimuli	24
2.1.4.	Kits	25
2.1.5.	cDNA-Microarrays	26
2.1.6.	Antikörper zur durchflusszytometrischen und funktionellen Analyse	26
2.1.7.	Verbrauchsmaterialien	27
2.1.8.	Geräte	27
2.2.	Methoden	28
2.2.1.	Immunologisch-Zellbiologische Methoden	28
2.2.1.1.	Isolation humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	28
2.2.1.2.	Isolation von Monozyten und Lymphozyten aus humanen MNC	29
2.2.1.3.	Isolation von Gesamt-T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation	29
2.2.1.4.	Isolation von naiven CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> -T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation	30
2.2.1.5.	Isolation von CD1c <sup>+</sup> dendritischen Zellen des peripheren Blutes mittels magnetischer Zellseparation	30
2.2.1.6.	Generierung konventioneller DC-SIGN <sup>pos</sup> dendritischer Zellen	31
2.2.1.7.	Generierung DC-SIGN <sup>neg</sup> dendritischer Zellen	32
2.2.1.8.	Stimulation dendritischer Zellen (DC-SIGN <sup>pos</sup> und DC-SIGN <sup>neg</sup> )	32
2.2.1.9.	Stimulation von CD1c <sup>+</sup> BDC	33
2.2.1.10.	Gemischte Lymphozytenreaktion	33

Inhaltsverzeichnis	Seite	
2.2.1.11.	Antigen-Präsentations-Assay	34
2.2.2.	Molekularbiologische Methoden	35
2.2.2.1.	RNA-Isolation	35
2.2.2.2.	Reverse Transkription und Synthese komplementärer DNA	36
2.2.2.3.	Polymerasekettenreaktion	36
2.2.2.4.	Quantitative PCR	37
2.2.2.5.	Agarose-Gelelektrophorese	38
2.2.2.6.	Analyse von Genregulationen mittels cDNA-Microarrays	39
2.2.3.	Biochemische Methoden	40
2.2.3.1.	Bestimmung der Konzentration von Chemokinen und Zytokinen mittels ELISA	40
2.2.3.1.1.	Konventioneller Sandwich-ELISA	40
2.2.3.1.2.	Multi-Zytokin-ELISA	41
2.2.3.2.	Immunfluoreszenzmarkierungen für die Durchflusszytometrie	42
2.2.3.3.	Färbung von Mykobakterien	42
2.2.3.4.	Analyse mykobakterieller Bindung an dendritische Zellen	43
<b>III.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>44</b>
3.1.	Mannosyliertes Lipoarabinomannan von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv als Immunmodulator	44
3.1.1.	Analyse des immunmodulatorischen Potenzials von mannosyliertem Lipoarabinomannan	44
3.1.2.	Die Rolle von mannosyliertem Lipoarabinomannan im Rahmen der LPS-induzierten Zytokinsekretion - ein Kostimulus	47
3.1.3.	Kostimulatorisches Potenzial von mannosyliertem Lipoarabinomannan im Rahmen TLR-abhängiger und TLR-unabhängiger Aktivierung dendritischer Zellen	50
3.1.4.	Das kostimulatorische Potenzial von mannosyliertem Lipoarabinomannan ist beschränkt auf DC-SIGN <sup>pos</sup> dendritische Zellen	52
3.1.4.1.	Immunphänotypische Analyse DC-SIGN <sup>pos</sup> und DC-SIGN <sup>neg</sup> dendritischer Zellen	52
3.1.4.2.	Analyse der Zytokinsekretion DC-SIGN <sup>pos</sup> und DC-SIGN <sup>neg</sup> dendritischer Zellen	55

Inhaltsverzeichnis	Seite	
3.1.5.	Einfluss von mannosyliertem Lipoarabinomannan auf die Aktivierung von T-Zellen	57
3.1.5.1.	Antigen-unabhängige T-Zell-Aktivierung	57
3.1.5.2.	Antigen-abhängige T-Zell-Aktivierung	60
3.1.5.3.	Mannosyliertes Lipoarabinomannan verschiebt das T-Zell-Zytokinprofil Richtung Th1	61
3.2.	Die Rolle von Zellwand-assoziiertem mannosyliertem Lipoarabinomannan im Rahmen der Interaktion von Mykobakterien mit dendritischen Zellen	64
3.2.1.	Die Rolle von Zellwand-assoziiertem mannosyliertem Lipoarabinomannan und DC-SIGN im Rahmen mykobakterieller Bindung an dendritische Zellen	65
3.2.2.	Einfluss der Interaktion von DC-SIGN und mannosyliertem Lipoarabinomannan auf das Zytokinprofil DC-SIGN <sup>pos</sup> dendritischer Zellen nach mykobakterieller Stimulation	67
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>72</b>
4.1.	Die Rolle von isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan aus <i>M. tuberculosis</i> H37Rv als Immunmodulator	72
4.1.1.	Die Bedeutung der Ligation des C-Typ-Lektin-Rezeptors DC-SIGN für die Modulation von Immunantworten dendritischer Zellen	72
4.1.2.	Die Aktivierung dendritischer Zellen in Gegenwart von mannosyliertem Lipoarabinomannan resultiert in einer Th1-Orientierung von T-Zell-Antworten	76
4.1.3.	Mannose-Rezeptor und DC-SIGN: Antagonistische Wirkung von C-Typ-Lektin-Rezeptoren auf TLR-Signale?	79
4.2.	Die Rolle von Zellwand-assoziiertem mannosyliertem Lipoarabinomannan im Rahmen der Interaktion von Mykobakterien mit dendritischen Zellen	82
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>86</b>
<b>VI.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>88</b>

---

<b>VII.</b>	<b>ANHANG</b>	102
7.1.	Abkürzungsverzeichnis	102
7.2.	Abbildungsverzeichnis	105
7.3.	Tabellenverzeichnis	106
7.4.	Veröffentlichungen	107
7.5.	Lebenslauf	109
7.6.	Danksagung	111
7.7.	Eidesstattliche Erklärung	113

## I. EINLEITUNG

Die Forschung auf dem Gebiet der Immunologie ist nicht nur unter dem Aspekt der wissenschaftlichen Grundlagenforschung von Relevanz, sondern auch von großer medizinischer Bedeutung. Der auf dem lateinischen Wort „*munire*“ = „schützen“ basierende Begriff Immunologie bedeutet die Lehre von den Vorgängen, die zur Abwehrreaktion gegen Fremdstoffe oder Fremdorganismen, beispielsweise Krankheitserreger, führen. Die betreffenden Vorgänge werden auf sowohl zellulärer und molekularer Ebene, als auch auf der Ebene von Organismen und Populationen betrachtet. Neben Fragen nach der Herkunft von Allergien, der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, stellt die Aufklärung der Abwehrmechanismen des Immunsystems gegen Infektionserreger, beispielsweise *Mycobacterium tuberculosis*, eine zentrale Aufgabe dar. Ziel ist es zu verstehen wie unser Immunsystem arbeitet, um dem Organismus Immunität gegenüber einer Infektion oder einem Fremdstoff zu verleihen. Welche Zellen sind an Immunreaktionen im Rahmen der Bekämpfung von Infektionen beteiligt und welche Aufgaben erfüllen diese? Immunität gegenüber einem Fremdstoff zu erlangen kann bei Säugetieren auf zwei Ebenen geschehen: im Rahmen der natürlichen, unspezifischen Immunität sowie der erworbenen, spezifischen Immunität, wobei beide Systeme eng zusammen arbeiten.

Bei der angeborenen oder natürlichen Immunität handelt es sich um eine unspezifische Abwehr von Krankheitserregern auf sowohl molekularer Ebene, zum Beispiel durch das Komplementsystem oder Akute-Phase-Proteine, als auch auf zellulärer Ebene, beispielsweise durch phagozytierende Zellen wie Makrophagen. Die Erkennung von Pathogenen anhand deren konservierter Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP) durch Antigen-präsentierende Zellen erfolgt über Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) (1). Neben phagozytischen Zellen stellen auch die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) eine wichtige Immunzellpopulation zur unspezifischen Abwehr von Fremdstoffen oder entarteten Zellen dar. NK-Zellen sind jedoch auch in der Lage körpereigene, entartete oder viral befallene Zellen effektiv zu lysieren (2). Die Zellen der angeborenen Immunität stellen nach Kontakt des Organismus mit einem Pathogen oder dessen Bestandteilen die erste Verteidigungslinie dar.

Neben der schnellen, unspezifischen Antwort ist parallel die Induktion spezifischer Immunantworten von essenzieller Bedeutung für die erfolgreiche Elimination von Pathogenen. Im Rahmen der erworbenen Immunität erfolgt eine spezifische Abwehrreaktion, wobei hier auf zellulärer Ebene T- und B-Zellen zu nennen sind. Nach heutigem Kenntnisstand stehen sich die angeborene Immunität und die spezifische Immunität nicht separiert gegenüber. Vielmehr ermöglicht erst die wechselseitige Beeinflussung, also eine komplexe Vernetzung, Interaktion und Kommunikation aller Zellen des Immunsystems, die Entwicklung hoch effizienter Strategien zur Bekämpfung von Pathogenen (3).

Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC) als professionell Antigen-präsentierende Zellen sind als essenzielles Bindeglied zwischen der angeborenen und der spezifischen Immunität anzusehen (4). Ihnen kommt eine zentrale Rolle im Rahmen der Initiierung und Polarisierung nachgeschalteter, adaptiver Immunantworten zu (5). In Folge ihrer Aktivierung können dendritische Zellen qualitativ unterschiedliche adaptive Immunantworten initiieren (6) oder auch auf NK-Zellen rückwirken (7). Auf diese einzigartige und seltene Immunzellsubpopulation soll daher im Folgenden näher eingegangen werden.

### 1.1. Steuerung von Immunantworten durch dendritische Zellen

Die erste Beschreibung humaner dendritischer Zellen geht auf die Entdeckung der Langerhanszellen, einer Subpopulation dendritischer Zellen in der Haut, im Jahre 1868 zurück. Namensgebend für die etwa 10 µm großen dendritischen Zellen sind ihre langen zytoplasmatischen Ausläufer, die Dendriten. Ein weiteres morphologisches Charakteristikum der Langerhanszellen stellen die Birbeck-Granula dar, denen eine entscheidende Rolle im Rahmen der Antigenaufnahme sowie -präsentation zuzuschreiben ist (8).

Nach der ersten Erwähnung der Langerhanszelle vergingen jedoch über 100 Jahre, bevor eine ausführliche Charakterisierung dendritischer Zellen beginnen konnte (9). Erst die Etablierung eines Protokolls zur Generierung dendritischer Zellen *in vitro* aus Monozyten als Vorläuferzellen ermöglichte letztendlich in den vergangenen 20 Jahren umfassende Studien zum Phänotyp sowie zur Funktionalität dieser Immunzellpopulation (10). Mit der Möglichkeit der Generierung dendritischer Zellen

wurde diese zuvor aufgrund geringer Ausbeuten nur schlecht analysierbare Immunzellpopulation besser verfügbar. Damit wurden dendritische Zellen nun auch phänotypischen Charakterisierungen sowie funktionellen Untersuchungen zugänglich. Dies erlaubte erste Einblicke zur Funktion dendritischer Zellen im Rahmen der Steuerung von Immunantworten.

Basierend auf bisherigen Kenntnissen ist zunächst festzuhalten, dass immunphänotypisch kein spezifisches Antigen für dendritische Zellen existiert. Dendritische Zellen stellen eine sehr heterogene Immunzellpopulation dar. *In vivo* gehen dendritische Zellen aus Knochenmarksvorläuferzellen hervor, wandern in die Peripherie und fungieren dort als Wächter des Immunsystems (11). In nahezu allen Geweben kommen dendritische Zellen in unterschiedlichen Anteilen vor (12, 13). Mit der unterschiedlichen Lokalisation dendritischer Zellen gehen morphologische, phänotypische und funktionelle Charakteristika dieser einher. Eine bestimmte dendritische Zelle ist erst anhand einer distinkten Zusammensetzung an Antigenen auf deren Oberfläche identifizierbar. Typischerweise exprimieren dendritische Zellen des peripheren Blutes zum Beispiel die Differenzierungsmarker (*cluster of differentiation, CD*) CD1a, CD11b/c sowie die Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex, MHC I/II*) und Fc-Rezeptoren, wohingegen Linienmarker wie CD3, CD14, CD19 und CD56 nicht exprimiert werden (14). Die differenzielle Expression von Antigenen durch dendritische Zellen ist sowohl gebunden an deren Subpopulation als auch an die gewebespezifische Lokalisation der dendritischen Zelle. Einige Antigene werden auch in Abhängigkeit des Reifungsstatus der dendritischen Zelle differenziell exprimiert, zum Beispiel CD1a, CD40, CD80, CD83, CD86 oder MHC (15). Somit handelt es sich bei dendritischen Zellen um eine sehr heterogene Leukozytenpopulation bezüglich Herkunftslinie und Differenzierungsweg. Daraus resultieren entsprechend vielfältige Implikationen bezüglich ihrer Funktionalität (16). Aktuell erfolgt die Einteilung dendritischer Zellen zunächst in zwei Hauptdifferenzierungslinien, denen eindeutige phänotypische sowie funktionelle Unterschiede zugeschrieben werden: dendritische Zellen myeloiden Ursprungs (mDC, DC1) und plasmazytoide dendritische Zellen (pDC, DC2), von denen ein lymphoider Ursprung angenommen wird (17, 18).

Plasmazytoide dendritische Zellen sind durch die Expression der Oberflächenmarker BDCA-2 und BDCA-4, CD4, CD45RA, CD123 sowie geringer Mengen von MHC II

und das Fehlen von CD11c gekennzeichnet (19). Initial wurde eine exklusive Expression von Toll-like-Rezeptor 7 (TLR-7) und TLR-9 (20, 21) durch plasmazytoide dendritische Zellen angenommen. Kürzlich konnte jedoch für myeloide dendritische Zellen die Expression von TLR-7 gezeigt werden (22). TLR-7 und TLR-9 dienen der Erkennung von Einzelstrangribonukleinsäure (*single strand ribonucleic acid*, ssRNA) beziehungsweise CpG-DNA-Motiven. Eine virale Stimulation plasmazytoider dendritischer Zellen führt zur Sekretion der Typ-I-Interferone IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  (23, 24). Die Sekretion von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  beeinflusst entscheidend den Verlauf von Infektionen durch Aktivierung dendritischer Zellen und die Regulation der Freisetzung anderer immunologisch bedeutsamer Zytokine, zum Beispiel Interleukin 12 (IL-12, (25)).

Myeloide dendritische Zellen exprimieren im Gegensatz zu plasmazytoiden dendritischen Zellen CD11c und CD33 sowie hohe Mengen an MHC II, nicht jedoch CD123. Das TLR-Repertoire myeloider dendritischer Zellen umfasst die Expression von TLR-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8 und -10 (22, 26, 27). Bezüglich der Zytokin-freisetzung stellen myeloide dendritische Zellen potente Produzenten von TNF- $\alpha$  und IL-12 dar. Über die Möglichkeit zur Produktion von IFN- $\alpha$  verfügen myeloide dendritische Zellen ebenfalls, wie kürzlich gezeigt werden konnte (22).

Als Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen (adaptiven) Immunität nehmen dendritische Zellen als professionell Antigen-präsentierende Zellen eine herausragende Position im Immunsystem ein. Mit der Aktivierung von B- beziehungsweise T-Zellen durch dendritische Zellen (Zytokine, Antigenpräsentation) geht die Initiierung adaptiver Immunantworten einher. Im Hinblick auf den Verlauf von Infektionen spielt die Aktivierung distinkter T-Zell-Subpopulationen, zum Beispiel CD8-positive (CD8<sup>+</sup>) zytotoxischer T-Zellen oder CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen (Th-Zellen), eine entscheidende Rolle. Die frühere Annahme, dass mit dem Ursprung der dendritischen Zelle eine bevorzugte Induktion von Antworten durch Th-Zellen einhergeht, ist mittlerweile revidiert. Ursprünglich wurde angenommen, dass myeloide dendritische Zellen bevorzugt Th1-orientierte Immunantworten induzieren und dass im Gegensatz dazu durch plasmazytoide dendritische Zellen bevorzugt Th2-orientierte Immunantworten induziert werden. Es konnte mittlerweile gezeigt werden, dass plasmazytoide dendritische Zellen zur parallelen Sekretion der Th1-Zytokine IFN- $\alpha/\beta$  als auch IL-12 befähigt sind (28).

Nach heutigem Kenntnisstand hat *in vivo* nicht maßgeblich die Herkunft der dendritischen Zellen sondern die Art und Dosis der aktivierenden Signale Einfluss auf die durch dendritische Zellen ausgelösten Immunantworten (29-31). *In vitro* haben zusätzlich die gewählten Differenzierungs- sowie Kulturbedingungen einen erheblichen Einfluss auf Phänotyp, Reifungsstadium und Funktion der betreffenden dendritischen Zellen (32-37). Auf die unterschiedlichen Möglichkeiten der Differenzierung und Kultivierung dendritischer Zellen soll daher an späterer Stelle genauer eingegangen werden.

Unreife dendritische Zellen patrouillieren als Wächter des Immunsystems im Organismus. Sie zeichnen sich durch eine hohe Fähigkeit zur Endozytose und Aktivierbarkeit durch diverse mikrobielle Stimuli, aktivierte T-Zellen oder Zytokine, sowie ein mäßiges lymphostimulatorisches Potenzial aus. Die Erkennung von Pathogenen oder deren Oberflächenstrukturen wie Lipopolysaccharid (LPS) aus Gram-negativen Bakterien oder mykobakteriellem Lipoarabinomannan (LAM) erfolgt mithilfe von Mustererkennungsrezeptoren, beispielsweise membranständigen Toll-like-Rezeptoren (38, 39) oder C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLR, 40, 41), als auch intrazellulären *nucleotide oligomerisation domain* (NOD)-Proteinen (42, 43). Dies führt in Abhängigkeit des jeweiligen Liganden zu einer Induktion pro-inflammatorischer Signalkaskaden (44), in deren Verlauf die zuvor unreife dendritische Zelle ausreift und befähigt wird, pro-inflammatorische Zytokine wie zum Beispiel IL-12 und TNF- $\alpha$  zu sekretieren. Die Reifung dendritischer Zellen ist weiterhin von einer Reduktion der Endozytosefähigkeit, Verlust an Aktivierbarkeit, sowie einer gesteigerten Expression der T-Zell-kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 begleitet, womit ein hohes lymphostimulatorisches Potenzial einhergeht (5, 11). Auch die Expression von Chemokinrezeptoren ändert sich (45), wodurch die Wanderung der dendritischen Zellen induziert und gesteuert wird. Reife dendritische Zellen sind in der Lage, inflammatorisches Gewebe zu verlassen um beispielsweise in T-Zell-Areale sekundärer lymphatischer Organe einzuwandern. Dort erfolgt die Aktivierung von T-Zellen durch die ausgereifte dendritische Zelle mittels Präsentation antigener Peptide der zuvor aufgenommenen und intrazellulär prozessierten Antigene. Dazu werden Antigen-restringierte Peptidpräsentation, kostimulatorische Signale und aktivierende Zytokine benötigt (4, 46). Die Präsentation antigener Peptide an T-Zellen erfolgt über die Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse I (MHC I) oder II (MHC II). T-Zellen

erkennen mithilfe von T-Zell-Rezeptoren (TCR) die an MHC-Klasse-I oder MHC-Klasse-II präsentierten Peptide. Die unterschiedlichen MHC-Klassen werden von unterschiedlichen T-Zell-Rezeptoren erkannt: CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und zytotoxische T-Zellen reagieren auf MHC-Klasse-I-Moleküle und induzieren die Zerstörung der Zelle, die das Antigen präsentiert. CD4<sup>+</sup>-Th-Zellen reagieren auf MHC-Klasse-II-Moleküle mit gebundenem Peptid.

Wie bereits erwähnt haben unterschiedliche Umweltbedingungen *in vivo*, zum Beispiel die Lokalisation der dendritischen Zellen, und *in vitro*, zum Beispiel die Differenzierungs- oder Kulturbedingungen, maßgeblichen Einfluss auf den Phänotyp, das Reifungsstadium und die Funktion dendritischer Zellen. Konventionelle myeloide dendritische Zellen werden *in vitro* aus Monozyten als Vorläuferzellen in der Gegenwart von IL-4 und GM-CSF generiert (10). Unter Verwendung dieser Methode differenzieren Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen, die sich durch die zuvor beschriebenen Eigenschaften auszeichnen. Die Gabe von IFN- $\alpha$  und GM-CSF zu Monozyten führt ebenfalls zu einer Differenzierung in dendritische Zellen. Die resultierenden dendritischen Zellen weisen einen halbreifen (*semi mature*) Status auf, der durch die konstitutive Expression des Reifungsmarkers CD86 gekennzeichnet ist. Auch die Expression anderer Oberflächenmarker, zum Beispiel DC-SIGN (CD209), wird beeinflusst, in diesem Fall negativ reguliert. Zusätzlich verfügen diese dendritischen Zellen über ein verändertes lymphostimulatorisches Potenzial (47). Die Verwendung von IL-4 und Plättchenfaktor 4 (PF-4) zur Differenzierung von dendritischen Zellen aus Monozyten führt ebenfalls zu Antigen-präsentierenden Zellen mit Eigenschaften dendritischer Zellen (PFAPC, (48)). PFAPC zeigen eine konstitutive Aktivierung und induzieren bevorzugt Th2-orientierte T-Zell-Antworten. Die eingangs als eine Subpopulation dendritischer Zellen erwähnten Langerhanszellen können durch die Kombination von GM-CSF und IL-15 aus Monozyten generiert werden (35). Plasmazytoide dendritische Zellen sind zur Zeit *in vitro* noch nicht generierbar. Neben Monozyten können auch CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stammzellen als Ausgangspopulation zur Generierung dendritischer Zellen genutzt werden (49, 50). Die Möglichkeit der *in vitro* Generierung dendritischer Zellen erlaubt es, detaillierte Untersuchungen dieser durchzuführen. Faktoren von Interesse können gezielt untersucht werden. Auch unterliegen die Zellzahlen hier nicht den Limitationen verglichen mit der Isolation dendritischer Zellen aus dem Blut oder Gewebe.

Neben der Art und Dosis verschiedener Signale, denen dendritische Zellen während der Differenzierung ausgesetzt sind beziehungsweise gegenüberstehen, beeinflussen auch Art und Dosis der eingehenden Signale im Verlauf der Aktivierung dendritischer Zellen nachhaltig deren Phänotyp, das Reifungsstadium sowie die Zytokinsekretion und somit ebenfalls die selektive Initiierung, Polarisierung und Modulation nachgeschalteter Immunantworten, beispielsweise T-Zell-Antworten. In Abhängigkeit der Aktivierung unterschiedlicher Subpopulationen von Th-Zellen (Th1/2, Th<sub>0</sub> oder T<sub>reg</sub>) resultieren qualitativ unterschiedlich ausgerichtete Immunantworten. Die selektive Sekretion bestimmter Zytokine sowie die Expression T-Zell-kostimulatorischer Moleküle der B7-Familie (CD80 und CD86) durch dendritische Zellen bestimmen dabei maßgeblich die Aktivierung und die Orientierung der adaptiven Immunantwort zum Beispiel in Richtung Th1 oder Th2. Im Rahmen einer Th1-orientierten T-Zell-Antwort, die einer Freisetzung eines Th1-assoziierten Zytokins wie IL-12 durch die dendritische Zellen folgt, wird zum Beispiel das Zytokin IFN- $\gamma$  verstärkt von T-Zellen sekretiert. Im Gegensatz dazu wird die Sekretion von IL-4, IL-5 oder IL-13 vermindert. Dies hat die Vermittlung zellulärer Immunität zur Folge. Die Freisetzung von IL-10 durch dendritische Zellen hingegen resultiert in einer eher Th2-orientierten T-Zell-Antwort, die sich durch eine verminderte Sekretion von IFN- $\gamma$  äußert, der eine verstärkte Freisetzung von IL-4, IL-5 und IL-13, begleitet von der Induktion humoraler Immunantworten, gegenüber steht. Th1- und Th2-assoziierte Zytokine unterliegen einerseits einer wechselseitigen Regulation und führen andererseits zu einer positiven Verstärkung der Immunantwort der betreffenden T-Zell-Subpopulation.

Unterschiede in dem lymphostimulatorischen Potenzial der dendritischen Zellen bezüglich Zytokinsekretion und Proliferation von T-Zellen sind also eng mit der Art und Dosis des aktivierenden Stimulus verknüpft. Eine Aktivierung dendritischer Zellen mit Gram-positiven Bakterien, zum Beispiel *Streptococcus pyogenes* (51), Gram-negativen Bakterien, beispielsweise *Escherichia coli* (52), oder Mykobakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* (53) sowie CD40L führt zur Sekretion großer Mengen des Th1-assoziierten Zytokins IL-12. Isoliertes Lipopolysaccharid Gram-negativer Bakterien hingegen induziert nur moderate Mengen IL-12.

Erfolgt die Interaktion einer dendritischen Zelle mit einem klar definierten Liganden, beispielsweise einem Lipopolysaccharid, für einen bestimmten Rezeptor, in diesem Fall TLR-4, so werden definierte intrazelluläre Signalkaskaden induziert, hier die

NF $\kappa$ -B-vermittelte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL-12. Interagieren dendritische Zellen jedoch mit kompletten Mikroben, wie zum Beispiel dem Mykobakterium *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG), so wird eine Vielzahl von Rezeptoren, unter anderem TLR-2 (54) und *dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing-non-integrin* (DC-SIGN, CD209) (55), ligiert. Dies hat eine Aktivierung multipler intrazellulärer Signalwege zur Folge. Eine kollaborative Aktivierung verschiedener Rezeptoren erfordert eine intrazelluläre Integration verschiedenster induzierter Signale. Hierbei erfolgt eine wechselseitige Modulation (*cross talk*) einzelner Signalkaskaden. Im Detail sind die Mechanismen zum *cross talk* bisher noch nicht verstanden und nur exemplarisch untersucht. Im Rahmen einer kollaborativen Aktivierung der Rezeptoren Dektin-1 und TLR-2 wurde eine verstärkte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine beschrieben (56). Die über Lipopolysaccharid vermittelte Zellaktivierung ist an die Präsenz von CD14 und TLR-4 gebunden (57). Somit führt eine Stimulus-abhängige, spezifische Aktivierung dendritischer Zellen in Folge der Erkennung Pathogen-assoziiertes molekularer Muster durch unterschiedliche Mustererkennungsrezeptoren, alleine oder in definierter Kombination dieser, schließlich zu einer gezielten Aktivierung dendritischer Zellen. Dies hat eine selektive Induktion adaptiver Immunantworten zur Folge. In ihrer Funktion als eines der wichtigsten Bindeglieder zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität resultiert damit erst aus einer differenziell induzierten Antwort der dendritischen Zellen eine distinkte Aktivierung, Initiierung, Polarisierung und Modulation nachgeschalteter, adaptiver Immunantworten (58-60). Somit kommt dendritischen Zellen eine herausragende Bedeutung und Aufgabe als professionell Antigen-präsentierende Zellen des Immunsystems zu, da diese maßgeblich den Verlauf von Infektionen beeinflussen.

## **1.2. Die Rolle myeloider Zellen in der mykobakteriellen Infektionsbiologie**

Mykobakterien sind weltweit verbreitet. Mit dem wohl bekanntesten Erreger der rund 100 Spezies umfassenden Gattung *Mycobacterium*, *M. tuberculosis*, ist nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation aktuell ca. ein Drittel der Weltbevölkerung infiziert. Prognostiziert sind ein starker Anstieg an Neuinfektionen

und eine erhöhte Sterberate an der Tuberkulose (TB oder auch *Phthisis* = Schwindsucht), was in der Zunahme multiresistenter (*multi drug resistant*, MDR) Stämme und in gehäuft auftretenden Koinfektionen mit dem humanen Immundefizienzvirus (*human immunodeficiency virus*, HIV) begründet ist.

Die Einteilung von Mykobakterien kann unter anderem anhand ihrer Pathogenität erfolgen. Hierbei wird zwischen den langsam wachsenden obligat pathogenen Mykobakterien, bezeichnet als *M. tuberculosis*-Komplex (*M. tuberculosis complex*, TB-Komplex/Familie), und den schnell wachsenden fakultativ pathogenen Mykobakterien, bezeichnet als nicht-tuberkulöse Mykobakterien (*non-tuberculosis mycobacteria*), unterschieden. Zu den Mykobakterien der TB-Familie gehören u.a. *M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. africanum*. Zu den nicht-tuberkulösen Mykobakterien gehören u.a. *M. avium*, *M. chelonae* und *M. smegmatis*. Heutzutage erfolgt die Einteilung der Mykobakterien nicht mehr vorwiegend anhand biochemischer Merkmale (Wachstum, Pigmentationsverhalten (61)) sondern mithilfe molekularbiologischer Methoden (62, 63).

Die Bekämpfung von Mykobakterien durch das Immunsystem stellt eine besondere Herausforderung dar: um eine aktive Aufnahme in ihre primären Wirtszellen, die Makrophagen, zu gewährleisten, interagieren Mykobakterien mit diversen Rezeptoren auf deren Oberfläche, zum Beispiel dem Mannose-Rezeptor (MR, (64)), Komplement-Rezeptoren (65), Fibronectin-Rezeptoren (66), Integrinen (67), CD14 (68) oder DC-SIGN (69, 70). Nach erfolgter Aufnahme der Mykobakterien durch Makrophagen werden die Mykobakterien jedoch nicht intrazellulär abgetötet, sondern überleben häufig in den befallenen Zellen durch Inhibition der Phagosom-Lysosom-Fusion (71) und sind in der Lage sich in den Makrophagen zu replizieren (72). Dies stellt einen effizienten Mechanismus dar, der Immunabwehr zu entgehen und einen optimalen Lebensraum in der Wirtszelle zu schaffen (73). Gezeigt wurde auch, dass Mykobakterien nicht nur durch Makrophagen, sondern auch durch Neutrophile und dendritische Zellen phagozytiert werden. Im Gegensatz zur Aufnahme durch Makrophagen können Mykobakterien zwar intrazellulär in den dendritischen Zellen verbleiben, sich jedoch nicht replizieren (74).

Verglichen mit dendritischen Zellen weisen Makrophagen nur eine schwach ausgeprägte Fähigkeit zur Antigenpräsentation auf (75-78). Ferner ist die Aktivierung von T-Zellen zur Induktion spezifischer Immunantworten auf bestimmte T-Zell-Subpopulationen ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD4^-/CD8^-$  und  $\gamma/\delta$ -T-Zellen) beschränkt. Die

HLA-E- und CD1-vermittelte T-Zell-Aktivierung ist dendritischen Zellen vorbehalten, da Makrophagen diese Moleküle nicht exprimieren (79, 80). Nach heutigem Kenntnisstand wird weiterhin angenommen, dass ausschließlich dendritische Zellen als professionelle Antigen-präsentierende Zellen CD4<sup>+</sup>- sowie CD8<sup>+</sup>-naive T-Zellen *in vitro* aktivieren und deren Ausreifung in Effektor-T-Zellen vermitteln können (81, 82). Hier konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass zumindest CD8<sup>+</sup>-naive T-Zellen *in vivo* auch durch Makrophagen aktivierbar sind (83). Mit Hinblick auf die Sekretion von Zytokinen ist festzuhalten, dass nur dendritische Zellen, nicht aber Makrophagen, zur Freisetzung von IL-12 in größeren Mengen nach mykobakterieller Stimulation befähigt sind (84). IL-12 stellt ein Schlüsselzytokin in der Aktivierung und Differenzierung von CD4<sup>+</sup>-Th-Zellen Richtung Th1 dar.

Zusammenfassend ist somit festzustellen, dass der primären Wirtszelle von Mykobakterien, dem Makrophagen, hauptsächlich die Aufgabe der Abtötung von Mykobakterien zukommt. Die nachhaltige Induktion adaptiver Immunantworten, zum Beispiel spezifischer T-Zell-Antworten, bleibt jedoch den dendritischen Zellen vorbehalten. Daher ist das mechanistische Verständnis der Interaktion von Mykobakterien mit dendritischen Zellen von hohem Interesse.

### 1.3. Die mykobakterielle Zellwand

Die Interaktion von Pathogenen, zum Beispiel Mykobakterien, mit Immunzellen des Wirtes, zum Beispiel dendritischen Zellen, ist äußerst komplex. Pathogene zeichnen sich durch die Existenz unterschiedlicher, definierter Oberflächenstrukturen aus. Gram-positive Bakterien tragen im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien beispielsweise kein Lipopolysaccharid. Mykobakterien weisen einen hohen Anteil an Mykolsäuren in ihrer Zellhülle auf. Damit verbunden ist die besondere Resistenz der ca. 3 - 5 µm großen und 0,2 – 0,6 µm breiten Stäbchen gegenüber Säuren und Laugen. Der hohe Anteil an Mykolsäuren geht mit einem hohen Lipidgehalt einher. Dies führt zum Verklumpen der Zellen in wässrigen Lösungen, verleiht aber auch Säurefestigkeit zum Beispiel gegenüber 6 - 8 %-iger Schwefelsäure (85-87). Der Aufbau der mykobakteriellen Hülle ist äußerst komplex und lässt sich im Wesentlichen in drei Schichten einteilen: die Plasmamembran, die Zellwand und die Kapsel (71). Hauptbestandteil der Zellwand ist ein Polymer aus Arabinofuranosyl-

und Galactofuranosyl-Resten (sog. Mykoly-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplex, mAGP-Komplex), welches kovalent an Peptidoglycan gebunden und mit Mykolsäuren, die eine dicke Schicht ähnlich der zweiten äußeren Membran Gram-negativer Bakterien bilden, verestert ist. Zusätzlich existieren Lipoglycane wie das Lipoarabinomannan, das bei einzelnen Mykobakterien mit unterschiedlichen Zuckern modifiziert sein kann. So tragen *M. tuberculosis* oder *M. bovis* BCG ein mannosyliertes Lipoarabinomannan (ManLAM). Im Gegensatz zu den kovalent gebundenen Molekülen der Zellwand ist die Kapsel, die aus Polysacchariden und Proteinen besteht, nur locker mit der Zellwand assoziiert (88).

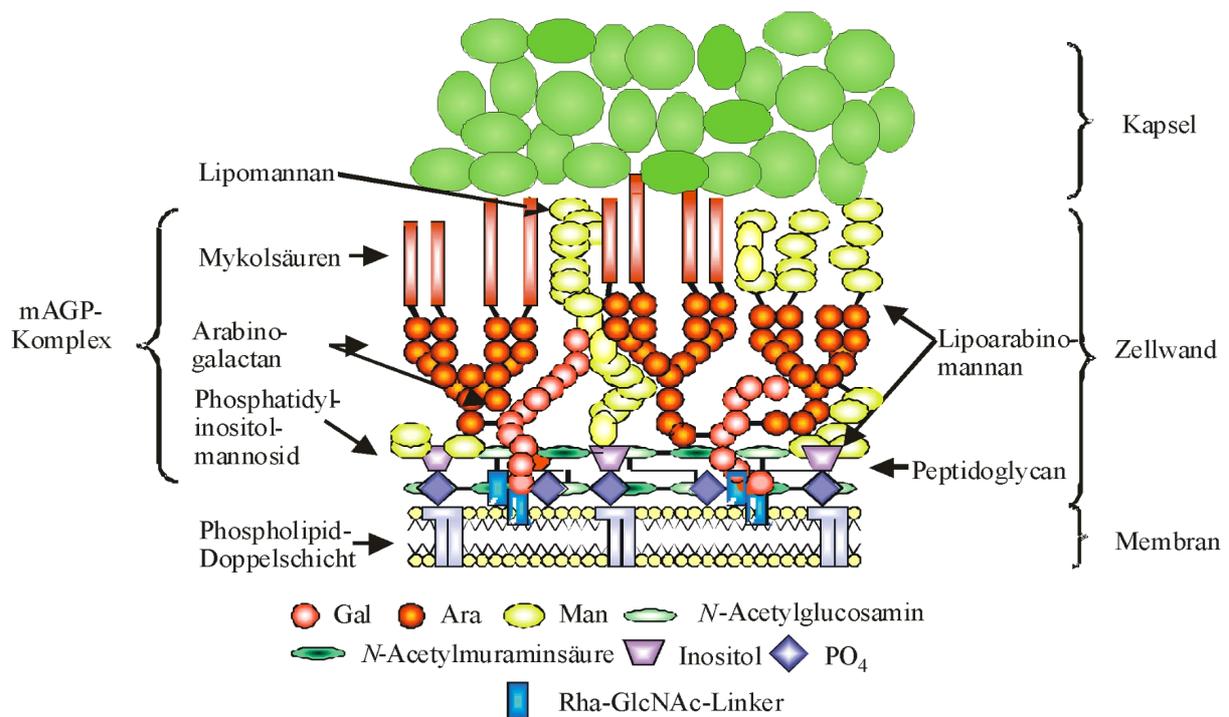


Abbildung 1: Die mykobakterielle Hülle (Schema) bestehend aus Plasmamembran, Zellwand und Kapsel (88).

Im Rahmen mykobakterieller Infektionen stellt das Lipoarabinomannan einen der wichtigsten Interaktionspartner zwischen dem Mykobakterium und der Immunzelle des Wirtes dar. Lipoarabinomannan ist auf der Oberfläche von Mykobakterien exprimiert. Nach heutigem Kenntnisstand ist noch nicht geklärt, ob das Lipoarabinomannan über einen Phosphoinositol-Anker nicht-kovalent in der Plasmamembran oder ebenfalls nicht-kovalent in der Mykolsäureschicht verankert ist (89). Auch wird diskutiert, ob sowohl eine Verankerung des Lipoarabinomannans in

der Membran als auch das Vorkommen in der äußeren Zellwand möglich ist (90). Die immunmodulatorischen Wirkungen des Lipoarabinomannans beinhalten beispielsweise die Inhibition der T-Zell- und Makrophagenaktivierung (91), die Induktion von Zytokinen (92-94), die Neutralisation von Sauerstoffradikalen (95) und die Veränderung enzymatischer Aktivitäten (96, 97) und tragen maßgeblich zur klinischen Manifestation einer Tuberkulose bei. Struktur-Funktionsbeziehungen sind hierbei jedoch weitgehend unklar. Die komplizierte biochemische Isolierung und nachfolgende Charakterisierung von Lipoarabinomannanen, die vielfältig modifiziert auftreten, sowie die Vielzahl der möglichen Interaktionspartner auf den Wirtszellen hat die Aufklärung der immunologischen Funktionen der Lipoarabinomannane bis vor wenigen Jahren sehr schwierig gestaltet.

Die einzelnen Spezies in der Gattung der Mykobakterien können sich, wie bereits angedeutet, in der Modifikation des Lipoarabinomannans unterscheiden. So tragen die Mitglieder der TB-Familie wie *M. bovis* BCG, *M. africanum* oder auch *M. tuberculosis* mannosyliertes Lipoarabinomannan auf ihrer Oberfläche, wohingegen beispielsweise *M. chelonae* ein nicht zusätzlich modifiziertes Lipoarabinomannan (Arabinose-haltiges Lipoarabinomannan, AraLAM) oder *M. smegmatis* ein mit Phosphoinositol-Resten versehenes Lipoarabinomannan (PILAM) exprimieren (98). Diese Modifikationen erlauben dem Bakterium ein breiteres Spektrum an Interaktionsmöglichkeiten mit Immunzellen des Wirtes, vornehmlich Makrophagen oder dendritischen Zellen. Umgekehrt ist damit auch eine Diskriminierung einzelner Mykobakterienspezies durch genannte Zellen möglich (69). Neben der herausragenden Rolle des Lipoarabinomannans im Rahmen mykobakterieller Infektionen gibt es noch eine Vielzahl anderer antigener Moleküle auf deren Oberfläche, unter anderem Glycoproteine oder Lipomannan (LM). Diese unterscheiden sich ebenfalls innerhalb der einzelnen Spezies und sind im Rahmen der sehr komplexen Interaktion eines kompletten Bakteriums mit einer Immunzelle des Wirtes in ihrer Funktion noch nicht genau beschrieben (99).

Nach neuesten Erkenntnissen wird die Interaktion von Mykobakterien der TB-Familie mit dendritischen Zellen hierbei durch die Bindung von mykobakteriellem mannosyliertem Lipoarabinomannan an spezifische Rezeptoren auf den dendritischen Zellen vermittelt. In der vorliegenden Arbeit galt deshalb das Hauptinteresse der Interaktion des mannosylierten Lipoarabinomannans aus *M. tuberculosis* beziehungsweise *M. bovis* BCG mit dendritischen Zellen.

#### 1.4. Interaktionen von Mykobakterien und dendritischen Zellen

Die Interaktion von Pathogenen mit Wirtszellen wird durch die Interaktion zahlreicher Pathogen-assoziiertes molekularer Muster mit diversen Mustererkennungsrezeptoren vermittelt. Somit wird eine erfolgreiche Infektion der Wirtszelle durch das Pathogen auf der einen Seite, sowie die nachhaltige Aktivierung der Wirtszellen auf der anderen Seite erreicht. Im Hinblick auf einzelne Pathogene konnten in den letzten Jahren zunehmend spezifische Interaktionspartner auf der Oberfläche bestimmter Zellen identifiziert werden. So erbrachte die rasch voranschreitende Charakterisierung der Interaktion von Mykobakterien mit Antigen-präsentierenden Zellen auf molekularer Ebene überraschende Erkenntnisse. Ein prominenter Rezeptor für *M. tuberculosis* oder auch *M. bovis* BCG auf humanen Makrophagen ist der Mannose-Rezeptor. Auf dendritischen Zellen stellt das Oberflächenmolekül DC-SIGN den Hauptinteraktionspartner für Mykobakterien dar (55). Die Interaktion von mannosyliertem Lipoarabinomannan und DC-SIGN ermöglicht eine effektive Aufnahme von Mykobakterien des TB-Komplexes in Immunzellen des Wirtes. Weiterhin ist die Aktivierung des Rezeptors DC-SIGN mit der Modulation von Immunantworten verbunden (100). DC-SIGN gehört zu der Familie der Kohlenhydrat-bindenden Proteine, den Lektinen. Im Gegensatz zu Antikörpern gehören Lektine unterschiedlichen Proteinfamilien an und weisen unterschiedliche Funktionen (Agglutination, mitogene oder toxische Wirkung) auf. Ihre Spezifität wird nach dem jeweiligen inhibierenden Zuckermolekül bezeichnet. Die Affinität eines Lektins zu einer Zelle ist jedoch nach empirischen Befunden stets höher als zu isolierten Zuckern, was zum Teil auf zusätzliche Protein-Protein-Wechselwirkungen zurückgeführt wird. Nach den ersten Beschreibungen von zunächst pflanzlichen (Ricin, 101) und später tierischen Lektinen (Hämagglutinin) sind diese zum heutigen Zeitpunkt gut beschrieben (102).

Anhand von Sequenzhomologien ist eine Einteilung der tierischen Lektine in die nachfolgend aufgeführten sieben Lektinklassen erfolgt (103):

- Chaperone (z. B. Calnexin, Calreticulin)
- C-Typ-Lektine (z. B. DC-SIGN, Mannose-Rezeptor)
- I-Typ-Lektine (z. B. Siglecs)
- P-Typ-Lektine (z. B. Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren)

- S-Typ-Lektine (z. B. Galactine)
- Hyaluronan-bindende Proteine
- Froschei-Lektine.

DC-SIGN gehört der Gruppe der C-Typ-Lektin-Rezeptoren an. Als Bindungspartner wurden Mannane, Glykokonjugate, die endständige Mannosen enthalten, sowie Sialyl-Lewis-X-Strukturen beschrieben. Die Bezeichnung „C-Typ-Lektin“ ist auf die Calcium-abhängige Ligandenbindung zurückzuführen. Ferner enthalten CLR mindestens eine *carbohydrate recognition domain* (CRD) zur Interaktion mit den betreffenden Zuckerstrukturen und stellen mit über 20 bisher beschriebenen Mitgliedern die größte Gruppe der Lektine dar (104). Innerhalb der C-Typ-Lektine wird zwischen den löslichen (Collectine (105), Mannose-bindendes Protein (106)) und den transmembranen C-Typ-Lektinen unterschieden, wobei die transmembranen C-Typ-Lektine in Abhängigkeit der Orientierung ihres N-Terminus noch in Typ I (N-Terminus außerhalb der Zellmembran, vgl. Mannose-Rezeptor) und Typ II (N-Terminus zytoplasmatisch, vgl. DC-SIGN) C-Typ-Lektine eingeteilt werden (107). Unter immunologischen Gesichtspunkten spielen C-Typ-Lektine als Adhäsionsmoleküle oder Mustererkennungsrezeptoren eine wichtige Rolle im Rahmen der Zell-Zell-Interaktion, der Zell-Migration sowie der Antigenpräsentation (108-110). Seit einigen Jahren ist bekannt, dass C-Typ-Lektine ebenfalls an der Interaktion von Zellen des Immunsystems mit Pathogenen beteiligt sind (111). Diese Funktion ist für den 44 kDa Typ-II-Transmembranrezeptor DC-SIGN nachgewiesen, der mit lediglich einer Domäne zur Erkennung von Kohlenhydraten, zum Beispiel komplexen Mannose-haltigen Strukturen, ausgestattet ist. Die erste Beschreibung von DC-SIGN und dessen Funktion als Adhäsionsmolekül im Rahmen von Zell-Zell-Interaktionen geht auf Geijtenbeek und Mitarbeiter mit der Beschreibung einer Interaktion von DC-SIGN mit ICAM-3 auf T-Zellen im Jahr 2000 zurück (112). Ferner wurde beobachtet, dass DC-SIGN auch das *rolling* dendritischer Zellen entlang des Endothels über ICAM-2 (113) sowie die Interaktion mit neutrophilen Granulozyten über Mac-1 und CD66a (CEACAM1, (114-116)) vermittelt. Als Mustererkennungsrezeptor wurde DC-SIGN bereits wesentlich früher (1992) im Rahmen einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Bindung des Glycoproteins 120 (gp120) des HIV an einen C-Typ-Lektin-Rezeptor beschrieben (117). Zum heutigen Zeitpunkt ist der Aufbau von DC-SIGN bekannt (118), die für die Ligandenbindung erforderliche

Tetramerisierung beschrieben (119, 120) und die Funktion als Rezeptor für unterschiedliche Pathogene, zum Beispiel Bakterien (*M. tuberculosis*, *Helicobacter pylori*), Pilze (*Candida albicans*), Viren (HIV, Hepatitis C Virus, Herpesvirus 8) als auch Parasiten (*Leishmania spec.*, *Schistosoma mansoni*) gezeigt (55, 121-126). Zusätzlich zu der ursprünglich postulierten exklusiven Expression des Rezeptors auf myeloiden und *in vitro* generierten dendritischen Zellen ist die Expression von DC-SIGN auch auf Makrophagensubpopulationen sowie B-Lymphozyten beschrieben (127, 128). Trotz der zahlreichen biochemisch orientierten Arbeiten zur Interaktion von DC-SIGN mit unterschiedlichen Pathogen-assoziierten Liganden ist die immunologische Bedeutung der Ligation von DC-SIGN durch mannosyliertes Lipoarabinomannan noch weitgehend ungeklärt. In Anlehnung an initiale Experimente zur Modulation der Zytokinfreisetzung wurde in Folge der Aktivierung von DC-SIGN nach Ligation durch mannosyliertes Lipoarabinomannan eine suppressive Wirkung auf die Immunantwort des Wirtes postuliert (70, 100). Bisher gibt es jedoch keine Untersuchungen zu der Modulation des Zytokinprofils dendritischer Zellen in Folge der Interaktion mit mannosyliertem Lipoarabinomannan und damit verbundenen möglichen Konsequenzen für nachgeschaltete Immunantworten.

## 1.5. Fragestellung

Dendritische Zellen nehmen als Bindeglied zwischen adaptiver und angeborener Immunität eine zentrale Stellung im Immunsystem ein. Die Initiierung primärer Immunantworten dendritischer Zellen wird maßgeblich durch die Art des betreffenden Stimulus bestimmt. Daraus resultiert eine selektive Modulation nachgeschalteter Immunantworten, die maßgeblich den Infektionsverlauf beeinflusst. Die Mechanismen, die zu einer gezielten Modulation der Immunantwort des Wirtes, zum Beispiel durch Pathogene, führen, sind bislang nicht im Detail verstanden.

Im Hinblick auf mykobakterielle Infektionen wurde mannosyliertes Lipoarabinomannan als zentrales Molekül zur Interaktion von Mykobakterien mit dendritischen Zellen beschrieben (55). Ein mykobakterieller Bindungspartner auf dendritischen Zellen ist DC-SIGN. Neben DC-SIGN sind im Rahmen der Interaktion von Mykobakterien mit dendritischen Zellen parallel eine Reihe von mykobakteriellen

Liganden, zum Beispiel das 19 kDa Antigen, und Rezeptoren wie der Mannose-Rezeptor oder TLR-2 beteiligt. Daraus ergibt sich eine multivariante Aktivierung dendritischer Zellen in Folge der Ligation unterschiedlichster Mustererkennungsrezeptoren. Nach intrazellulärer Integration der eingehenden Signale erfolgt die Generierung einer entsprechenden zellulären Antwort. Zum heutigen Zeitpunkt ist völlig unklar, wie die wechselseitige Modulation einzelner Signalwege durch *cross talk* dieser erfolgt und in einer ausbalancierten Antwort durch die dendritische Zelle resultiert. Eine genaue Kenntnis dieser Mechanismen ist jedoch von großer Bedeutung, um die Manipulation der Antwort dendritischer Zellen durch Pathogene nachzuvollziehen und somit gezielt therapeutisch nutzbar machen zu können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, auf welche Weise isoliertes Lipoarabinomannan und auf der mykobakteriellen Zellwand verankertes mannosyliertes Lipoarabinomannan die Immunbiologie dendritischer Zellen modulieren. Hierbei galt es zu analysieren, welche Konsequenzen die gleichzeitige Aktivierung unterschiedlicher Mustererkennungsrezeptoren für die intrazelluläre Integration der verschiedenen Signale durch die dendritischen Zellen hat. Eine kombinierte Ligation einzelner Rezeptoren erfordert den *cross talk* der aktivierten Signalwege für die finale, ausbalancierte Antwort der Zielzellen. Ebenfalls sollte der damit verbundene Einfluss auf nachgeschaltete, adaptive Immunantworten, im Speziellen T-Zell-Antworten, untersucht werden. Wird durch Aktivierung der dendritischen Zellen über mannosyliertes Lipoarabinomannan die Immunantwort der Wirtszelle beeinflusst? Stellt dies unter Umständen einen möglichen Mechanismus zur Manipulation der mykobakteriell befallenen Zellen zugunsten des Pathogens dar? Neben der Betrachtung des isolierten mannosylierten Lipoarabinomannans war es von Interesse, die Bedeutung dieses Moleküls im Rahmen der Interaktion dendritischer Zellen mit intakten Mykobakterien zu untersuchen, die mannosyliertes Lipoarabinomannan auf ihrer Zellwand tragen. Das daraus resultierende mechanistische Verständnis der Aktivierung dendritischer Zellen durch Pathogene oder deren Bestandteile ist von essenzieller Bedeutung, um die Modulation der Antwort dendritischer Zellen und somit mögliche Einflüsse auf nachgeschaltete Immunantworten nachzuvollziehen. Dies ermöglicht einerseits Pathogenesen und Krankheitsbilder zu verstehen und andererseits dendritische Zellen gezielt für therapeutische Zwecke zu manipulieren.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien und verwendete Substanzen

<b><u>Substanz:</u></b>	<b><u>Bezugsquelle:</u></b>
- Agarose	LifeTechnologies (Paisley, Schottland)
- Aqua injectabilia	Braun (Melsungen)
- $\beta$ -Mercaptoethanol	Fluka (Buchs, Schweiz)
- Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
- BSA	PAA (Pasching, Österreich)
- dNTP	Invitrogen (Karlsruhe)
- EDTA	Serva (Heidelberg)
- FITC	Sigma-Aldrich (München)
- Mannan ( <i>S. cerevisiae</i> )	Sigma-Aldrich (München)
- Oligo dT Primer	MWG Biotech (Ebersberg)
- $^{33}\text{P}$ dCTP	Hartmann-Analytik (Braunschweig)
- para-Formaldehyd	Fluka (Buchs, Schweiz)
- Salze u.a. Bestandteile für Lösungen	Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz) oder Serva (Heidelberg)

#### 2.1.2. Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Nachfolgend ist die Zusammensetzung angesetzter Puffer, Lösungen und Kulturmedien aufgeführt. Die Zusammensetzung gebrauchsfertiger Lösungen bzw. Bestandteile verwendeter Kits sind den jeweiligen Herstellerangaben zu entnehmen.

- 1x Azid-PBS	3 mM $\text{NaN}_3$ , 121,5 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ in A. dest., pH 7,2 - 7,4
- DNA-Marker (100 bp)	Invitrogen (Karlsruhe)
- Elutriationsmedium	1 x HBSS, 2% (v/v) FCS, 3,5% (v/v) $\text{NaHCO}_3$ in Aqua injectabilia
- Ethidiumbromid	gebrauchsfertig (Merck, Darmstadt)

- FCS	inaktiviert bei 56°C, sterilfiltriert (Linaris, Bettlingen)
- 10 x HBSS	gebrauchsfertig (Gibco, Eggenstein)
- Kulturmedium R <sub>xx</sub> 10	RPMI 1640, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 10% (v/v) FCS
- Lymphozyten- Separationsmedium	gebrauchsfertig (PAA, Pasching, Österreich)
- 1x MACS-Puffer	1x PBS, 0,5% (w/v) BSA, 2 mM EDTA, pH 7,2 - 7,4
- 1x PBS (pH 7,2-7,4)	0,9 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 2,7 mM KCl, 140 mM NaCl, 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,1 mM Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in A. dest.
- Penicillin/Streptomycin	gebrauchsfertig (PAA, Pasching, Österreich)
- RPMI 1640	gebrauchsfertig (PAA, Pasching, Österreich)
- Rotiscint eco plus (Szintillationsflüssigkeit)	gebrauchsfertig (Roth, Karlsruhe)
- 1x TBE	89 mM Tris, 89 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 1 mM EDTA, pH 8,0
- Tween 20	Fluka (Buchs, Schweiz)
- Tween 80	Fluka (Buchs, Schweiz)

### 2.1.3. Wachstumsfaktoren und Stimuli

Zur Differenzierung und Ausreifung der unterschiedlichen in dieser Arbeit verwendeten Antigen-präsentierenden Zellen wurden folgende Wachstumsfaktoren und Stimuli eingesetzt:

- bakterielle Stimuli *M. bovis* BCG, *M. chelonae* und *M. smegmatis* (Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien, Forschungszentrum Borstel), *E. coli* (Invitrogen, Karlsruhe) sowie *S. minnesota* (ATCC) wurden in der logarithmischen Wachstumsphase eingesetzt. Unmittelbar vor Verwendung wurde die Zahl der Kolonie-bildenden Einheiten pro ml (*colony forming units*, CFU) anhand der optischen Dichte (OD) bei 600 nm berechnet und die Zellen in gewünschter MOI eingesetzt. GFP (*green fluorescent protein*)-

- exprimierende *M. bovis* BCG Mykobakterien wurden von M.A. O'Donnell (University of Iowa, Iowa, USA, (129)) zur Verfügung gestellt.
- *compound 406, compound 506* Prof. Dr. K. Brandenburg (LG Biophysik, Forschungszentrum Borstel)
  - LPS (*S. minnesota*) Prof. Dr. K. Brandenburg (LG Biophysik, Forschungszentrum Borstel)
  - ManLAM Isolat aus *M. tuberculosis* H37Rv, NIH, NIAID contract number AI-75320 (Qualitätskontrolle mittels NMR, GC, SDS-PAGE, LAL-Assay)
  - Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> EMC microcollections GmbH (Tübingen)
  - PPD Statens Serum Institute (Kopenhagen, Dänemark)
  - rh-GM-CSF R&D (Wiesbaden)
  - rh-IFN- $\alpha$  Strathmann Biotech AG (Hamburg)
  - rh-IL-4 R&D (Wiesbaden)
  - zellulärer CD40L transiente adenovirale Transfektion der Zelllinie J82 (130)

#### 2.1.4. Kits

- AmpoLabelling L-03 Kit SuperArray (Frederick, USA)
- Beadlyte® Human Multi-Cytokine Detection System 2 Biomol (Hamburg)
- LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I Kit Roche (Penzberg)
- MACS CD1c<sup>+</sup> (BDCA-1) DC Isolation Kit Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
- MACS naive CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
- MACS Pan T cell Isolation Kit Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
- NucleoSpin II RNA Isolation Kit Macherey&Nagel (Dueren)

### 2.1.5. cDNA Microarrays

- *GEArray™ Q Series Human Inflammatory Cytokines, Chemokines and their Receptors Gene Array*, HS-005, SuperArray Bioscience (Frederick, USA)

### 2.1.6. Antikörper zur durchflusszytometrischen und funktionellen Analyse

Nachfolgend sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für durchflusszytometrische und funktionelle Analyse verwendeten Antikörper in Tabelle 1 aufgelistet:

Tabelle 1: Tabellarische Auflistung verwendeter Ak

Spezifität	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
<b>CD1a</b>	BL6	mIgG1	PE	BeckmannCoulter
<b>CD1c</b>	M241	mIgG1	FITC	Ancell
<b>CD14</b>	18D11	mIgG1	PE	Dianova
<b>CD40</b>	mAb89	mIgG1	PE	Immunotech
<b>CD80</b>	MAB104	mIgG1	PE	Immunotech
<b>CD83</b>	HB15e	mIgG1	PE	Pharmingen
<b>CD86</b>	FUN-1	mIgG1	PE	Pharmingen
<b>CD206</b>	19.2	mIgG1	-	Pharmingen
<b>CD209</b>	120507	mIgG1	PE	BeckmanCoulter
<b>CD209</b>	120507	mIgG2b	-	NIH
<b>MHC II</b>	IR-RD1	mIgG2a	PE	BeckmannCoulter
<b>Isotyp</b>	DAK-GO2	mIgG1	FITC	DAKO
<b>Isotyp</b>	DAK-GO3	mIgG1	PE	DAKO
<b>Isotyp</b>	DAK-GO5	mIgG2a	-	DAKO
<b>Isotyp</b>	MCP-11	mIgG2b	-	BeckmannCoulter
<b>Ziege-<math>\alpha</math>-Maus</b>	-	F(ab)2	PE	DAKO

### 2.1.7. Verbrauchsmaterialien

- Einmalpipetten	Costar (Bodenheim)
- Glasfiltermatten	PerkinElmer (Boston, USA)
- Kulturplatten (6-well, 24-well, 96-well)	NUNC (Wiesbaden)
- Kulturröhrchen	NUNC (Wiesbaden)
- MACS-Säulen (LS)	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
- Mikrotiterplatten (ELISA/96-well)	NUNC (Wiesbaden)
- Pasteurpipetten (Plastik, steril)	Sarstedt (Hildesheim)
- Pasteurpipetten (Glas, unsteril)	Brand (Wertheim)

### 2.1.8. Geräte

- autoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
- β-Counter 1205 Betaplate®	PerkinElmer (Boston, USA)
- Elutriator JE-6B	Beckmann Instruments (München)
- ELX 800 Photometer	Biotek Instruments (Winooski, USA)
- Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson (Heidelberg)
- Gelkammer	Biorad (München)
- LightCycler Instrument 2.0	Roche (Penzberg)
- Phosphorimager SI	Molecular Dynamics (Sunnydale, USA)
- Photometer Ultrospec 1000	Pharmacia Amersham Biotech (Freiburg)
- Roche Light Cycler Instrument	Roche (Penzberg)
- Spannungsquelle Power Pack P25	Biometra (Göttingen)
- Thermocycler	Biozym (Oldendorf)
- Zellcounter CASY TT	Schärfe (Reutlingen)
- Zentrifugen	Hettich (Tuttlingen)

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Immunologisch-Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1. Isolation humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut**

Humane mononukleäre Zellen des Blutes (MNC) wurden aus dem Vollblut gesunder Spender nach der Methode von Boyum *et al.* (131) mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurde das frisch abgenommene Vollblut, versetzt mit 10% (w/v) Natrium-Citrat-Lösung als Antikoagulan, 1:1 mit PBS gleicher Temperatur (20-37°C in Abhängigkeit von Zeitpunkt der Blutabnahme und Weiterverarbeitung) gemischt. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurden 12 ml Lymphozytenseparationsmedium in 50 ml Röhrchen vorgelegt, mit 38 ml PBS-gepuffertem Vollblut vorsichtig überschichtet und anschließend für 35 min bei 300 x g, Raumtemperatur (20-25°C), minimal möglicher Beschleunigung und ohne Bremse zentrifugiert. Der so erhaltene Plasmaüberstand (leukozytenfrei) wurde vorsichtig bis unmittelbar über die Interphase abgesaugt, welche die MNC enthielt. Anschließend wurden die MNC mittels Pasteurpipette geerntet und zur gründlichen Entfernung von u.a. Thrombozyten zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen (10 min, 4°C, 300 x g, Waschschrte oder Zellernten erfolgten stets unter diesen Bedingungen sofern nicht anders angegeben). Die erhaltene Zellzahl wurde nach Resuspendieren der Zellen in PBS oder Elutriationsmedium durch Entnahme von 5 µl Zellsuspension und Mischen in 5 ml Zählflüssigkeit (CASY®ton, isotonische Elektrolytlösung) in einem Zellcounter (CASY TT, Schärfe, Reutlingen) bestimmt. Grundlage dieser Messung bildet hierbei eine Widerstandsmessung. Die zu zählenden Zellen werden mit konstanter Geschwindigkeit durch eine elektrolytgefüllte Präzisionsmesspore gesaugt, welche einen definierten Widerstand darstellt. Mit dem Eintritt der Zellen in die Messpore verdrängen diese eine ihrem Volumen entsprechende Menge an Elektrolytlösung. Demzufolge ändert sich der Widerstand, wobei intakte Zellen als Isolator wirken und somit zu einer Erhöhung des Widerstandes in der Messpore führen. Im Gegensatz dazu werden tote Zellen anhand der Größe ihres Zellkernes, da keine intakte Membran als elektrische Barriere vorhanden ist, bestimmt. Mit dieser Art der Zellzählung ist demzufolge eine exakte Trennung unterschiedlicher Zellpopulationen sowie eine klare Abtrennung

lebender und toter Zellen voneinander möglich. Die beschriebene Methode wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit standardmäßig zur Bestimmung von Zellzahlen verwendet.

### **2.2.1.2. Isolation von Monozyten und Lymphozyten aus humanen MNC**

Humane Monozyten sowie Lymphozyten wurden durch weitere Auftrennung der erhaltenen MNC mittels Gegenstromzentrifugation nach Contreras *et al.* (132) isoliert. Dazu wurden die MNC in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml in Elutriationsmedium mit einer Pumpengeschwindigkeit von 33 U/min (25 ml/min) bei laufendem Rotor (12°C, 3.500 U/min) in die Trennkammer eines Elutriators (JE-6B, Beckmann Instruments, München) eingeladen. Im Verlauf der Elutriation wurden die in den MNC enthaltenen Zellpopulationen (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten) durch stufenweises Erhöhen der Pumpengeschwindigkeit in Abhängigkeit ihrer Größe (Volumen) wieder aus der Trennkammer des Elutriators in Elutriationsmedium herausgespült und somit eine Fraktionierung dieser in kleine (T-Zellen, Pumpengeschwindigkeit 38-42 U/min bzw. 29 ml/min) und große Lymphozyten (NK-Zellen, Pumpengeschwindigkeit 45-46 U/min bzw. 34-35 ml/min) sowie Monozyten (Pumpengeschwindigkeit 52 U/min/min bzw. 39 ml/min) erreicht. Die Reinheit und Zellzahl der durch Elutriation erhaltenen Lympho- bzw. Monozyten wurde anschließend im CASY TT wie unter 2.2.1.1. beschrieben ermittelt, bevor die Zellen ihrer weiteren Verwendung zugeführt wurden.

### **2.2.1.3. Isolation von Gesamt-T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation**

Die durch Elutriation erhaltenen (T-)Lymphozyten wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung des *MACS Pan T cell Isolation Kit* (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) mittels magnetischer Zellseparation (MACS) weiter aufgereinigt, um eine Reinheit der T-Zellen von 95-98% in den durchgeführten Experimenten zu gewährleisten. Zur Isolation der gewünschten T-Zellen wurden  $10^7$  Lymphozyten in 40 µl MACS-Puffer resuspendiert, 10 µl eines Cocktails biotinylierter Ak ( $\alpha$ -CD14,  $\alpha$ -CD16,  $\alpha$ -CD19,  $\alpha$ -CD36,  $\alpha$ -CD56,  $\alpha$ -CD123,  $\alpha$ -CD235a) dazugegeben, gemischt und 10 min bei 4°C

inkubiert. Im Anschluss daran wurden wiederum pro  $10^7$  Zellen 30  $\mu$ l MACS-Puffer und 20  $\mu$ l Streptavidin-markierte Mikrokügelchen (*microbeads*) dazugegeben, gefolgt von einer 15-minütigen Inkubation bei 4°C. Zur Entfernung überschüssiger Ak wurden die Zellen mit dem 20-fachen des Markierungsvolumens mit MACS-Puffer oder PBS gewaschen, in 500  $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert und an einem autoMACS™ Separator (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) unter Verwendung des Programms „*Deplete*“ magnetisch getrennt, wobei die nicht markierten, reinen CD3<sup>+</sup>-Gesamt-T-Zellen an dem Ausgang „*Neg 1*“ aufgefangen wurden. Vor der weiteren Verwendung der Zellen wurde die Reinheit dieser per CASY TT und/oder im Durchflusszytometer (Kontrolle der Expression von CD3 als Marker für Gesamt-T-Zellen) analysiert.

#### **2.2.1.4. Isolation von naiven CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>-T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation**

Zur Isolation von naiven T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) wurden ebenfalls durch Elutriation angereicherte (T-)Lymphozyten verwendet und diese anschließend nach Herstellerangaben unter Verwendung des *MACS naive CD4<sup>+</sup> T cell Isolation Kit* (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) mittels MACS isoliert. Die einzusetzenden Mengen an Ak und an Puffern sowie das gewählte Separationsprogramm entsprechen denen des unter 2.2.1.3. beschriebenen Protokolls, wobei der Ak-Cocktail gegen folgende Ag gerichtete Ak enthielt: CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD45RO, CD56, CD123, CD235a und TCR $\gamma/\delta$ . Vor der weiteren Verwendung wurden auch hier wieder die Reinheit der erhaltenen Zellen im CASY TT und/oder durchflusszytometrisch (Kontrolle der Expression von CD45RA als Marker für naive T-Zellen) überprüft.

#### **2.2.1.5. Isolation von CD1c<sup>+</sup> dendritischen Zellen des peripheren Blutes mittels magnetischer Zellseparation**

Die Isolation humaner dendritischer Zellen des peripheren Blutes (BDC) erfolgte ebenfalls unter Verwendung des Prinzips der magnetischen Zellseparation unter Einsatz des *MACS CD1c<sup>+</sup> (BDCA-1) DC Isolation Kit* (Miltenyi, Bergisch-Gladbach)

Ausgangsmaterial für die Isolation CD1c<sup>+</sup> BDC bildeten nach Elutriation erhaltene Monozyten. BDC entsprechen in ihrer Größe Monozyten, weshalb diese beiden Zellpopulationen durch Elutriation nicht trennbar sind. Zur Aufreinigung von BDC, die eine sehr seltene Zellpopulation darstellen, war die Anwendung eines komplexeren MACS-Protokolls notwendig, um eine maximale Anzahl hochreiner BDC ohne kontaminierenden Zellen wie z.B. B-Lymphozyten (CD1c<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>) zu erhalten. 100-150x10<sup>6</sup> Monozyten wurden in 200 µl MACS-Puffer resuspendiert, und mit je 100 µl Blockierlösung, α-CD19-Ak gekoppelt an *microbeads* sowie biotinyliertem α-CD1c-Ak für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit MACS-Puffer oder PBS wurden diese in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und mithilfe des autoMACS™ Separators (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) unter Verwendung des Programms „*Deplete*“ getrennt. Hierbei wurden zunächst die B-Zellen depletiert und die B-Zell-freien Monozyten am Ausgang „*Neg 1*“ aufgefangen. Nach erneutem Waschen wurden die Monozyten in 400 µl MACS-Puffer aufgenommen und mit 100 µl biotinylierten *microbeads* versetzt, für 15 min bei 4°C inkubiert, gewaschen und in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Unter Verwendung des Programms „*Posseld*“ wurden die Monozyten von den BDC im autoMACS™ Separator (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) getrennt. Die Monozyten wurden am Ausgang „*Neg 1*“ und die BDC am Ausgang „*Pos 2*“ aufgefangen. Die Monozyten wurden zur Generierung dendritischer Zellen genutzt. Vor der weiteren Verwendung wurden die isolierten BDC im CASY und/oder Durchflusszytometer analysiert und anschließend in einer Konzentration von 0,5-1x10<sup>6</sup> Zellen pro ml in Kulturmedium mit 1% heterologem Plasma (human) anstatt 10 % (v/v) FCS zur weiteren Verwendung eingesetzt.

#### 2.2.1.6. Generierung konventioneller DC-SIGN<sup>POS</sup> dendritischer Zellen

Das Ausgangsmaterial zur Differenzierung humaner dendritischer Zellen *in vitro* nach Sallusto *et al.* (10) bildeten die durch Elutriation gewonnenen Monozyten (Reinheit 95-98 %). 10<sup>6</sup> Monozyten pro ml wurden in R<sub>xx</sub>10 in Gegenwart von 500 U/ml rh-IL-4 sowie 500 U/ml rh-GM-CSF in 6-*well* Kulturplatten (NUNC, Wiesbaden) angesetzt (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), wobei pro *well* 5-6 ml Zellsuspension eingesetzt wurden. An Tag 2 oder 3 sowie an Tag 4 oder 5 der DC-Kultur wurde ein sog. „halber Mediumwechsel“ durchgeführt. Dazu wurde die Hälfte des Kulturmediums (2,5-3 ml pro *well*) in ein

50 ml Kulturröhrchen überführt und nach Zentrifugation des DC-haltigen Mediums das Zellpelett entsprechend dem Ausgangsvolumen in frischem R<sub>xx</sub>10, versetzt mit frischen Zytokinen, aufgenommen. Mit dieser Methode wurden unreife dendritische Zellen generiert, die an Tag 5 bis 8 experimentell verwendbar waren.

#### 2.2.1.7. Generierung DC-SIGN<sup>neg</sup> dendritischer Zellen

Auch hier bildeten elutrierte Monozyten die Grundlage der DC-Generierung, wobei diese in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro ml in R<sub>xx</sub>10 in Gegenwart von je 1.000 U/ml rh-IFN- $\alpha$  und rh-GM-CSF eingesetzt wurden (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Der Mediumwechsel und die Verwendung der DC erfolgte wie unter 2.2.1.6. beschrieben. Die resultierenden DC weisen in Folge dieser Generierungsmethode einen halbreifen (*semi mature*) Phänotyp auf und exprimieren den DC-Oberflächenmarker DC-SIGN (CD209) nicht, da dessen Expression zum einen IL-4-abhängig ist und zum anderen negativ durch IFN- $\alpha$  reguliert wird (47, 133).

#### 2.2.1.8. Stimulation dendritischer Zellen (DC-SIGN<sup>pos</sup> und DC-SIGN<sup>neg</sup>)

Die wie unter 2.2.1.6. und 2.2.1.7. generierten DC wurden an Tag 5 bis 8 nach der Differenzierung aus Monozyten vorsichtig geerntet und in frischem R<sub>xx</sub>10 ohne Zusatz frischer Zytokine (bei Stimulationsdauer 24-72 h mit Zusatz frischer Zytokine) aufgenommen, die exakte Zahl der lebenden DC ermittelt und diese in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen pro ml R<sub>xx</sub>10 zur Stimulation eingesetzt ( $v = 500 \mu\text{l}$ , 24-well Kulturplatte, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Um Aktivierungsartefakte durch mechanische Reizung während der Zellernte zu minimieren, wurden die DC stets morgens geerntet und erst am Abend stimuliert. Die jeweilige Stimulationsdauer sowie exakte Konzentration der verwendeten Stimuli sind im Detail dem Ergebnisteil zu entnehmen. Verwendet wurden: LPS [1-100 ng/ml], Mannan [10-200  $\mu\text{g/ml}$ ], ManLAM [10-15  $\mu\text{g/ml}$ ], Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> [50 nM], PPD (*Tuberculin-derived purified protein derivate*) [10  $\mu\text{g/ml}$ ], bakterielle Stimuli (*E. coli*, *M. bovis* BCG, *M. chelonae*, *M. smegmatis*, *S. minnesota*) in der MOI = 1 - 2 sowie zellulärer CD40L (erhalten durch transiente adenovirale Transfektion der Zelllinie J82, G. Steller, LG

Immuntherapie, Forschungszentrum Borstel) in der MOI = 0,1. Alle Angaben verstehen sich stets als Endkonzentrationen in den betreffenden Stimulationsansätzen. Nach Bedarf wurden die Überstände der stimulierten Zellen sowie die Zellen selber nach dem gewünschten Stimulationszeitraum entweder direkt analysiert (*enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA s. 2.2.3.1., Durchflusszytometrie s. 2.2.3.2.) oder in entsprechenden Folgeexperimenten (gemischte Lymphozytenreaktion s. 2.2.1.10., Antigen-Präsentations-Assay s. 2.2.1.11.) weiter verwendet.

#### **2.2.1.9. Stimulation von CD1c<sup>+</sup> BDC**

BDC wurden umgehend nach deren Isolation zur Stimulation eingesetzt, wobei die Zellkonzentration 0,5-1x10<sup>6</sup> Zellen pro ml betrug. Die Zellen wurden 18 h mit LPS [2 µg/ml] und/oder ManLAM [10-15 µg/ml] stimuliert (v = 500 µl, 24-well Kulturplatte, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) und anschließend die Überstände auf die Sekretion von Zytokinen mittels ELISA überprüft.

#### **2.2.1.10. Gemischte Lymphozytenreaktion**

Zur Analyse der Antigen-unabhängigen Induktion der Proliferation sowie Zytokinsekretion von humanen T-Zellen (CD3<sup>+</sup>- bzw. CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> s. 2.2.1.3 und 2.2.1.4) wurden DC mit unterschiedlichen heterologen T-Zell-Populationen im Rahmen einer gemischten Lymphozytenreaktion (*mixed lymphocyte reaction*, MLR) kokultiviert. Dazu wurden die T-Zellen (frisch isoliert bzw. über den Zeitraum der DC-Differenzierung in R<sub>xx</sub>10 in einer Konzentration von 2x10<sup>6</sup> Zellen pro ml kultiviert) am Tag der DC-Stimulation geerntet, gezählt und in einer Konzentration von 1 bzw. 2x10<sup>6</sup> Zellen pro ml für die Kokultur der DC mit den T-Zellen in 96-well Rundbodenplatten (Proliferation) bzw. in 24-well Kulturplatten (Zytokinsekretion) vorbereitet, wobei die Gesamtzellzahl (Endkonzentration) in den Kokulturen 0,5 bzw. 1x10<sup>6</sup> Zellen pro ml betrug. Die DC wurden im Vorfeld der Kokulturen mit LPS und/oder ManLAM stimuliert (v = 1000 µl, 24-well Kulturplatte, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), gewaschen und dann in den entsprechenden Verhältnissen zu den T-Zellen

gegeben. Die gewählten Verhältnisse sind im Detail dem Ergebnisteil der betreffenden Experimente zu entnehmen. An Tag 5 der Kokulturen wurde zu den Kokulturen 1  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin pro 200  $\mu\text{l}$  Kulturmedium (96-well Rundbodenplatte) gegeben und die Zellen nach 18 h Thymidineinbau in der Rundbodenplatte bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Die nach Auftauen erhaltenen Zelllysate wurden auf Glasfiltermatten (Perkin Elmer, Boston, USA) aufgesaugt und anschließend wurde in einem  $\beta$ -Counter (Perkin Elmer, Boston, USA) der Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin in die DNA proliferierender Zellen gemessen. Ebenfalls an Tag 5 der Kokulturen wurden Überstände (nicht radioaktiv) der Kokulturen abgenommen und ELISA-Analysen zur Bestimmung von Zytokinen durchgeführt.

#### 2.2.1.11. Antigen-Präsentations-Assay

Zur Analyse der Antigen-abhängigen Induktion der Proliferation sowie Zytokinsekretion von T-Zellen wurden DC mit Gesamt-T-Zellen im Rahmen eines Antigen-Präsentations-Assays (autolog) kokultiviert. Dazu wurden die Gesamt-T-Zellen PPD<sup>POS</sup>-Spender (PPD für *Tuberculin-derived purified protein derivate*) über den Zeitraum der DC-Differenzierung in R<sub>xx</sub>10 in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml kultiviert. PPD<sup>POS</sup> Spender zeichnen sich durch eine nachgewiesene Immunreaktion im Rahmen eines Tuberkulintests, z.B. begründet in einer Immunisierung mit *M. bovis* BCG oder einer früheren TB-Infektion der betreffenden Spender, aus. Somit kann eine Restimulation von T-Zellen in Gegenwart des durch die DC präsentierten Antigens PPD zur Analyse der Antigen-abhängigen T-Zell-Aktivierung erfolgen. Am Tag der DC-Stimulation wurden die T-Zellen geerntet, gezählt und in einer Konzentration von 1 bzw.  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml für die Kokulturen in 24-well Kulturplatten vorbereitet, wobei die Gesamtzellzahl (Endkonzentration) in den Kokulturen  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml betrug. Die DC wurden im Vorfeld der Kokulturen mit Antigen beladen (ManLAM [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ], LPS [10ng/ml], PPD [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ],  $v = 1000 \mu\text{l}$ , 24-well Kulturplatte,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), gewaschen und in den entsprechenden Verhältnissen zu den T-Zellen gegeben. Die entsprechenden DC- zu T-Zell-Verhältnisse sind im Detail den betreffenden Experimenten im Ergebnisteil zu entnehmen.

## 2.2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1. RNA-Isolation

Unter Verwendung des NucleoSpin RNA II Kits (Macherey & Nagel) wurde nach Herstellerangaben aus humanen DC die Gesamt-Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) isoliert. Dazu wurden  $5 \times 10^6$  Monozyten zu DC generiert und diese ohne Ernte direkt für die RNA-Isolation verwendet. Der Zellkulturüberstand, in dem sich ebenfalls DC befinden, wurde 5 min bei  $500 \times g$  ( $4^\circ\text{C}$ ) zentrifugiert. Die in der Kulturplatte verbleibenden Zellen wurden durch Gabe von  $350 \mu\text{l}$  des Puffers RA1 in Gegenwart von  $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert und dann auf die zentrifugierten DC gegeben. Das so erhaltene Zelllysat wurde durch einminütige Zentrifugation bei  $11.000 \text{ U/min}$  ( $4^\circ\text{C}$ ) ( $\text{U/min}$  gültig für Tischzentrifuge EBA 12 R, Hettich, Tuttlingen) durch eine Säule homogenisiert, anschließend mit  $350 \mu\text{l}$  70% Ethanol vermischt (Vortex) und dann über eine nächste Säule zum Binden der RNA während 30 s Zentrifugation bei  $8.000 \text{ U/min}$  ( $4^\circ\text{C}$ ) gegeben. Danach wurde die auf der Säule gebundene RNA mit  $350 \mu\text{l}$  MDB, *membrane desalting buffer*, gewaschen und kontaminierende DNA durch 15-minütige Inkubation der RNA mit DNase I bei RT degradiert. Die DNase wurde im Anschluss durch Zusatz von  $200 \mu\text{l}$  Puffer RA2 inhibiert, gefolgt von einer Zentrifugation für 30 s bei  $8.000 \text{ U/min}$  ( $4^\circ\text{C}$ ). Nach zweimaligem Waschen mit  $800 \mu\text{l}$  bzw.  $200 \mu\text{l}$  Puffer RA3 und Zentrifugation für 30 s bzw. 1 min bei  $11.000 \text{ U/min}$  ( $4^\circ\text{C}$ ) wurde die RNA in  $60 \mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser durch zweiminütige Zentrifugation bei  $11.000 \text{ U/min}$  ( $4^\circ\text{C}$ ) eluiert. Die erhaltene RNA wurde bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren oder zur direkten Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten RNA erfolgte durch Messung der Absorption der Isolate bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  (Nukleinsäuren) sowie  $\lambda = 280 \text{ nm}$  (Proteine). Zusätzlich wurden PCR-Reaktionen (s. 2.2.2.3.) nach reverser Transkription (s. 2.2.2.2.) der RNA in cDNA unter Verwendung Intron-umfassender Primer (*intron spanning primer*) zur Kontrolle der Isolate auf Kontamination mit genomischer DNA durchgeführt.

### 2.2.2.2. Reverse Transkription und Synthese komplementärer DNA

Zur Herstellung von komplementärer DNA (*complementary desoxyribonucleic acid*, cDNA) wurden 50-500 ng der isolierten RNA in einem maximalen Volumen von 10 µl mit 1 µl Oligo-dT-Primer sowie 1 µl 10 mM dNTP-Mix gemischt und zunächst 5 min bei 65°C inkubiert, gefolgt von sofortiger Abkühlung auf Eis. Danach wurden 4 µl SuperScript II 5x *reaction buffer*, 1 µl RNase out und 2 µl DTT hinzugegeben, der Reaktionsansatz 2 min bei 42°C inkubiert und anschließend mit 1 µl SuperScript II reverse Transkriptase versetzt. Die reverse Transkription wurde für 60 min bei 50°C durchgeführt und die enzymatische Reaktion durch 15-minütige Inkubation bei 70°C beendet.

### 2.2.2.3. Polymerasekettenreaktion

Zur Kontrolle der RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde standardmäßig eine Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) unter Verwendung einer thermostabilen Taq-Polymerase in einem Thermocycler (Biozym, Oldendorf) durchgeführt.

Ein typischer PCR-Ansatz mit einem Endvolumen von 50 µl enthielt:

5 µl 10 x *PCR reaction buffer*

1,5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>

1 µl 10 mM dNTP-Mix

1 µl 10 µM *forward primer*

1 µl 10 µM *reverse primer*

2 µl der cDNA erhalten aus der reversen Transkription

38,5 µl H<sub>2</sub>O.

Nach der initialen Denaturierung (5 min bei 95°C) gefolgt von der Primeranlagerung wurden 35 Zyklen zur Amplifikation des betreffenden Genes durchgeführt und anschließend auf 4°C abgekühlt.

#### 2.2.2.4. Quantitative PCR

Neben der reinen Amplifikation zum Nachweis einzelner Gene unter Durchführung einer PCR wie unter 2.2.2.3. beschrieben, bietet die Variante der *real time* PCR die Möglichkeit zur Quantifizierung der Genexpression. In der vorliegenden Arbeit wurde ein System unter Verwendung eines Farbstoffes, SYBRGreen (Roche), eingesetzt, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert. SYBRGreen wird bei  $\lambda = 470$  nm angeregt, die Emissionswellenlänge liegt bei  $\lambda = 530$  nm. Die Einlagerung von SYBRGreen ist mit einer starken Zunahme der Fluoreszenz dieses Farbstoffes verbunden. Die Intensität des emittierten Signals ist direkt proportional zur entstandenen Menge doppelsträngiger DNA. In der vorliegenden Arbeit wurde die *real time* PCR im Rahmen der cDNA-Array-Analyse zur Untersuchung der Regulation einzelner Gene durchgeführt.

Ein typischer Ansatz für eine *real time* PCR in einem Volumen von 10  $\mu$ l enthielt:

2  $\mu$ l SYBR Mix

0,5  $\mu$ l 10  $\mu$ M *forward primer*

0,5  $\mu$ l 10  $\mu$ M *reverse primer*

2,5  $\mu$ l cDNA erhalten aus reverser Transkription (2.2.2.2)

4,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

Ein typischer Lauf einer *real time* PCR wurde wie folgt durchgeführt:

- 1) 600 s 95°C sog. heißer Start
- 2) 10 s 95°C initiale Denaturierung
- 3) 10 s Anlagerung der Primer bei Temperatur x (s. Tabelle 2)
- 4) 1 s pro 25 bp bei 72°C Amplifikation
- 5) 1 s bei Temperatur x Aufnahme (s. Tabelle 2)
- 6) 30 s 63°C Schmelzen
- 7) 44-malige Wiederholung der Schritte 2-6
- 8) 30 s 40°C Abkühlen

Die Reaktionen wurden in einem Roche Light Cycler Instrument (Roche, Penzberg) in 20 µl Glaskapillaren durchgeführt, nachdem diese nach Beladung für 5 s bei maximal 1.500 U/min zentrifugiert wurden. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Light Cycler Software Version 3.5.3. (Roche, Penzberg).

Die für die PCR sowie *real time* PCR verwendeten Primer sind nachfolgend in Tabelle 2 dargestellt:

**Tabelle 2: Verwendete Primer mit ihren jeweiligen Anlagerungs- sowie Aufnahmetemperaturen, Fragmentgrößen und Sequenzen**

Primer	Anlagerungs- temperatur (°C)	Aufnahme- temperatur (°C)	Fragment- größe (bp)	<i>forward primer</i>	<i>reverse primer</i>
<b>β-Actin</b>	55	-	309	5'-AGC GGG AAA TCG TGC GTG-3'	5'-GGG TAC ATG GTG GTG CCG-3'
<b>β-2M</b>	60-52	82	368	5'-GCT GTG CTC GCG CTA CTC TC-3'	5'-GCG GCA TCT TCA AAC CTC CAT-3
<b>HPRT</b>	65-55	78	84	5'-T CA GGC AGT ATA ATC CAA AGA TGG T-3'	5'-AGT CTG GCT TAT ATC CAA CAC TTC G-3'
<b>IL-10</b>	52-52	75	81	5'-TGG GGG BAGA ACC TGA AGA C-3'	5'-ACA GGG AAG AAA TCG ATG ACA-3'
<b>IL-12p40</b>	60-50	79	395	5'-TCA GAG GGG ACA ACA AGG AGT ATG-3	5'-CTG GGC CCG CAC GCT AAT-3'
<b>TNF-α</b>	62-52	80	409	5'-GGC TCC AGG CGG TGCTTG TTC-3'	5'-AGA CGG CGA TGC GGC TGA TG-3'

### 2.2.2.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach deren Größe wurde unter Verwendung einer Agarosegelmatrix (1-2% (w/v) Agarose in 1 x TBE) in horizontalen Gelkammern (Biorad, München) unter Verwendung von 1 x TBE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Zu den Proben (ca. 5-50 ng cDNA in 10 µl A. dest) wurde 1/6 6x Probenpuffer (i. d. R. 2 µl, Endvolumen 12 µl) gegeben. Zur Abschätzung der Größen der aufgetragenen DNA-Moleküle wurde stets ein Größenstandard (100bp *DNA-ladder*) mit aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug in Abhängigkeit der

Gelgröße und Konzentration der Agarosematrix 70-120 V. Die Auftrennung erfolgte über einen Zeitraum von 30-90 min. Als Nachweisreagenz wurde der flüssigen Agarose (nach Aufkochen und Abkühlen auf 60°C) Ethidiumbromid in einer Konzentration von [1 µg/ml] zugesetzt. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der mit den DNA-Molekülen interkaliert (ca. 3 Moleküle pro 10 Basen, Fluoreszenz nimmt mit Einlagerung in die DNA zu) und nach Anregung durch UV-Licht ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) fluoresziert ( $\lambda = 590 \text{ nm}$ ). Dies wurde mittels des GelDoc 2000 Systems der Fa. Biorad detektiert und dokumentiert.

#### **2.2.2.6. Analyse von Genregulationen mittels cDNA-Microarrays**

Zur Analyse des differentiellen Expressionsmusters immunologisch relevanter Gene fand im Rahmen dieser Arbeit die Technik der cDNA-Microarray-Analyse Anwendung. Hierbei sollten der Einfluss von ManLAM auf die Genexpression dendritischer Zellen sowie das Genexpressionsmuster dendritischer Zellen nach alleiniger Stimulation mit LPS mit dem Genexpressionsmuster dendritischer Zellen nach Stimulation mit LPS und ManLAM verglichen werden. Diese Untersuchungen bieten die Möglichkeit, einen ersten Eindruck über die Rolle von ManLAM im Rahmen der Modulation der Immunantwort der dendritischen Zellen zu erhalten. Nach Isolation der RNA wurde zur Durchführung der cDNA-Microarrays die RNA von drei unterschiedlichen Spendern aus drei voneinander unabhängigen Experimenten zu gleichen Teilen vereinigt und einer reversen Transkription zugeführt. Anschließend wurde die erhaltene cDNA mittels PCR (AmpoLabelling Kit L-03, SuperArray Bioscience, USA) vervielfältigt. Die Amplifikation erfolgte in Gegenwart von  $^{33}\text{P}$ -dCTP-Nukleotiden (Hartmann-Analytik) zur radioaktiven Markierung der cDNA. Nach erfolgter Amplifikation wurde die cDNA 2 min bei 95°C denaturiert und anschließend 18 h bei 60°C auf den Arraymembranen unter Schwenken hybridisiert. Die Membranen wurden danach mehrfach gewaschen und abschließend in Szintillationsfolien (PerkinElmer, Wellesley, USA) blasenfrei eingeschweißt. Die Detektion der erfolgreich hybridisierten, radioaktiv markierten cDNA erfolgte für 24 h bei RT (20-25°C) auf Phosphorimage-Belichtungsplatten (Molecular Dynamics; Sunnydale, USA). Im Anschluss wurden die belichteten Platten mittels eines Phosphorimager SI (Molecular Dynamics, Sunnydale, USA) eingelesen und unter

Verwendung der ImageQuant Software (Molecular Dynamics, Sunnydale, USA) aufgenommen. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte durch Einsatz der Phoretix Array v3.11 Software von Nonlinear Dynamics (Newcastle upon Tyne, GB).

### **2.2.3. Biochemische Methoden**

#### **2.2.3.1. Bestimmung der Konzentration von Chemokinen und Zytokinen mittels ELISA**

*Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays* (ELISA) stellen eine quantitative, analytische Methode dar. Eingesetzt werden ELISA zum Nachweis sowie zur Charakterisierung ausgewählter Moleküle auf der Grundlage einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Ein Reaktionspartner ist dabei jeweils markiert, so dass eine messbare Nachweisreaktion ablaufen kann. Die Intensität der Nachweisreaktion ermöglicht final eine Quantifizierung der betreffenden Proteine (im Vgl. zu einem Standard). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zum Nachweis von Zytokinen und Chemokinen in den Kulturüberständen (un-)stimulierter Zellen Sandwich-ELISA als ein Vertreter der drei Grundtypen des ELISA (sequenziell, kompetitiv, Sandwich) durchgeführt.

##### **2.2.3.1.1 Konventioneller Sandwich-ELISA**

An dieser Stelle soll kurz das Prinzip der durchgeführten Sandwich-ELISA dargestellt werden. Zum Nachweis des gewählten Zyto- oder Chemokins wurde zunächst eine 96-*well* Mikrotiterplatte mit dem Fänger-Ak gegen das Molekül der Wahl über Nacht (12-16 h) bei 4°C beschichtet, 1 x mit ELISA-Waschpuffer (1 x PBS mit 0,05% Tween 20) gewaschen und anschließend 1 h bei RT (20-25°C) oder über Nacht (12-16h) bei 4°C blockiert (Blockpuffer richtet sich nach Kit und Hersteller). Nach Waschen (3 x) der Mikrotiterplatte wurden die zu analysierenden Proben aufgetragen und für 2 h bei RT inkubiert, wiederum gewaschen (3 x) und ein biotinylierter Detektions-Ak aufgetragen. Dieser wurde 1-2 h (abhängig von Kit und Hersteller) inkubiert, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation mit Streptavidin-markierter Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP). Danach wurde

die Mikrotiterplatte gründlich gewaschen (5-7 x) und mit TMB-Substrat versehen. Nach ausreichendem Substratumsatz wurde die enzymatische Reaktion durch Gabe von 1 M Schwefelsäure beendet und die OD bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$  in einem ELX 800 Photometer (Biotek Instruments, Winooski, USA) unter Verwendung der *MicroWin 2000 Software* (Mikrotek, Overath) gemessen und ausgewertet. Alle ELISA wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Nachfolgend sind in Tabelle 3 die in der vorliegenden Arbeit verwendeten ELISA zur Analyse humaner Zyto- und Chemokine aus Kulturüberständen aufgeführt:

**Tabelle 3:      Verwendete ELISA-Kits**

Zytokin/Chemokin (human)	Hersteller
IFN- $\gamma$	ebiosciences, R&D Systems
IL-1 $\beta$	R&D Systems
IL-5	ebiosciences
IL-6	Dr. H. Gallati
IL-8	BD
IL-10	ebiosciences, R&D Systems
IL-12p70	ebiosciences, R&D Systems
IL-13	Bender Med Systems
TNF- $\alpha$	ebiosciences, R&D Systems

### 2.2.3.1.2.      Multi-Zytokin-ELISA

Neben der Bestimmung von nur einem Zytokin zur Zeit (s. 2.2.3.1.1.) besteht die Möglichkeit der parallelen Bestimmung mehrerer Zytokine in einer Probe, was eine enorme Materialersparnis bedeutet und bei bestimmten Anwendungen herkömmlichen ELISA vorzuziehen ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden DC parallel auf die Induktion von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 und TNF- $\alpha$  nach Stimulation durch LPS und ManLAM unter Verwendung des *Beadlyte®Human Multi-Cytokine Detection System 2* (Biomol, Hamburg) analysiert. Die Durchführung

erfolgte nach Herstellerangaben, gefolgt von der Messung und Auswertung der Proben mittels Bio-Plex System und der Manager Software 4.0 (Biorad, München).

### **2.2.3.2. Immunfluoreszenzmarkierungen für die Durchflusszytometrie**

Zur phänotypischen Analyse mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression unterschiedlicher Oberflächenantigene auf dendritischen Zellen analysiert. Dazu wurden  $0,1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^6$  DC pro Ansatz nach Waschen in 1 ml Azid-PBS (5 min, 4°C, 500 x g) in Kunststoffröhrchen („FACS-Röhrchen“, Falcon Tubes, Beckton Dickinson, Heidelberg) in Azid-PBS mit 3 % (v/v) Humanserum (HS) resuspendiert. Entsprechend der Herstellerangaben wurden die jeweiligen (Primär-)Ak zur Markierung der gewünschten Oberflächenantigene zu der Zellsuspension gegeben und die Ansätze 20-30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Azid-PBS gewaschen. Wurden zur Färbung direkt mit einem Fluorophor markierte Primär-Ak verwendet, so wurden die Zellen nach dem Waschen in Azid-PBS aufgenommen und die spezifisch gebundenen Ak durch Gabe von 3 % p-Formaldehyd im Verhältnis 1:1 (i. d. R. je 150 µl) unter Schütteln fixiert. Waren die Primär-Ak nicht direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, so wurden die Zellen nach dem Waschen erneut in Azid-PBS mit 3 % HS aufgenommen, entsprechend den Herstellerangaben markierte Sekundär-Ak dazugegeben, die Zellen 15 min bei 4°C inkubiert, gewaschen und anschließend wie beschrieben fixiert. Die fixierten Zellen wurden innerhalb von 5 bis 7 Tagen an einem Durchflusszytometer (FACS-Calibur, Beckton Dickinson, Heidelberg) bezüglich der Expression ihrer gefärbten Oberflächenantigene analysiert. Als Negativkontrolle wurden Ak entsprechenden Isotyps gegen ein irrelevantes Ag verwendet. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen erfolgte stets unter Verwendung der WinMDI 2.8 Software (J. Trotter, Scripps Institute, Kalifornien, USA).

### **2.2.3.3. Färbung von Mykobakterien**

Zur Analyse mykobakterieller Bindung an dendritische Zellen wurden Mykobakterien nach deren Markierung mit Fluoresceinthiocyanat (FITC) verwendet. Dazu wurden

Mykobakterienkulturen *M. bovis* BCG, *M. chelonae* bzw. *M. smegmatis* bis zu einer  $OD_{600nm} = 0,4 - 0,6$  angezogen, die gewünschte Zellzahl (i. d. R.  $100-200 \times 10^6$  Mykobakterien) entnommen und 10 min bei  $2000 \times g$  und  $4^\circ C$  zentrifugiert. Die Korrelation von optischer Dichte und CFU wurde zuvor anhand einer Eichkurve ermittelt. Daraus ergaben sich folgende Werte als Grundlage der Berechnungen:

- *M. bovis* BCG                       $OD_{600nm} = 1$  entsprechen  $70 \times 10^6$  CFU/ml
- *M. chelonae*                         $OD_{600nm} = 1$  entsprechen  $230 \times 10^6$  CFU/ml
- *M. smegmatis*                       $OD_{600nm} = 1$  entsprechen  $300 \times 10^6$  CFU/ml.

Nach Zentrifugation der Mykobakterien wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml FITC-Färbelösung ([1 mg/ml] FITC in [1 M]  $Na_2CO_3$  und 0,05 % (v/v) Tween 80 vor Benutzung frisch gelöst und steril filtriert) resuspendiert und die Mykobakterien 30 min unter Schütteln bei  $37^\circ C$  gefärbt. Anschließend wurden die Mykobakterien 2-4 x in PBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20 gewaschen (10 min,  $4^\circ C$ ,  $2000 \times g$ ) bis der Überstand klar war. Danach wurden die Mykobakterien in PBS aufgenommen und in das jeweilige Bindungsexperiment eingesetzt.

#### **2.2.3.4. Analyse mykobakterieller Bindung an dendritische Zellen**

Um die Interaktion von Mykobakterien mit dendritischen Zellen zu untersuchen, wurden FITC-markierte Mykobakterien in der MOI 1-2 mit diesen koinkubiert. In Abhängigkeit des jeweiligen Ansatzes ging eine Inkubation (15 min) der dendritischen Zellen mit Mannan [100  $\mu g/ml$ ],  $\alpha$ -DC-SIGN-Ak [10  $\mu g/ml$ ] bzw. Isotypkontrolle gleicher Konzentration zur Inhibition der mykobakteriellen Bindung voraus. Die Koinkubation der dendritischen Zellen mit den Mykobakterien erfolgte zunächst über einen Zeitraum von 30 min bis 18 h bei  $37^\circ C$ . Nach Ermittlung des optimalen Untersuchungszeitpunktes wurde in Folgeexperimenten eine Koinkubationszeit von 2 h gewählt. Zur Visualisierung der Interaktion der Mykobakterien mit den dendritischen Zellen wurden diese in Azid-PBS in FACS-Röhrchen überführt und sofort im Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung erfolgte wie unter 2.2.3.2. beschrieben.

### III. ERGEBNISSE

#### 3.1. Mannosyliertes Lipoarabinomannan von *M. tuberculosis* H37Rv als Immunmodulator

Die Interaktion von Mykobakterien mit dendritischen Zellen wird durch eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen vermittelt. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass mannosyliertes Lipoarabinomannan im Rahmen der Interaktion von Mykobakterien des TB-Komplexes mit dendritischen Zellen eine herausragende Stellung einnimmt. Experimentelle Befunde zeigen zusätzlich eine Modulation der LPS-induzierten IL-10-Sekretion dendritischer Zellen durch isoliertes mannosyliertes Lipoarabinomannan in Folge der Ligation des Oberflächenrezeptors DC-SIGN (100). Bisher wurden jedoch noch nicht die immunmodulatorischen Eigenschaften von isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan ohne Verwendung von LPS als zusätzlichem aktivierenden Stimulus untersucht. Die Modulation von Immunantworten in Kombination mit anderen aktivierenden Stimuli abgesehen von LPS wurde ebenfalls noch nicht analysiert. Auch der Einfluss von isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan auf andere Zytokine neben IL-10 sowie mögliche Effekte auf nachgeschaltete T-Zell-vermittelte Immunantworten ist noch unklar.

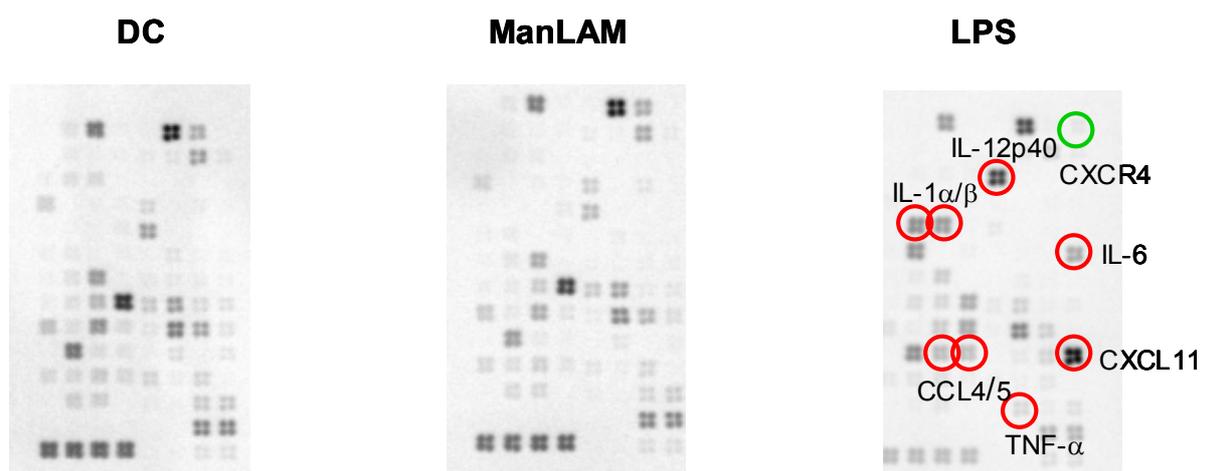
##### 3.1.1. Analyse des immunmodulatorischen Potenzials von mannosyliertem Lipoarabinomannan

Basierend auf den unter 3.1. beschriebenen Erkenntnissen, und um einen weit reichenden Eindruck über das mögliche immunmodulatorische Potenzial von mannosyliertem Lipoarabinomannan aus *M. tuberculosis* H37Rv zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst Genexpressionsanalysen durchgeführt. Zur Kontrolle der erfolgreichen Stimulation wurde LPS verwendet.

In Abbildung 2 ist der cDNA-Microarray „*Human Inflammatory Cytokines, Chemokines and their Receptors*“ dargestellt. Mithilfe dieses cDNA-Micorarrays kann das Genexpressionsmuster von Zytokinen, Chemokinen und der dazugehörigen Rezeptoren analysiert werden, die im Verlauf inflammatorischer Prozesse

differenziell reguliert werden, zum Beispiel die pro-inflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- $\alpha$ , das regulatorische Zytokin IL-10 oder die Chemokinrezeptoren CCR-3 und CCR-5.

Die Analyse des Transkriptionsprofils ergab, dass mannosyliertes Lipoarabinomannan selber keine Zytokine oder Chemokine in dendritischen Zellen induziert und auch nicht die Expression von entsprechenden Rezeptoren moduliert. Unter Verwendung von LPS als Stimulus hingegen wurde ein klassisches Zytokinmuster aktivierter dendritischer Zellen erhalten. Pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-12/23p40 und TNF- $\alpha$  konnten erwartungsgemäß induziert und nachgewiesen werden, ebenso Chemokine wie CCL4 (RANTES) und CCL5 (MIP-1 $\beta$ ).

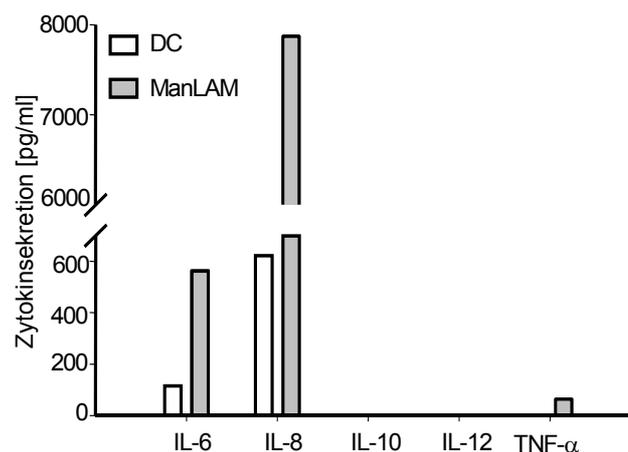


**Abbildung 2:** cDNA-Microarray-Analysen des mRNA-Transkriptionsprofils inflammatorischer Zytokine und ihrer Rezeptoren in stimulierten und unstimulierten DC. Zur Analyse des Transkriptionsprofils wurden *in vitro* differenzierte DC (je 500 U/ml IL-4 und GM-CSF) mit LPS [10 ng/ml] bzw. ManLAM [10  $\mu$ g/ml] stimuliert, die RNA von drei Spendern isoliert, vor der radioaktiven Markierung ( $^{33}$ P) vereinigt und auf den entsprechenden Membranen (*Human Inflammatory Cytokines and their Receptors* cDNA-Microarray, Superarray) hybridisiert. Dargestellt sind die Membranen nach Hybridisierung und Detektion. Rote Markierungen zeigen exemplarisch durch LPS-Stimulation heraufregulierte Gene, grüne Markierungen durch LPS-Stimulation herabregulierte Gene.

Zusätzlich zu dem hier aufgeführten cDNA-Microarray wurden noch weitere Analysen unter Verwendung anderer cDNA-Microarrays durchgeführt („Antigen Presenting Cell Array“, „Immune Signalling Pathways“, „Signal Transduction Array“), die das beschriebene Ergebnis bestätigen. Als alleiniger Stimulus fungiert mannosyliertes

Lipoarabinomannan nicht als Immunmodulator, induziert keine Zytokine oder Chemokine *de novo* und initiiert somit auch keine Signalkaskaden.

Parallel zu den cDNA-Microarray-Analysen wurden die Kulturüberstände dendritischer Zellen bezüglich der Sekretion von Zytokinen nach Stimulation mit mannosyliertem Lipoarabinomannan untersucht. Die daraus erhaltenen Daten bestätigen die Ergebnisse der durchgeführten cDNA-Microarray-Analysen. Mannosyliertes Lipoarabinomannan induziert keine Zytokine oder auch Chemokine *de novo* (Abbildung 3). Lediglich die für Lipoarabinomannan bereits beschriebene, sehr geringe Induktion von TNF- $\alpha$  konnte nachgewiesen werden. Konstitutiv von dendritischen Zellen exprimierte Zytokine bzw. Chemokine wie IL-6 und IL-8 hingegen wurden nach Stimulation mit mannosyliertem Lipoarabinomannan verstärkt sekretiert (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Analyse der DC-Aktivierung nach Stimulation mit ManLAM auf Zytokinebene (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$ ). *In vitro* generierte DC (je 500 U/ml IL-4 und GM-CSF) wurden für 18 h stimuliert (ManLAM [10  $\mu$ g/ml]). Weiße Säulen zeigen unstimulierte DC, graue Säulen mit ManLAM stimulierte DC. Die Überstände wurden geerntet und mittels ELISA auf o.g. Zytokine/Chemokine analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei durchgeführten Experimenten pro Zytokin.

Isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan sind demzufolge keine immunmodulatorischen Eigenschaften im Sinne der *de novo* Induktion von Zytokinen oder Chemokinen zuzuschreiben. Die Sekretion konstitutiv exprimierter Zytokine oder Chemokine hingegen wird moduliert, was durch eine gesteigerte Sekretion dieser in Gegenwart von mannosyliertem Lipoarabinomannan erkennbar ist.

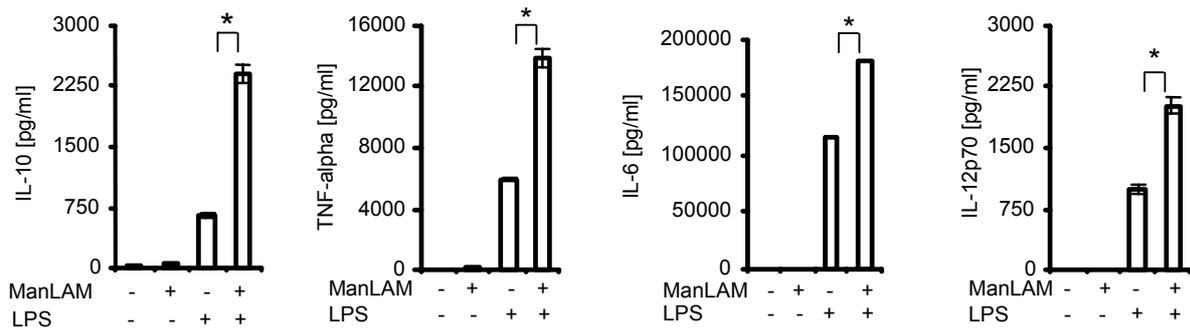
### 3.1.2. Die Rolle von mannosyliertem Lipoarabinomannan im Rahmen der LPS-induzierten Zytokinsekretion - ein Kostimulus

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine alleinige Stimulation dendritischer Zellen mit mannosyliertem Lipoarabinomannan nicht zu einer *de novo* Synthese von Zytokinen oder Chemokinen führt. Daher wurde in den nachfolgenden Experimenten das immunmodulatorische Potenzial des mannosylierten Lipoarabinomannans in Kombination mit einem zusätzlichen aktivierenden Stimulus untersucht.

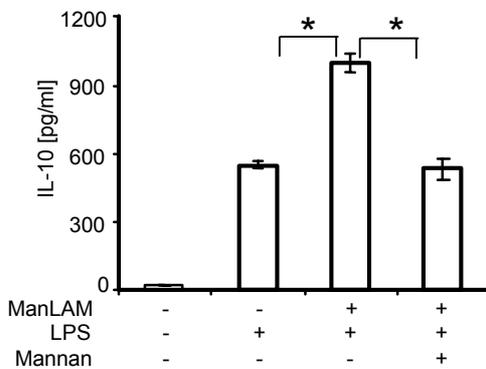
Die durchgeführten Experimente zeigen, dass mannosyliertes Lipoarabinomannan umfassend die LPS-induzierte Zytokinsekretion verstärkt. So wurde sowohl die Sekretion des immunregulatorischen Zytokins IL-10, als auch der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$ , sowie des Th1-assoziierten Zytokins IL-12 in Gegenwart von mannosyliertem Lipoarabinomannan bei der Aktivierung dendritischer Zellen mit LPS synergistisch verstärkt (Abbildung 4 A).

Das kostimulatorische Potenzial von mannosyliertem Lipoarabinomannan ist damit nicht auf eine bestimmte Gruppe von anti- oder pro-inflammatorischen Zytokinen beschränkt, sondern erstreckt sich auf alle gemessenen, durch LPS in den dendritischen Zellen induzierten Zytokine. Neben den hier dargestellten Zytokinen IL-6, IL-12p70 und TNF- $\alpha$  wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch IL-1 $\beta$  und das Chemokin IL-8 analysiert, welche ebenfalls beschriebenes Induktionsprofil aufweisen (Daten nicht gezeigt). Im Vorfeld der Proteinbestimmungen mittels ELISA wurde per quantitativer PCR die Modulation der LPS-induzierten Zytokinantwort (IL-1 $\beta$ , IL-12/23p40, TNF- $\alpha$  und IL-10) durch mannosyliertes Lipoarabinomannan ebenfalls auf transkriptioneller Ebene bestätigt (Daten nicht gezeigt).

A)



B)



C)

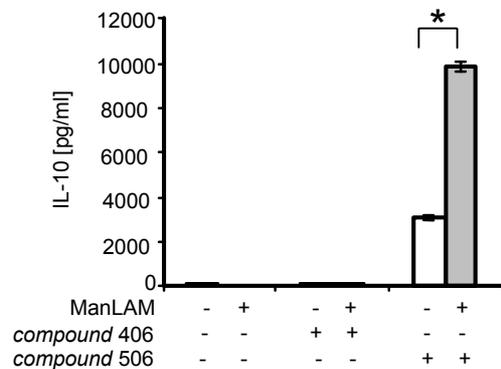


Abbildung 4:

**Einfluss von ManLAM auf die LPS-induzierte Zytokinsekretion.** *In vitro* generierte DC (je 500 U/ml IL-4 und GM-CSF) wurden für 18 h stimuliert (ManLAM [10 µg/ml], LPS [10 ng/ml], Mannan [10 µg/ml], compound 406 [10 ng/ml], compound 506 [100 ng/ml]) und mittels ELISA die Sekretion von IL-6, IL-10, IL-12p70 bzw. TNF- $\alpha$  analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte intraexperimenteller Triplikate  $\pm$  Standardabweichung, wobei ein repräsentatives von drei (B, C) oder mehr (A, s.u.) analog durchgeführten Experimenten gezeigt ist. \* zeigt die statistische Signifikanz (P-Wert < 0,05) an, ermittelt mittels Student's T-Test. Darüber hinaus wurden die Daten (A) aller analysierten Spender einem Wilcoxon-Rangsummen-Test unterzogen, der eine statistisch signifikante Steigerung der Zytokinsekretion durch ManLAM in Gegenwart von LPS gegenüber alleiniger LPS-Stimulation ergab (IL-10 n = 38, TNF- $\alpha$  n = 29, IL-12 n = 9, IL-8 n = 6).

Zur Untersuchung der Mannose-Abhängigkeit der durch mannosyliertes Lipoarabinomannan gesteigerten Zytokinsekretion wurde Mannan als Inhibitor verwendet. Dendritische Zellen wurden nach vorausgegangener Vorinkubation mit Mannan wiederum mit LPS alleine, als auch in Kombination mit mannosyliertem Lipoarabinomannan stimuliert. Die Zugabe von Mannan hemmt die durch mannosyliertes Lipoarabinomannan vermittelte Steigerung der IL-10-Freisetzung

(Abbildung 4 B). Somit handelt es sich um eine Mannose-abhängige Verstärkung der IL-10-Sekretion in Gegenwart von LPS, begründet in der zusätzlichen Interaktion der dendritischen Zellen mit mannosyliertem Lipoarabinomannan.

Es ist unklar, ob die Mannose-abhängige, synergistische Verstärkung der durch LPS induzierten IL-10-Sekretion einer Aktivierung von TLR-4 oder lediglich einer Ligation von TLR-4 bedarf. Zur Klärung dieser Frage, ob mannosyliertes Lipoarabinomannan einen echten Kostimulus darstellt, wurden agonistisch und antagonistisch wirksame synthetische Lipid A Analoga verwendet. Lipid A stellt im Rahmen der Biosynthese von LPS eine Vorstufe dessen dar und zeichnet sich durch seine hohe biologische Aktivität aus. Die biologische Wirksamkeit von LPS beruht auf dem Lipid A. In den durchgeführten Experimenten wurden die synthetischen Lipid A Analoga *compound 406* und *compound 506* verwendet, die sich in ihrer Acylierung unterscheiden. Bei *compound 406* handelt es sich um einen auf humanen Zellen nicht-aktivierenden TLR-4-Liganden (TLR-4-Antagonist), wohingegen die *compound 506* einen aktivierenden TLR-4-Liganden (TLR-4-Agonist) für humane Zellen darstellt. Kombiniert man *compound 406* beziehungsweise *compound 506* mit mannosyliertem Lipoarabinomannan, so führt lediglich die aktivierende Ligation von TLR-4 durch *compound 506* in Kombination mit mannosyliertem Lipoarabinomannan zu einer gesteigerten IL-10-Sekretion im Vergleich zu alleiniger Stimulation mit *compound 506*. Eine reine Ligation von TLR-4 durch *compound 406* resultiert auch in Gegenwart von mannosyliertem Lipoarabinomannan nicht in der Induktion von Zytokinen (Abbildung 4 C).

Abschließend ist somit festzuhalten, dass es sich bei isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan um ein Molekül mit kostimulatorischen Eigenschaften handelt, dessen immunmodulatorisches Potenzial an eine Aktivierung der dendritischen Zelle durch einen anderen Stimulus gebunden ist und Mannose-abhängig vermittelt wird.

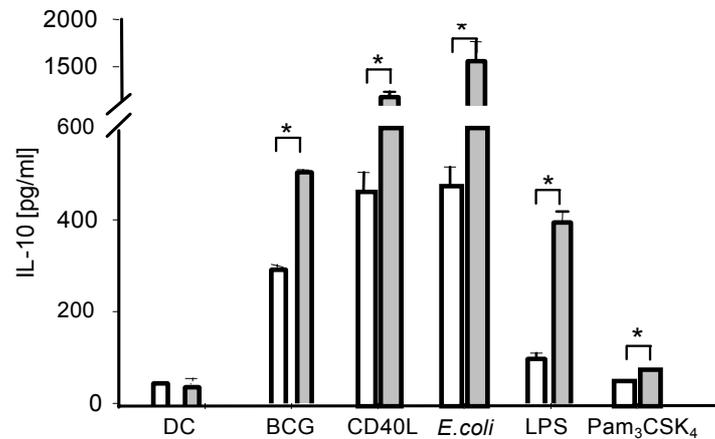
### **3.1.3. Kostimulatorisches Potenzial von mannosyliertem Lipoarabinomannan im Rahmen TLR-abhängiger und TLR-unabhängiger Aktivierung dendritischer Zellen**

Im bisherigen Verlauf der Arbeit konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Analyse der TLR-4-vermittelten Zellaktivierung. Es konnte gezeigt werden, dass eine aktivierende Ligandierung von TLR-4 durch LPS in Kombination mit einer Mannose-abhängigen Interaktion von mannosyliertem Lipoarabinomannan die Sekretion eines breiten Spektrums an Zytokinen durch dendritische Zellen moduliert. Nachfolgend sollte nun untersucht werden, ob das immunmodulatorische Potenzial des mannosylierten Lipoarabinomannans auf eine aktivierende Ligandierung von TLR-4 beschränkt ist, oder ob auch weitere Mechanismen der Aktivierung dendritischer Zellen durch mannosyliertes Lipoarabinomannan modulierbar sind. Dazu wurden *M. bovis* BCG (z.B. TLR-2, (54)), CD40L (CD40), *E. coli* (z.B. TLR-4), Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (TLR-2) sowie LPS (TLR-4) zur Stimulation der dendritischen Zellen eingesetzt und mit mannosyliertem Lipoarabinomannan kombiniert.

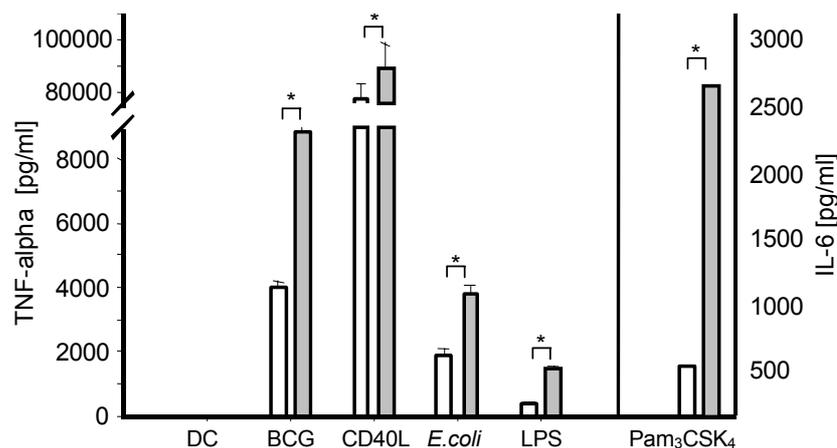
Interessanterweise verstärkt mannosyliertes Lipoarabinomannan die Sekretion des regulatorischen Zytokins IL-10 sowie der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  bzw. IL-6 (Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> induziert kein TNF- $\alpha$ ) bei Aktivierung der dendritischen Zellen durch alle der getesteten TLR-abhängigen als auch TLR-unabhängigen Stimuli (Abbildung 5 A und B). Das kostimulatorische Potenzial von mannosyliertem Lipoarabinomannan ist demnach nicht auf eine aktivierende Ligandierung von TLR-4 durch LPS beschränkt.

Zusammengefasst zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass isoliertes mannosyliertes Lipoarabinomannan aus *M. tuberculosis* H37Rv zwar nicht als eigenständiger Induktor einer Zytokinantwort in humanen, *in vitro* generierten dendritischen Zellen wirkt, aber eine anderweitig induzierte Aktivierung der dendritischen Zellen moduliert. Dabei verstärkt mannosyliertes Lipoarabinomannan TLR-abhängige als auch TLR-unabhängige Signale und moduliert ein breites Spektrum unterschiedlich immunologisch wirksamer Zytokine. Somit handelt es sich hierbei zunächst um eine quantitative, nicht jedoch qualitative Modulation der Immunantworten dendritischer Zellen.

A)



B)



**Abbildung 5: Analyse des kostimulatorischen Potenzials von ManLAM in Kombination mit unterschiedlichen TLR-abhängigen und TLR-unabhängigen Liganden.** *In vitro* generierte DC (je 500 U/ml IL-4 und GM-CSF) wurden für 18 h stimuliert (*M. bovis* BCG und *E. coli* MOI = 1, CD40L MOI = 0,1, Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> [100 nM], LPS [10 ng/ml]) und mittels ELISA die Sekretion von IL-10 und TNF- $\alpha$  ermittelt. Weiße Säulen zeigen Einzelstimulation der DC, graue Säulen die Kostimulation mit ManLAM. Dargestellt sind die Mittelwerte intraexperimenteller Triplikate +/- Standardabweichung, wobei ein repräsentatives von drei analog durchgeführten Experimenten gezeigt ist. \* zeigt die statistische Signifikanz (P-Wert < 0,05) an, ermittelt mittels Student's T-Test.

### **3.1.4. Das kostimulatorische Potenzial von mannosyliertem Lipoarabinomannan ist beschränkt auf DC-SIGN<sup>pos</sup> dendritische Zellen**

Die Interaktion des mannosylierten Lipoarabinomannans mit dem Rezeptor DC-SIGN basiert auf der Erkennung Mannose-haltiger Endstrukturen. Die Mannose-Abhängigkeit der gesteigerten Sekretion von Zytokinen in Gegenwart von LPS und mannosyliertem Lipoarabinomannan konnte bereits gezeigt werden. Weitere Bindungspartner für das mannosylierte Lipoarabinomannan auf dendritischen Zellen sind jedoch nicht auszuschließen. Somit kann zum jetzigen Zeitpunkt lediglich von einer Mannose-, nicht aber von einer DC-SIGN-Abhängigkeit der bisherigen Befunde gesprochen werden. Um die Rolle von DC-SIGN im Rahmen der Modulation der Immunantwort dendritischer Zellen durch mannosyliertes Lipoarabinomannan zu untersuchen, wurden dendritische Zellen generiert, die den Rezeptor DC-SIGN entweder auf der Oberfläche exprimieren oder nicht exprimieren. Die konventionelle Methode der Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten in Gegenwart von IL-4 und GM-CSF resultiert in unreifen dendritischen Zellen, die den Rezeptor DC-SIGN (CD209) auf ihrer Oberfläche exprimieren. Wird statt IL-4 jedoch IFN- $\alpha$  verwendet, so erhält man halbreife dendritische Zellen, die den Rezeptor DC-SIGN nicht oder nur schwach auf ihrer Oberfläche exprimieren, da die Expression von DC-SIGN einerseits IL-4-abhängig und andererseits durch IFN- $\alpha$  reprimiert ist. Zur Untersuchung der DC-SIGN-Abhängigkeit der Modulation der Immunantwort dendritischer Zellen im Rahmen der Kostimulation mit LPS und isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan wurden diese beiden Zellpopulationen aus den Monozyten desselben Spenders generiert. Nach immunphänotypischer Analyse wurde vergleichend deren Antwortverhalten auf isoliertes mannosyliertes Lipoarabinomannan betrachtet.

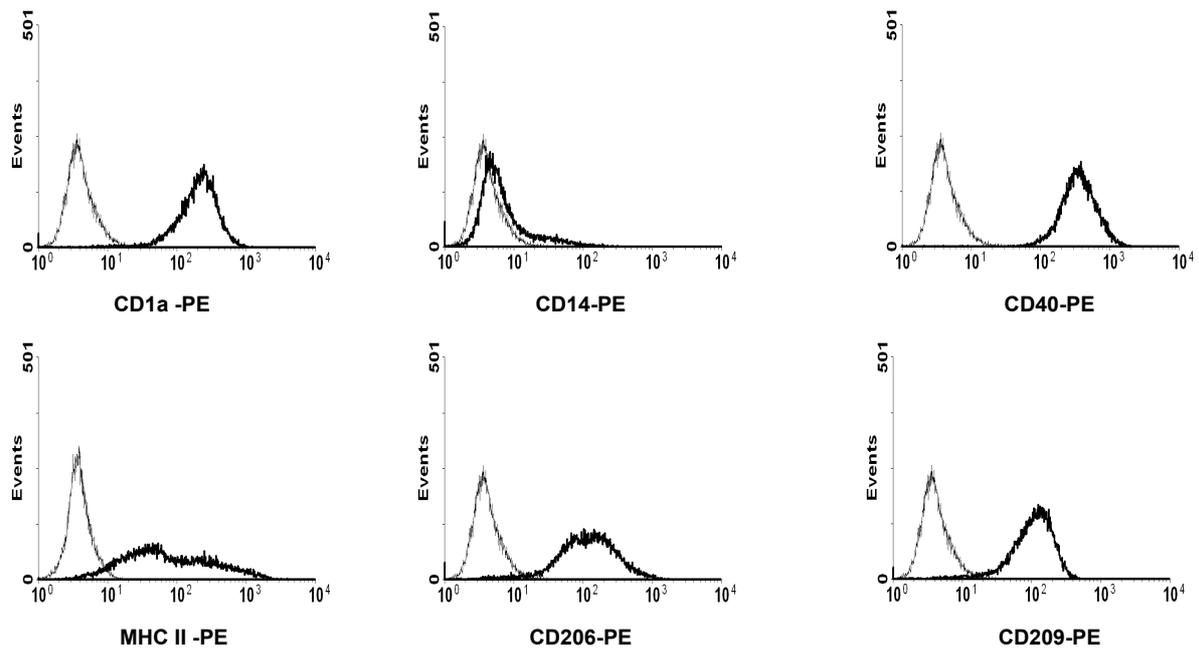
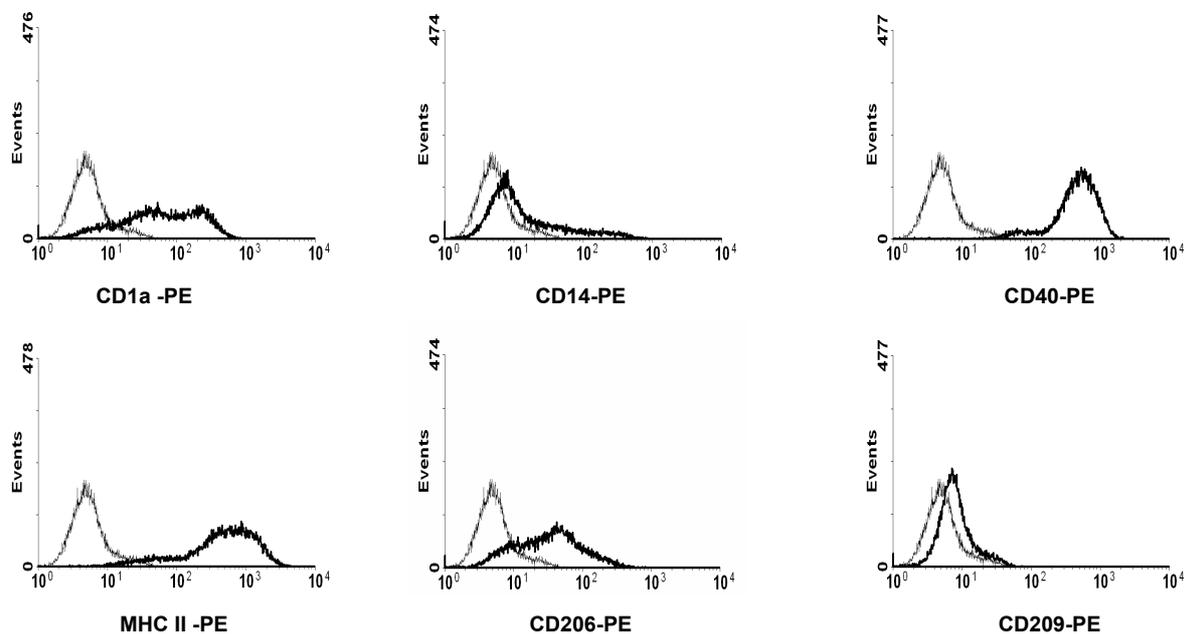
#### **3.1.4.1. Immunphänotypische Analyse DC-SIGN<sup>pos</sup> und DC-SIGN<sup>neg</sup> dendritischer Zellen**

Bedingt durch die unterschiedlichen Differenzierungsmethoden können neben der hier gewünschten differenziellen Expression von DC-SIGN auch weitere

Veränderungen der dendritischen Zellen bezüglich des Phänotyps, des Aktivierungsstatus oder auch der Funktionalität resultieren. Um einen Eindruck zu bekommen, ob es sich trotz unterschiedlicher Generierungsbedingungen um vergleichbare Antigen-präsentierende Zellen handelt, wurde eine Immunphänotypisierung DC-SIGN<sup>pos</sup> sowie DC-SIGN<sup>neg</sup> dendritischer Zellen durchgeführt (Abbildung 6 A und B).

Die Differenzierung dendritischer Zellen aus Monozyten in Gegenwart von IL-4 und GM-CSF führt, wie zuvor erwähnt, zum Erhalt unreifer dendritischer Zellen. Unter Verwendung von IFN- $\alpha$  und GM-CSF werden halbreife dendritische Zellen generiert. Die Reifungsstadien dendritischer Zellen zeichnen sich neben der differentiellen Expression einiger Oberflächenantigene auch durch eine unterschiedliche Morphologie aus und sind daher bereits mikroskopisch gut unterscheidbar. Konventionell generierte dendritische Zellen bilden eine gemischte Kultur aus Zellen in Suspension und Zellen, die schwach an dem Boden der Kulturplatte adhärirt sind. Die dendritischen Zellen liegen vereinzelt vor, zeigen eine heterogene Morphologie und weisen Dendriten auf. Bei Differenzierung dendritischer Zellen in Gegenwart von IFN- $\alpha$  und GM-CSF neigen diese geringfügig zur Bildung von Zellhaufen. Das weist darauf hin, dass es sich bei diesen Zellen um bereits leicht aktivierte, also halbreife, dendritische Zellen handelt. Auch hier zeigt sich eine sehr heterogene Zellmorphologie. Typische dendritische Strukturen sind ebenfalls erkennbar (Daten nicht gezeigt).

Die Immunphänotypisierung konventionell generierter DC-SIGN<sup>pos</sup> dendritischer Zellen ergab, dass charakteristische Marker dendritischer Zellen wie CD1a, CD40 und MHC II exprimiert werden. CD14 (Marker für Monozyten, Makrophagen) ist hingegen nicht auf der Zelloberfläche vorhanden. Das C-Typ-Lectin DC-SIGN, CD209, ist deutlich exprimiert, ebenso der Mannose-Rezeptor, CD206, (Abbildung 6 A). Betrachtet man vergleichend den Phänotyp DC-SIGN<sup>neg</sup> DC (dargestellt in Abbildung 6 B), so ist festzuhalten, dass in Analogie zu dem Phänotyp der DC-SIGN<sup>pos</sup> DC CD1a, CD40 und MHC II ebenfalls exprimiert werden. CD14 ist ebenfalls nicht exprimiert. Das C-Typ-Lectin DC-SIGN (CD209) ist nur schwach auf der Zelloberfläche nachweisbar. Die Expression des Mannose-Rezeptors (CD206) bleibt bestehen.

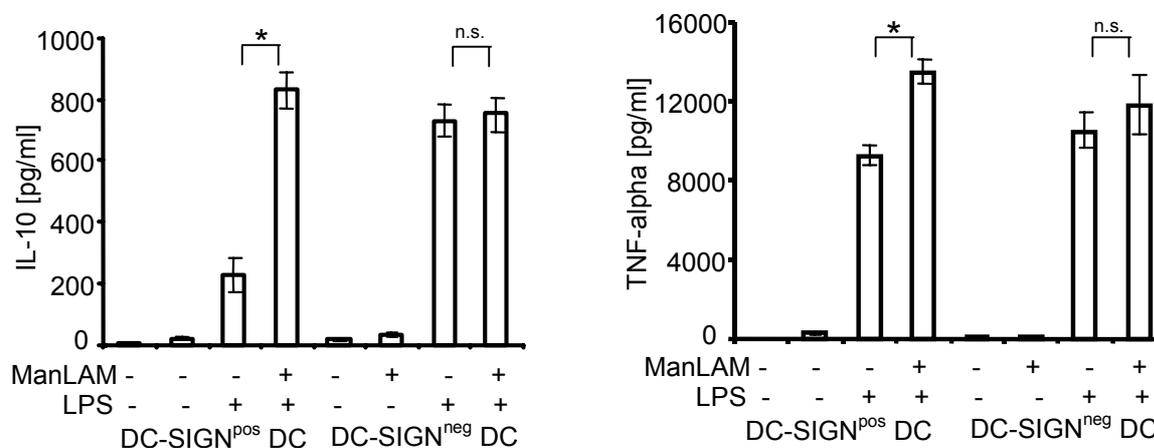
A) Immunphänotypisierung DC-SIGN<sup>pos</sup> dendritischer ZellenB) Immunphänotypisierung DC-SIGN<sup>neg</sup> dendritischer Zellen

**Abbildung 6:** Immunphänotypisierung DC-SIGN<sup>pos</sup> und DC-SIGN<sup>neg</sup> DC. *In vitro* differenzierte DC (je 500 U/ml IL-4 und GM-CSF bzw. je 1000 U/ml IFN- $\alpha$  und GM-CSF) wurden geerntet und einer Oberflächenfärbung von CD1a, CD14, CD40, MHC II, CD206 und CD209 sowie den entsprechenden Isotypkontrollen unter Verwendung PE-konjugierter Antikörper unterzogen und im Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt sind Histogramme, in denen jeweils die spezifische Färbung (dick, schwarz) im Vergleich zu der betreffenden Isotypkontrolle (dünn, grau) dargestellt ist (log. Auftrag der mittleren Fluoreszenzintensität). Gezeigt ist ein repräsentatives von drei analog durchgeführten Experimenten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Expression typischer Marker dendritischer Zellen wie CD1a, CD40, CD206 oder MHC II nicht oder nur geringfügig verändert ist, wenn Monozyten in Gegenwart von IL-4 und GM-CSF oder IFN- $\alpha$  und GM-CSF zu dendritischen Zellen generiert werden. Somit handelt es sich bei den eingesetzten dendritischen Zellen um vergleichbare Zellpopulationen mit differenzieller Expression des Oberflächenrezeptors DC-SIGN.

### 3.1.4.2. Analyse der Zytokinsekretion DC-SIGN<sup>pos</sup> und DC-SIGN<sup>neg</sup> dendritischer Zellen

Nach immunphänotypischer Analyse der zuvor beschriebenen Populationen dendritischer Zellen wurde deren Antwortverhalten auf mannosyliertes Lipoarabinomannan im Rahmen einer LPS-Stimulation untersucht.

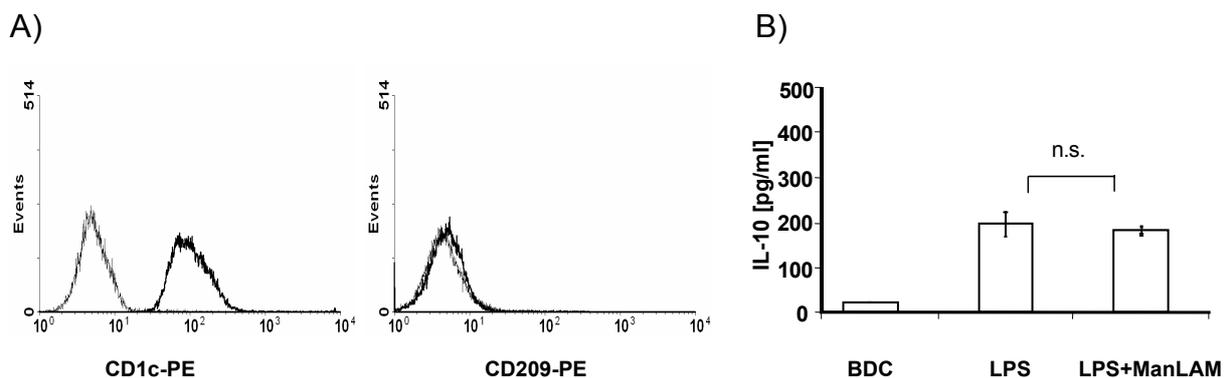


**Abbildung 7:** Zytokinproduktion *in vitro* generierter DC-SIGN<sup>pos</sup> und DC-SIGN<sup>neg</sup> DC. *In vitro* differenzierte DC (je 500 U/ml IL-4 und GM-SCF bzw. je 1000U/ml IFN- $\alpha$  und GM-CSF) wurden für 18 h stimuliert (ManLAM [10  $\mu$ g/ml], LPS [10 ng/ml]) und mittels ELISA die Sekretion von IL-10 sowie TNF- $\alpha$  analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte intraexperimenteller Triplikate +/- Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei analog durchgeführten Experimenten. \* zeigt die statistische Signifikanz an (P-Wert < 0,05), ermittelt mittels Student's T-Test. Darüber hinaus wurden die Daten aller analysierten Spender (n = 6) einem Wilcoxon-Rangsummen-Test unterzogen, der für die o.g. Zytokine eine statistisch signifikante Steigerung der Zytokinsekretion durch ManLAM in Gegenwart von LPS gegenüber LPS als alleinigem Stimulus bei Aktivierung DC-SIGN<sup>pos</sup> DC ergab.

Die Modulation der Immunantwort dendritischer Zellen durch mannosyliertes Lipoarabinomannan ist an die Expression von DC-SIGN auf der Zelloberfläche gebunden. Fehlt DC-SIGN, so erfolgt keine Steigerung der LPS-induzierten Zytokinsekretion. Dies gilt sowohl für das regulatorische Zytokin IL-10 als auch das pro-inflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  (Abbildung 7).

Zusammenfassend lässt sich damit festhalten, dass die gesteigerte Sekretion von Zytokinen im Rahmen einer kombinierten Stimulation dendritischer Zellen mit LPS und mannosyliertem Lipoarabinomannan nicht nur Mannose-abhängig ist, sondern auch streng mit der Expression von DC-SIGN korreliert.

Zusätzlich zu *in vitro* generierten DC-SIGN<sup>neg</sup> dendritischen Zellen wurden frisch isolierte dendritische Zellen des peripheren Blutes (BDC) in ihrer Antwortfähigkeit auf mykobakterielles ManLAM *ex vivo* untersucht. BDC zeichnen sich durch die Expression von CD1c (134) und das Fehlen von DC-SIGN aus (Abbildung 8 A).



**Abbildung 8:** **A) CD1c- und DC-SIGN (CD209)-Expression frisch isolierter BDC.** Frisch isolierte BDC wurden einer Oberflächenfärbung von CD1c und CD209 unter Verwendung PE-konjugierter Ak sowie der entsprechenden Isotypkontrollen unterzogen und dann im FACS analysiert. Dargestellt sind Histogramme, in denen jeweils die spezifische Färbung (dick, schwarz) im Vergleich zu der betreffenden Isotypkontrolle (dünn, grau) gezeigt ist (log. Auftrag der mittleren Fluoreszenzintensität). Gezeigt ist ein repräsentatives von drei analog durchgeführten Experimenten. **B) IL-10-Sekretion frisch isolierter DC-SIGN<sup>neg</sup> BDC *ex vivo*.** Frisch isolierte BDC wurden in Kultur genommen und für 18 h stimuliert (LPS [2  $\mu$ g/ml], ManLAM [10  $\mu$ g/ml]). Dargestellt sind die Mittelwerte intraexperimenteller Triplikate  $\pm$  Standardabweichung, wobei ein repräsentatives von drei analog durchgeführten Experimenten gezeigt ist. \* zeigt die statistische Signifikanz an (P-Wert < 0,05), ermittelt mittels Student's T-Test.

Die Stimulation frisch isolierter BDC mit LPS führte zu einer Induktion von IL-10, die jedoch nicht durch die zusätzliche Gabe von mannosyliertem Lipoarabinomannan gesteigert wurde (Abbildung 8 B). DC-SIGN<sup>neg</sup> dendritische Zellen reagieren

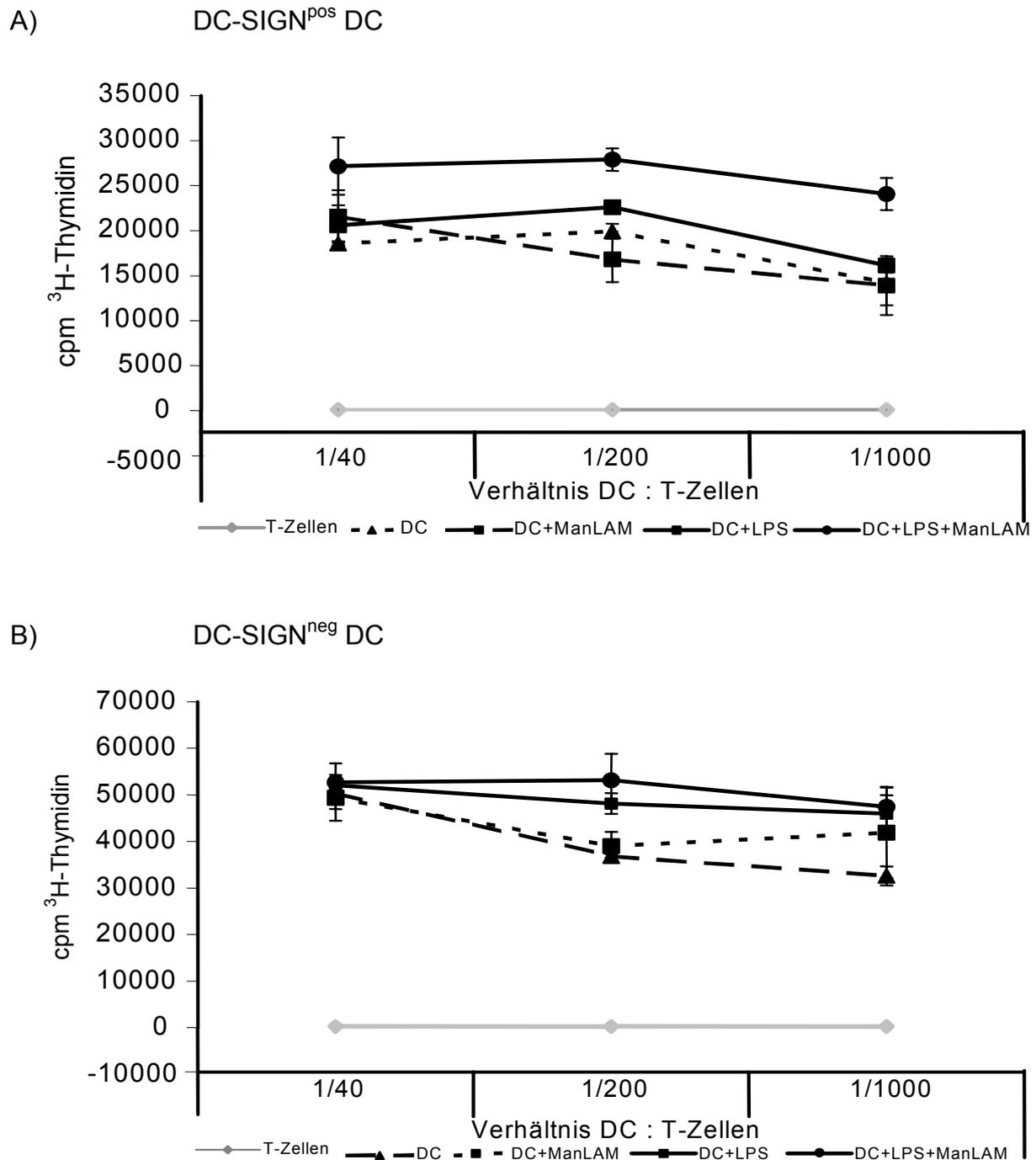
demnach nicht mit einer gesteigerten Zytokinfreisetzung auf die Gabe von mannosyliertem Lipoarabinomannan. Das kostimulatorische Potenzial von mannosyliertem Lipoarabinomannan ist beschränkt auf die Modulation der Aktivierung DC-SIGN<sup>pos</sup> dendritischer Zellen.

### **3.1.5. Einfluss von mannosyliertem Lipoarabinomannan auf die Aktivierung von T-Zellen**

In der Einleitung wurde die essenzielle Rolle dendritischer Zellen im Rahmen der Initiierung und Polarisierung adaptiver Immunantworten illustriert. Die Qualität der induzierten nachgeschalteten Immunantworten steht in engem Zusammenhang mit der vorausgegangenen Aktivierung der dendritischen Zellen. Wie einleitend beschrieben, zeichnen sich unreife dendritische Zellen durch ein geringes und reife dendritische Zellen durch ein hohes lymphostimulatorisches Potenzial aus und können somit effektiv Antigene an T-Zellen präsentieren. Da isoliertes mannosyliertes Lipoarabinomannan die Zytokinsekretion und damit die Aktivierung dendritischer Zellen deutlich moduliert, wurde im folgenden Teil der Arbeit ein möglicher Einfluss von mannosyliertem Lipoarabinomannan auf die durch dendritische Zellen vermittelte T-Zell-Aktivierung analysiert. Dabei kamen unterschiedliche Testsysteme zur Anwendung, mit deren Hilfe sowohl die Aktivierung naiver T-Zellen als auch die Aktivierung von Gesamt-T-Zellen untersucht wurde.

#### **3.1.5.1. Antigen-unabhängige T-Zell-Aktivierung**

Als professionell Antigen-präsentierende Zellen sind DC in der Lage, die Proliferation unterschiedlicher T-Zell-Subpopulation zu induzieren. Hierbei zeichnen sich dendritische Zellen im Gegensatz zu anderen, nicht professionell Antigen-präsentierenden Zellen wie Monozyten oder Makrophagen, funktionell dadurch aus, dass sie die einzige Zellpopulation darstellen, die in der Lage ist, die Proliferation naiver T-Zellen (gekennzeichnet durch die Expression von CD45RA) zu induzieren. Nachfolgend wurde die Antigen-unabhängige T-Zell-Aktivierung in Abhängigkeit von mannosyliertem Lipoarabinomannan untersucht.



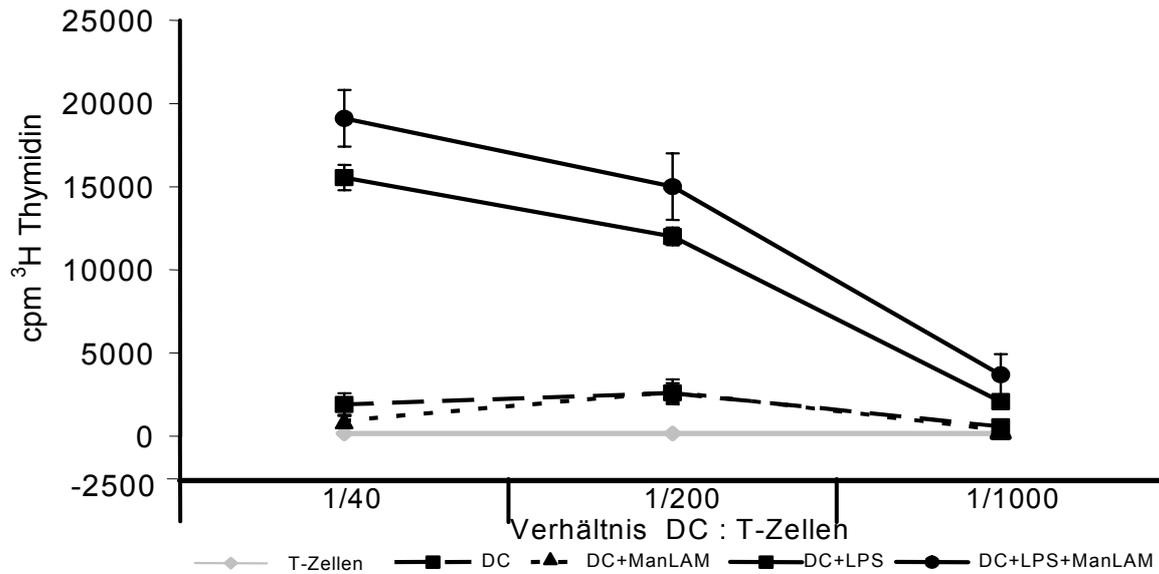
**Abbildung 9:** Proliferation von Gesamt-T-Zellen im Rahmen Antigen-unabhängiger T-Zell-Aktivierung (gemischte Lymphozytenreaktion, MLR) in Gegenwart von DC-SIGN<sup>pos</sup> (A) und DC-SIGN<sup>neg</sup> (B) DC. *In vitro* differenzierte DC (je 500 U/ml IL-4 und GM-CSF bzw. je 1.000 U/ml IFN- $\alpha$  und GM-CSF) wurden für 24 h aktiviert (LPS [10 ng/ml] und/oder ManLAM [10  $\mu$ g/ml]). Nach Waschen der DC wurden diese mit Gesamt-T-Zellen in den angegebenen DC- zu T-Zell-Verhältnissen im Rahmen einer MLR kokultiviert. Nach fünf Tagen Kokultur wurden die T-Zellen durch Zugabe von <sup>3</sup>H-Thymidin (1 $\mu$ Ci/100.000 T-Zellen) radioaktiv markiert und anschließend der Thymidineinbau als Maß für proliferierende T-Zellen nach Ernte der lysierten Zellen auf Filtermatten und Messung dieser in einem  $\beta$ -Szintillationscounter bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives von fünf analog durchgeführten Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte intraexperimenteller Quadruplets +/- Standardabweichung.

Zunächst wurde die Proliferation von Gesamt-T-Zellen nach Kokultur mit DC-SIGN<sup>pos</sup> und DC-SIGN<sup>neg</sup> dendritischen Zellen im Rahmen einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) analysiert, die zuvor einer Kostimulation durch LPS und mannosyliertem Lipoarabinomannan unterzogen wurden.

Hierbei wird deutlich, dass eine vorangehende Stimulation von DC-SIGN<sup>pos</sup> dendritischen Zellen in Gegenwart von mannosyliertem Lipoarabinomannan zu einer erhöhten T-Zell-Proliferation führt (Abbildung 9 A). Werden hingegen DC-SIGN<sup>neg</sup> dendritische Zellen verwendet, so ist keine verstärkte T-Zell-Proliferation in Abhängigkeit von mannosyliertem Lipoarabinomannan zu erkennen (Abbildung 9 B).

Als professionell Antigen-präsentierende Zellen verfügen dendritische Zellen über die einzigartige Fähigkeit, auch die Proliferation naiver T-Zellen zu induzieren. Daher wurde nach Analyse des Einflusses von mannosyliertem Lipoarabinomannan auf die Proliferation von Gesamt-T-Zellen auch dessen Einfluss auf die Proliferation naiver T-Zellen untersucht. In Kongruenz mit den unter Verwendung von Gesamt-T-Zellen erhaltenen Daten (Abbildung 9 A und B) wird auch die Proliferation naiver T-Zellen in Abhängigkeit von mannosyliertem Lipoarabinomannan gesteigert (Abbildung 10).

Zusammenfassend ist somit festzustellen, dass die Aktivierung dendritischer Zellen in Gegenwart von mannosyliertem Lipoarabinomannan die Proliferation von T-Zellen im Rahmen einer gemischten Lymphozytenreaktion steigert. Hierbei ist verstärkte T-Zell-Proliferation nicht auf eine T-Zell-Subpopulation beschränkt. In Abhängigkeit des mannosylierten Lipoarabinomannans wird die Proliferation unterschiedlicher T-Zell-Subpopulationen (Gesamt-T-Zellen und naive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) gesteigert.



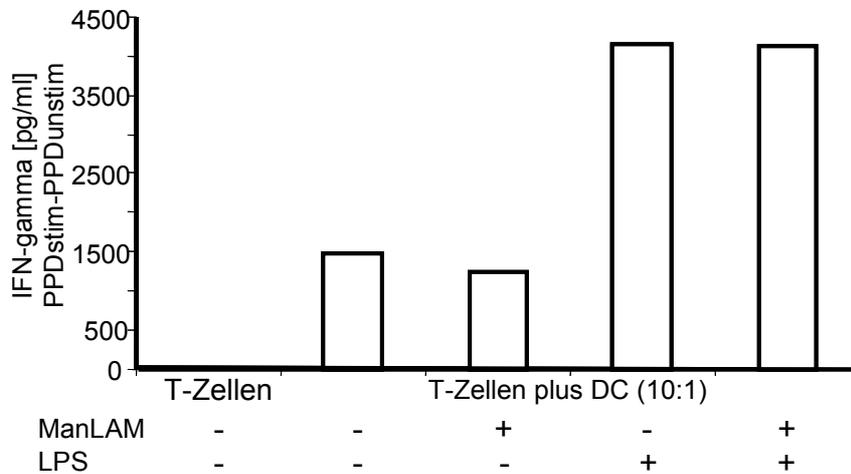
**Abbildung 10:** Proliferation naiver  $CD4^+CD45RA^+$ -T-Zellen im Rahmen Antigen-unabhängiger T-Zell-Aktivierung (MLR) in Gegenwart von DC-SIGN<sup>pos</sup> DC. *In vitro* differenzierte DC (je 500 U/ml IL-4 und GM-CSF) wurden für 24 h aktiviert (LPS [10 ng/ml] und/oder ManLAM [10 µg/ml]). Nach Waschen der DC wurden diese mit Gesamt-T-Zellen in den angegebenen DC- zu T-Zell-Verhältnissen im Rahmen einer MLR kokultiviert. Nach fünf Tagen Kokultur wurden die T-Zellen durch Zugabe von  $^3H$ -Thymidin (1µCi/100.000 T-Zellen) radioaktiv markiert und anschließend der Thymidineinbau als Maß für proliferierende T-Zellen nach Ernte der lysierten Zellen auf Filtermatten und Messung dieser in einem β-Szintillationscounter bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives von fünf analog durchgeführten Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte intraexperimenteller Quadrate +/- Standardabweichung.

### 3.1.5.2. Antigen-abhängige T-Zell-Aktivierung

Neben der Analyse der Antigen-unabhängigen T-Zell-Aktivierung im Rahmen einer MLR (s. 3.1.5.1., T-Zellen und dendritische Zellen heterolog) sollte nachfolgend der Einfluss von mannosyliertem Lipoarabinomannan auf die Antigen-abhängige T-Zell-Aktivierung mittels Durchführung eines Antigen-Präsentations-Assays (T-Zellen und dendritische Zellen autolog) untersucht werden. Hierzu wurde die  $IFN-\gamma$ -Sekretion von Gesamt-T-Zellen PPD<sup>pos</sup> Spender nach PPD-Restimulation (Differenzbildung PPD-stimulierter und nicht PPD-stimulierter Zellen) in Abhängigkeit von mannosyliertem Lipoarabinomannan untersucht.

Die Fähigkeit dendritischer Zellen zur Antigenpräsentation an Gesamt-T-Zellen wird durch mannosyliertes Lipoarabinomannan nicht beeinflusst (Abbildung 11). Auch im

Rahmen einer LPS-Stimulation dendritischer Zellen ist keine differenzielle IFN- $\gamma$ -Sekretion in Abhängigkeit von mannosyliertem Lipoarabinomannan zu beobachten.



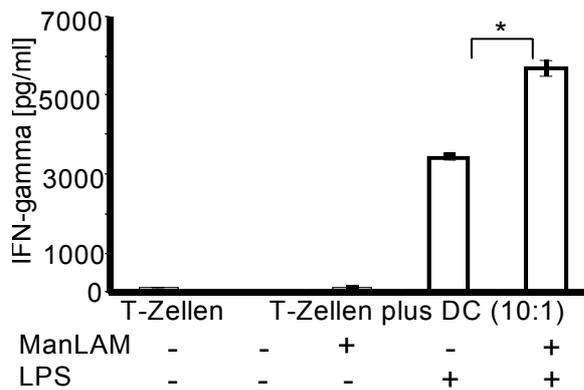
**Abbildung 11:** IFN- $\gamma$ -Sekretion von Gesamt-T-Zellen PPD<sup>pos</sup> Spender im Rahmen Antigen-abhängiger T-Zell-Aktivierung (Antigen-Präsentations-Assay) nach Kokultur mit LPS und/oder ManLAM-aktivierten DC und anschließender PPD-Restimulation. *In vitro* differenzierte DC (je 500 U/ml IL-4 und GM-CSF) wurden für 24 h aktiviert (LPS [10 ng/ml] und/oder ManLAM [10  $\mu$ g/ml]). Nach Waschen der DC wurden diese mit Gesamt-T-Zellen in den angegebenen DC- zu T-Zell-Verhältnissen im Rahmen eines Antigenpräsentationsassays in Gegenwart von PPD [10  $\mu$ g/ml] kokultiviert. Nach fünf Tagen wurde der IFN- $\gamma$ -Gehalt der Kokulturen mittels ELISA bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives von vier analog durchgeführten Experimenten. Dargestellt ist die Differenz PPD-haltiger und PPD-freier Ansätze.

### 3.1.5.3. Mannosyliertes Lipoarabinomannan verschiebt das T-Zell-Zytokinprofil Richtung Th1

In den bisher durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass mannosyliertes Lipoarabinomannan im Rahmen einer MLR die Proliferation von T-Zellen steigert. Die Fähigkeit dendritischer Zellen zur Antigenpräsentation an T-Zellen wird hingegen nicht moduliert. Um die Frage zu beantworten, ob noch weitere Parameter der T-Zell-Aktivierung moduliert werden, wurde nachfolgend die Qualität der T-Zell-Antworten in Abhängigkeit von mannosyliertem Lipoarabinomannan im Rahmen einer gemischten Lymphozytenreaktion analysiert. Um über die Qualität der T-Zell-Antwort Aussagen treffen zu können, wurde exemplarisch die Sekretion von Th1- als auch Th2-assoziierten Zytokinen untersucht.

Die Stimulation dendritischer Zellen mit mannosyliertem Lipoarabinomannan führte lediglich zu einer quantitativen, jedoch nicht zu einer qualitativen Modulation der zellulären Antwort.

A)



B)

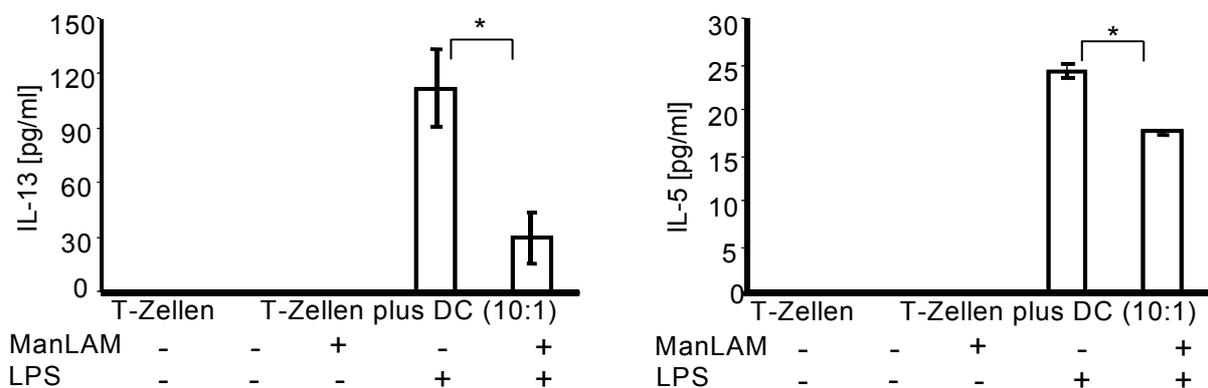
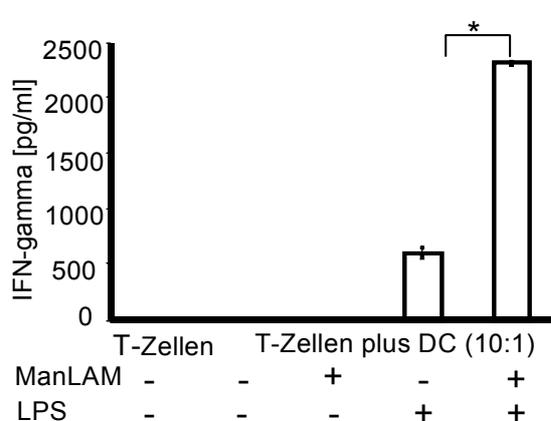


Abbildung 12:

**Th1/Th2-Profil von Gesamt-T-Zellen in Abhängigkeit von ManLAM.** *In vitro* differenzierte DC (500 U/ml IL-4 und GM-CSF) wurden für 24 aktiviert (LPS [10 ng/ml] und/oder ManLAM [10 µg/ml]), gewaschen und mit Gesamt-T-Zellen in den angegebenen DC- zu T-Zell-Verhältnissen im Rahmen einer MLR kokultiviert. Die Kokulturen wurden nach fünf Tagen mittels ELISA auf den Gehalt von IFN- $\gamma$ , IL-5 und IL-13 überprüft. Dargestellt sind die Mittelwerte intraexperimenteller Triplikate  $\pm$  Standardabweichung, wobei ein repräsentatives Experiment von vier analog durchgeführten Experimenten gezeigt ist. \* zeigt die statistische Signifikanz an (P-Wert < 0,05), ermittelt mittels Student's T-Test.

Die Analyse der Kulturüberstände von Gesamt-T-Zellen ergab überraschenderweise jedoch, dass in Abhängigkeit von mannosyliertem Lipoarabinomannan die Freisetzung des Th1-assoziierten Zytokins IFN- $\gamma$  verstärkt wird (Abbildung 12 A). Diese ist zusätzlich begleitet von einer parallel auftretenden Reduktion der Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 (Abbildung 12 B). Somit führt die Aktivierung dendritischer Zellen in Gegenwart von mannosyliertem Lipoarabinomannan zu einer klaren Th1-Orientierung der nachgeschalteten T-Zell-Antwort.

In Analogie zu den Proliferationsexperimenten wurde neben dem Zytokinprofil von Gesamt-T-Zellen auch das Zytokinprofil naiver T-Zellen im Rahmen einer MLR in Abhängigkeit von mannosyliertem Lipoarabinomannan untersucht. Auch hier kommt es in Abhängigkeit der vorausgegangenen Aktivierung dendritischer Zellen in Gegenwart von mannosyliertem Lipoarabinomannan zu einer erhöhten Freisetzung des Th1-Zytokins IFN- $\gamma$  (Abbildung 13).



**Abbildung 13: IFN- $\gamma$ -Sekretion naiver T-Zellen in Abhängigkeit von ManLAM.** *In vitro* differenzierte DC (500 U/ml IL-4 und GM-CSF) wurden für 24 h aktiviert (LPS [10 ng/ml], ManLAM [10  $\mu$ g/ml]), gewaschen und mit naiven T-Zellen in den angegebenen DC- zu T-Zell-Verhältnissen im Rahmen einer MLR kokultiviert. Nach fünf Tagen Kokultur wurde mittels ELISA der Gehalt an IFN- $\gamma$  bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte intraexperimenteller Triplikate  $\pm$  Standardabweichung, wobei ein repräsentatives von sechs analog durchgeführten Experimenten gezeigt ist. \* zeigt die statistische Signifikanz an (P-Wert < 0,05), ermittelt mittels Student's T-Test.

Das Th2-assoziierte Zytokin IL-5 wurde nur einigen Experimenten im Rahmen einer gemischten Lymphozytenreaktion mit naiven T-Zellen induziert. In diesen Fällen wurden nur sehr geringe Mengen IL-5 produziert, wobei die vorausgegangene Stimulation dendritischer Zellen mit mannosyliertem Lipoarabinomannan zu einer weiteren Reduktion von IL-5 führte (Daten nicht gezeigt). Das ebenfalls Th2-assoziierte Zytokin IL-13 konnte in den Überständen der DC-Kokulturen mit naiven T-Zellen nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Unter Berücksichtigung der Modulation der Sekretion des Th1-assoziierten Zytokins IFN- $\gamma$  durch mannosyliertes Lipoarabinomannan kann auch hier von einer Verschiebung des Zytokinprofils naiver T-Zellen in Richtung einer Th1-orientierten Immunantwort gesprochen werden. In Anlehnung an die Proliferationsexperimente hat die Aktivierung dendritischer Zellen in Gegenwart von mannosyliertem Lipoarabinomannan Konsequenzen für die Ausrichtung des Zytokinprofils unterschiedlicher T-Zell-Populationen.

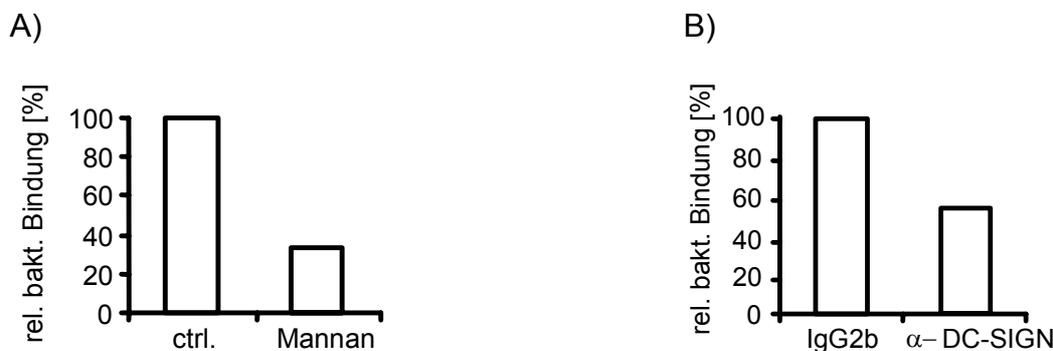
Isoliertes mannosyliertes Lipoarabinomannan aus *M. tuberculosis* H37Rv moduliert nachhaltig das Antwortverhalten unterschiedlicher T-Zell-Populationen. Die Aktivierung dendritischer Zellen mit mannosyliertem Lipoarabinomannan resultiert in einer gesteigerten Proliferation von Gesamt- als auch naiven T-Zellen. Die Antigenpräsentationsfähigkeit dendritischer Zellen bleibt unbeeinflusst. Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen rein quantitativen Modulation der Zytokinantwort dendritischer Zellen kommt es in Abhängigkeit von mannosyliertem Lipoarabinomannan zu einer qualitativen Modulation der T-Zell-Zytokinantworten. Die Aktivierung dendritischer Zellen in Gegenwart von mannosyliertem Lipoarabinomannan führt zu einer Th1-Verschiebung des in T-Zellen induzierten Zytokinprofils.

### **3.2. Die Rolle von Zellwand-assoziiertem mannosyliertem Lipoarabinomannan im Rahmen der Interaktion von Mykobakterien mit dendritischen Zellen**

Im Verlauf mykobakterieller Infektionen treten Lipoarabinomannane sowohl in der bisher untersuchten isolierten Form als auch an die mykobakterielle Zellwand assoziiert auf (135, 136). Im Rahmen dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass isoliertes mannosyliertes Lipoarabinomannan aus *M. tuberculosis* H37Rv als potenter Immunmodulator fungiert. In Anbetracht der immunmodulierenden Eigenschaften des isolierten mannosylierten Lipoarabinomannans wird im abschließenden Teil der Arbeit die Rolle von Zellwand-assoziiertem mannosyliertem Lipoarabinomannan genauer analysiert werden.

### 3.2.1. Die Rolle von Zellwand-assoziiertem mannosyliertem Lipoarabinomannan und DC-SIGN im Rahmen mykobakterieller Bindung an dendritische Zellen

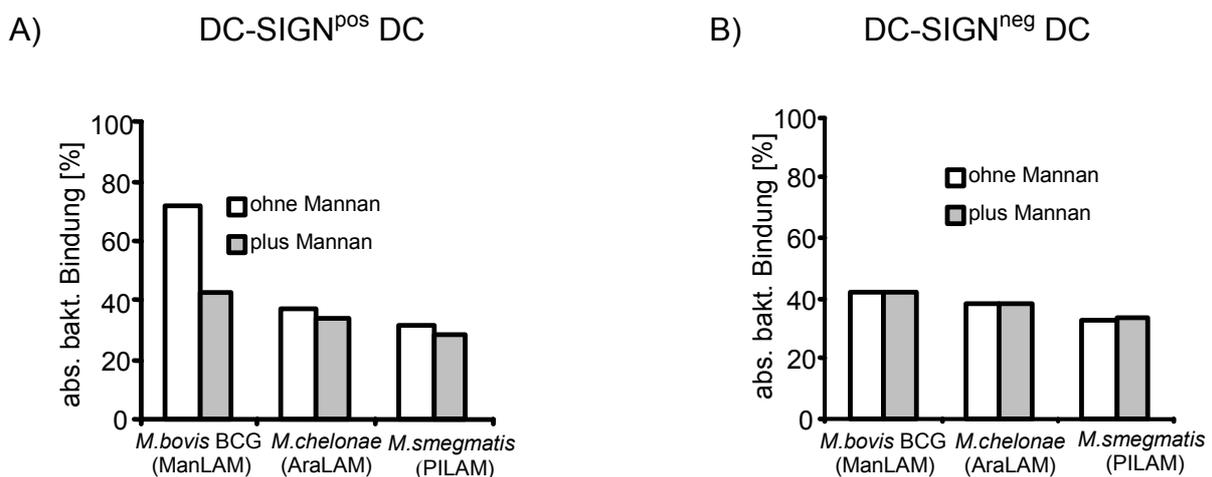
DC-SIGN stellt den wichtigsten Rezeptor auf dendritischen Zellen für Mykobakterien des TB-Komplexes dar. Die Ligation von DC-SIGN wird durch mannosyliertes Lipoarabinomannan vermittelt, welches einen Hauptbestandteil der mykobakteriellen Zellwand darstellt. Die beschriebene Interaktion ist Mannose-abhängig und sollte somit neben der Verwendung eines Antikörpers gegen DC-SIGN auch durch Mannan inhibiert werden.



**Abbildung 14:** Inhibition der Bindung von *M. bovis* BCG an DC-SIGN<sup>pos</sup> DC. *In vitro* differenzierte DC (je 500 U/ml IL-4 und GM-CSF) wurden nach Vorinkubation mit Mannan [100  $\mu$ g/ml] oder  $\alpha$ -DC-SIGN-Ak [10  $\mu$ g/ml] bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle [10  $\mu$ g/ml] für 2 h mit GFP-transfizierten *M. bovis* BCG Mykobakterien kokultiviert. Zur Analyse der Bindung und Internalisierung der GFP-exprimierenden *M. bovis* BCG Mykobakterien wurden die DC anschließend in Azid-PBS aufgenommen, nicht fixiert und sofort im Durchflusszytometer analysiert. Ein repräsentatives Experiment von drei analog durchgeführten Experimenten ist dargestellt.

Abbildung 14 zeigt, dass die Bindung von *M. bovis* BCG an DC-SIGN<sup>pos</sup> dendritische Zellen sowohl in Gegenwart von Mannan (A) als auch durch einen inhibitorischen  $\alpha$ -DC-SIGN-Ak (B) gehemmt wird. Eine vollständige Hemmung der Bindung ist jedoch nicht zu beobachten. Daraus lässt sich ableiten, dass noch weitere, DC-SIGN- beziehungsweise Mannose-unabhängige Interaktionen von *M. bovis* BCG mit der dendritischen Zelle stattfinden, die ebenfalls eine Aufnahme der Mykobakterien ermöglichen.

Basierend auf den beschriebenen Daten und der daraus resultierenden Annahme, dass noch weitere, DC-SIGN- bzw. Mannose-unabhängige Interaktionsmöglichkeiten für Mykobakterien mit dendritischen Zellen bestehen, wurde nachfolgend die Rolle von DC-SIGN und Zellwand-gebundenem mannosyliertem Lipoarabinomannan genauer untersucht. Dazu wurden DC-SIGN<sup>pos</sup> sowie DC-SIGN<sup>neg</sup> dendritische Zellen verwendet. Es wurde die Bindung und Aufnahme von Mykobakterien, die entweder ein mannosyliertes Lipoarabinomannan (ManLAM<sup>pos</sup> Mykobakterien), ein nicht modifiziertes Lipoarabinomannan (AraLAM, *M. chelonae*) beziehungsweise ein alternativ mit Phosphoinositolresten modifiziertes (PILAM, *M. smegmatis*) Lipoarabinomannan (ManLAM<sup>neg</sup> Mykobakterien) tragen, an die genannten dendritischen Zellen untersucht.



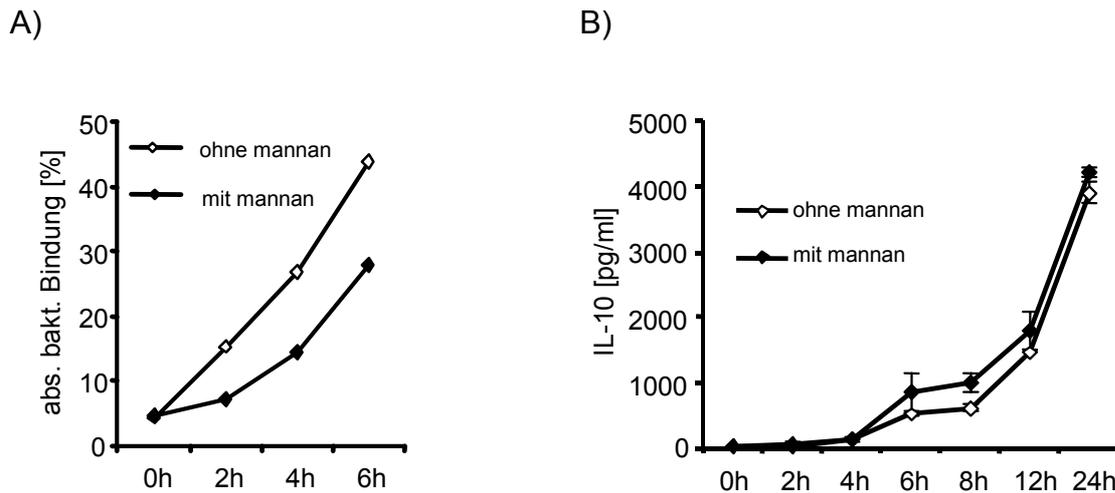
**Abbildung 15:** Rolle der Interaktion von DC-SIGN und ManLAM im Rahmen der Bindung von *M. bovis* BCG, *M. chelonae* und *M. smegmatis* an DC-SIGN<sup>pos</sup> und DC-SIGN<sup>neg</sup> DC. *In vitro* differenzierte DC (500 U/ml IL-4 und GM-CSF bzw. 1.000 U/ml IFN- $\alpha$  und GM-CSF) wurden mit FITC-markierten Mykobakterien für 2 h ggf. nach Vorinkubation mit Mannan [100  $\mu$ g/ml] wie im Diagramm dargestellt inkubiert. Zur Analyse der Bindung und Internalisierung der FITC-markierten Mykobakterien wurden die DC anschließend in Azid-PBS aufgenommen, nicht fixiert und sofort im Durchflusszytometer analysiert. Ein repräsentatives von drei analog durchgeführten Experimenten ist gezeigt.

Die Expression von DC-SIGN auf der Oberfläche dendritischer Zellen, kombiniert mit der Expression von mannosyliertem Lipoarabinomannan auf der mykobakteriellen Zellwand, resultiert in einer gesteigerten Aufnahme von Mykobakterien in die dendritische Zelle (Abbildung 15 A). Diese Aufnahme ist bis zu einem bestimmten Maß durch Mannan inhibierbar und damit Mannose-abhängig (Abbildung 15 A). In

Abwesenheit von DC-SIGN oder mannosyliertem Lipoarabinomannan kommt es ebenfalls zu einer Aufnahme der Mykobakterien in die dendritische Zelle (Abbildung 15 A und B). Diese Interaktion ist nicht durch Mannan inhibierbar und damit Mannose-unabhängig (Abbildung 15 A und B). Das Fehlen von DC-SIGN und mannosyliertem Lipoarabinomannan führt zu einer Aufnahme von Mykobakterien in dendritische Zellen in etwa dem Ausmaß, das nach Hemmung der Bindung von *M. bovis* BCG auf DC-SIGN<sup>pos</sup> dendritischen Zellen bestehen bleibt (Abbildung 15 A). Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Bindung von Mykobakterien des TB-Komplexes an dendritische Zellen gesteigert ist, verglichen mit nicht-tuberkulösen Mykobakterien. Dies ist begründet in der Expression von mannosyliertem Lipoarabinomannan. Parallel dazu gibt es weitere, Mannose-unabhängige, Interaktionen zwischen Mykobakterien und dendritischen Zellen, die sowohl tuberkulösen als auch nicht-tuberkulösen Mykobakterien eine Aufnahme in dendritische Zellen ermöglichen.

### **3.2.2. Einfluss der Interaktion von DC-SIGN und mannosyliertem Lipoarabinomannan auf das Zytokinprofil DC-SIGN<sup>pos</sup> dendritischer Zellen nach mykobakterieller Stimulation**

Mannosyliertes Lipoarabinomannan auf der mykobakteriellen Zellwand steigert maßgeblich die Aufnahme von Mykobakterien in dendritische Zellen. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden nachfolgend sowohl die Rolle des mannosylierten Lipoarabinomannans als auch die Rolle von DC-SIGN im Rahmen der Modulation des Antwortverhaltens dendritischer Zellen bei Interaktion mit intakten Mykobakterien untersucht. Hierbei war es zunächst von Interesse herauszufinden, ob mannosyliertes Lipoarabinomannan die Quantität der Immunantwort dendritischer Zellen beeinflusst. Dazu wurde der Frage nachgegangen, ob die Inhibition der Bindung ManLAM<sup>pos</sup> Mykobakterien an DC-SIGN<sup>pos</sup> dendritische Zellen Auswirkungen auf die Zytokinsekretion, in diesem Fall auf die Sekretion von IL-10, durch genannte Zellen hat.



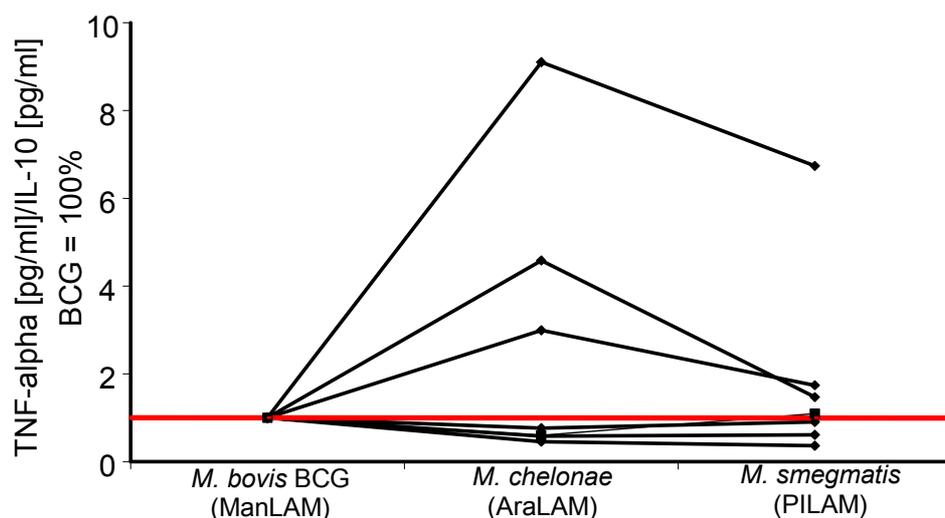
**Abbildung 16: Mannose-Abhängigkeit der IL-10-Sekretion durch DC-SIGN<sup>pos</sup> DC nach Stimulation mit *M. bovis* BCG.** *In vitro* differenzierte DC-SIGN<sup>pos</sup> DC (500 U/ml IL-4 und GM-CSF) wurden mit FITC-markierten *M. bovis* BCG Mykobakterien über einen Zeitraum von 0-24 h ggf. nach Vorinkubation mit Mannan [100 µg/ml] inkubiert. Zur Analyse der Bindung und Internalisierung der FITC-markierten *M. bovis* BCG Mykobakterien (0-6 h) wurden die DC anschließend in Azid-PBS aufgenommen, nicht fixiert und sofort im Durchflusszytometer analysiert (A). Parallel wurde die Sekretion von IL-10 mittels ELISA gemessen (B). Dargestellt sind die Mittelwerte intraexperimenteller Triplikate +/- Standardabweichung, wobei ein repräsentatives von sechs analog durchgeführten Experimenten gezeigt ist. \* zeigt die statistische Signifikanz an (P-Wert < 0,05), ermittelt mittels Student's T-Test.

Die Bindung von *M. bovis* BCG an dendritische Zellen wurde wie zuvor beschrieben durch Mannan inhibiert (Abbildung 16 A). Parallel wurde die IL-10-Sekretion dendritischer Zellen nach Stimulation mit *M. bovis* BCG mit oder ohne Zusatz von Mannan analysiert (Abbildung 16 B). Trotz einer starken Inhibition der Bindung von *M. bovis* BCG an die dendritischen Zellen führte dies nicht zur einer Modulation der IL-10-Sekretion durch die dendritischen Zellen.

Fasst man die bisher durchgeführten Experimente zusammen, so konnte gezeigt werden, dass mannosyliertes Lipoarabinomannan die mykobakterielle Bindung an dendritische Zellen erleichtert. Ein Einfluss auf die Sekretion von IL-10 konnte nicht festgestellt werden.

Neben der Analyse der rein quantitativen Modulation eines Zytokins sollte im Folgenden untersucht werden, ob durch die Expression von mannosyliertem Lipoarabinomannan die Qualität der Immunantwort dendritischer Zellen moduliert werden kann. Um dies zu beurteilen ist es essenziell, nicht nur ein Zytokin zu betrachten, sondern die Induktion immunregulatorischer Zytokine, beispielsweise

IL-10, als auch pro-inflammatorischer Zytokine, beispielsweise TNF- $\alpha$ , zu analysieren. Ebenfalls ist zu beachten, dass bei der Verwendung unterschiedlicher Pathogene, hier unterschiedlicher Mykobakterien, nicht die absoluten Mengen der induzierten Zytokine verglichen werden können, da hier in Abhängigkeit des verwendeten Stimulus Unterschiede auftreten können. Für die Qualität der Immunantwort sind jedoch nicht die absoluten Mengen, sondern das Verhältnis beispielsweise von IL-10 zu TNF- $\alpha$  entscheidend. Demzufolge wurde im durchgeführten Experiment das Verhältnis von TNF- $\alpha$  zu IL-10 gebildet. Wenn die Präsenz von mannosyliertem Lipoarabinomannan zu einer präferenziellen Induktion von pro-inflammatorischen oder regulatorischen Immunantworten führt, so sollte dies das Verhältnis von TNF- $\alpha$  oder IL-10 zugunsten des jeweiligen Zytokins verschieben.

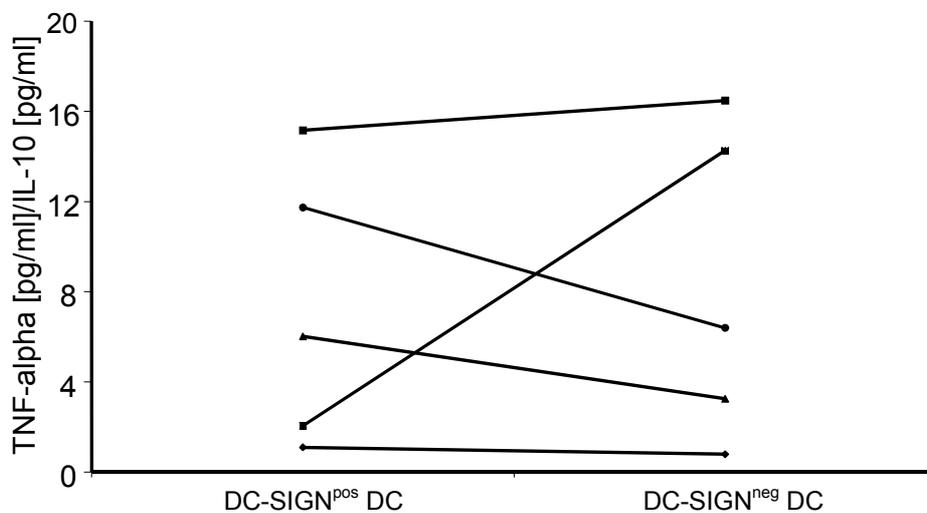


**Abbildung 17:** Einfluss der Interaktion von DC-SIGN und ManLAM auf die TNF- $\alpha$ /IL-10-Balance im Rahmen mykobakterieller Stimulation von DC-SIGN<sup>POS</sup> DC mit *M. bovis* BCG, *M. chelonae*, *M. smegmatis*. *In vitro* differenzierte DC-SIGN<sup>POS</sup> DC (500 U/ml IL-4 und GM-CSF) wurden für 18 h mit *M. bovis* BCG, *M. chelonae* bzw. *M. smegmatis* (MOI = 1) stimuliert und die Produktion von TNF- $\alpha$  sowie IL-10 mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die aus sieben unabhängigen Experimenten erhaltenen TNF- $\alpha$ /IL-10 Verhältnisse nach Stimulation DC-SIGN<sup>POS</sup> DC mit *M. bovis* BCG, *M. chelonae* und *M. smegmatis*, wobei das durch BCG erhaltene TNF- $\alpha$ /IL-10-Verhältnis für jedes Experiment auf 100% gesetzt wurde (rote Linie) und in Relation dazu die durch *M. chelonae* bzw. *M. smegmatis* induzierten TNF- $\alpha$ /IL-10-Verhältnisse berechnet wurden.

Überraschenderweise wurde im Rahmen von sieben durchgeführten Experimenten drei Mal eine Verschiebung des Zytokinprofils in Richtung des pro-inflammatorischen

Zytokins TNF- $\alpha$  und vier Mal eine Verschiebung des Zytokinprofils der dendritischen Zellen in Richtung des regulatorischen Zytokins IL-10 beobachtet (Abbildung 17). Dies stellt eine experimentelle Schwankung dar. Damit zeigen die durchgeführten Experimente deutlich, dass die Präsenz von Zellwand-assoziiertem mannosyliertem Lipoarabinomannan nicht in einer reproduzierbaren, präferenziellen Induktion von IL-10 oder TNF- $\alpha$  resultiert.

Neben der Bedeutung von mannosyliertem Lipoarabinomannan auf der mykobakteriellen Zellwand wurde auch die Rolle von DC-SIGN auf der Oberfläche der dendritischen Zellen untersucht. Auch hier zeigte sich im Rahmen der fünf durchgeführten Experimente zur Stimulation DC-SIGN<sup>pos</sup> als auch DC-SIGN<sup>neg</sup> dendritischer Zellen mit *M. bovis* BCG Mykobakterien kein differenzielles Antwortverhalten genannter dendritischer Zellen in Abhängigkeit von der Expression von DC-SIGN auf deren Oberfläche (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Einfluss der Interaktion von DC-SIGN und ManLAM auf die TNF- $\alpha$ /IL-10-Balance im Rahmen mykobakterieller Stimulation von DC-SIGN<sup>pos</sup> und DC-SIGN<sup>neg</sup> DC mit *M. bovis* BCG. *In vitro* differenzierte DC-SIGN<sup>pos</sup> bzw. DC-SIGN<sup>neg</sup> DC (500 U/ml IL-4 und GM-CSF bzw. 1.000 U/ml IFN- $\alpha$  und GM-CSF) wurden für 18 h mit *M. bovis* BCG (MOI = 1) stimuliert und die Produktion von TNF- $\alpha$  sowie IL-10 mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die aus fünf unabhängigen Experimenten erhaltenen TNF- $\alpha$ /IL-10-Verhältnisse nach Stimulation DC-SIGN<sup>pos</sup> DC bzw. DC-SIGN<sup>neg</sup> DC mit *M. bovis* BCG.

Zusammenfassend lässt sich aus den erhaltenen Ergebnissen somit schlussfolgern, dass weder die Expression des mannosylierten Lipoarabinomannans durch Mykobakterien des TB-Komplexes noch die Expression von DC-SIGN auf den dendritischen Zellen zu einer bevorzugten Induktion einer pro-inflammatorisch oder regulatorisch orientierten Immunantwort führt.

Die durchgeführten Experimente zur Untersuchung der Rolle der Ligation von DC-SIGN durch mannosyliertes Lipoarabinomannan konnten zeigen, dass diese Interaktion die mykobakterielle Aufnahme in dendritische Zellen erleichtert. Eine qualitative Modulation der Immunantwort dendritischer Zellen in Folge der beschriebenen Interaktion erfolgte hingegen nicht. Somit verfügt an die mykobakterielle Zellwand gebundenes mannosyliertes Lipoarabinomannan nicht über die immunmodulatorischen Eigenschaften, die zuvor für das isolierte mannosylierte Lipoarabinomannan in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurden, sondern ist in erster Linie als Bindungspartner im Rahmen der Interaktion von Mykobakterien des TB-Komplexes mit dendritischen Zellen zu betrachten.

## IV. DISKUSSION

Dendritischen Zellen kommt als essenzieller Bestandteil des Immunsystems eine herausragende Rolle als Mediator zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität zu. Ermöglicht wird dies durch die einzigartige Verknüpfung einer *innate recognition* potenzieller Fremdstoffe durch die dendritischen Zellen, kombiniert mit der selektiven, differenziellen Induktion adaptiver Immunantworten. Die Aufklärung des Aktivierungsprozesses dendritischer Zellen trägt somit wesentlich zum tieferen Verständnis der Initiierung, Polarisierung und Regulation von Immunantworten bei.

### 4.1. Die Rolle von isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan aus *M. tuberculosis* H37Rv als Immunmodulator

#### 4.1.1. Die Bedeutung der Ligation des C-Typ-Lektin-Rezeptors DC-SIGN für die Modulation von Immunantworten dendritischer Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde das immunmodulatorische Potenzial des mannosylierten Lipoarabinomannans, einer mykobakteriellen Oberflächenstruktur, untersucht. Mannosyliertes Lipoarabinomannan stellt den Hauptinteraktionspartner von Mykobakterien des TB-Komplexes mit dendritischen Zellen dar (55). Durch Geijtenbeek und Mitarbeiter wurde für dieses Molekül eine potenziell suppressive Wirkung auf die Immunantwort des Wirtes im Verlauf einer Infektion mit *M. tuberculosis* in Folge der Ligation und Aktivierung des Rezeptors DC-SIGN postuliert. Diese Hypothese basiert auf initialen Untersuchungen der IL-10-Antwort humaner dendritischer Zellen im Rahmen einer kombinierten Aktivierung dieser mit dem TLR-4-Liganden LPS und isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan als Ligand des C-Typ-Lektin-Rezeptors DC-SIGN (100). Dies führte zu der Annahme, dass hier eine gezielte Interaktion von Mykobakterien mit definierten Rezeptoren auf der Oberfläche dendritischer Zellen die Möglichkeit zur Manipulation von Wirtszellen zugunsten des Pathogens gibt, also zum Schutz des Mykobakteriums vor der Immunabwehr des Wirtes (*immune escape mechanism*). In Kongruenz dazu stehen Untersuchungen aus denen hervorgeht, dass durch das immunregulatorische Zytokin IL-10 (ERK-vermittelt) eine Regulation seines Gegenspielers, des

pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 (NF $\kappa$ -B-abhängig) erfolgt, in Folge dessen entweder eine verstärkt suppressive oder eine inflammatorische Immunantwort des Wirtes resultiert (137).

In den zuvor beschriebenen Experimenten wurde hauptsächlich auf die Sekretion einzelner Zytokine, hier IL-10, als Schlüsselzytokine fokussiert und basierend darauf Hypothesen zur Modulation der Immunantwort dendritischer Zellen durch Mykobakterien postuliert. Im Rahmen der Aktivierung dendritischer Zellen bei einem gegebenen Stimulus, beispielsweise LPS, wird jedoch gleichzeitig eine Vielzahl von Zytokinen induziert. Ist die Aktivierung nicht auf die Interaktion eines isolierten Moleküls mit einem definierten Rezeptor beschränkt, so kommt hinzu, dass durch die dendritische Zelle, die mit einer Vielzahl an Mustererkennungsrezeptoren zur Interaktion mit Pathogenen ausgestattet ist, intrazellulär eine Integration aller eingehenden Signale erfolgen muss. Mechanismen zum *cross talk* einzelner Mustererkennungsrezeptoren sind bisher nur für Einzelfälle beschrieben und weitaus schlechter untersucht als Mechanismen individueller Signalkaskaden (56). Letztendlich entscheiden das resultierende Zytokinprofil, der Aktivierungsstatus und die Ausreifung der dendritischen Zelle über die finale Richtung der Immunantwort. Folglich ist es von enormer Bedeutung, den Einfluss der zu untersuchenden Substanzen auf unterschiedliche, anti- sowie pro-inflammatorische Zytokine zu betrachten. Erst unter Berücksichtigung der Balance der mit den entsprechenden immunmodulierenden Eigenschaften verknüpften Zytokine oder auch Chemokine lässt sich eine Aussage über die Orientierung der Immunantwort treffen. Aber auch hierbei ist zu beachten, dass nicht mit jedem Zytokin zwingend die eine oder andere Wirkungsweise auf Zellen des Immunsystems verbunden ist. Zum Teil hängt diese auch von der Art des eingehenden Stimulus ab, wie kürzlich am Beispiel von IL-10 gezeigt werden konnte (138).

Im Rahmen der angefertigten Arbeit konnte dargelegt werden, dass isoliertes mykobakterielles mannosyliertes Lipoarabinomannan als Kostimulus synergistisch die durch andere aktivierende Stimuli induzierte Zytokinantwort weit reichend verstärkt. Das immunmodulatorische Potenzial von isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan ist nicht auf die Regulation regulatorischer oder pro-inflammatorischer Zytokine beschränkt. Mannosyliertes Lipoarabinomannan verstärkt die Produktion unterschiedlich immunologisch wirksamer Zytokine (Abbildung 4 A). Das Antwortverhalten dendritischer Zellen wird somit bezüglich der

Quantität, nicht jedoch qualitativ, moduliert. Die Interaktion des mannosylierten Lipoarabinomannans mit dendritischen Zellen hat somit keinen immunsuppressiven Effekt und bietet demzufolge Pathogenen auch nicht die Möglichkeit eines *immune escape mechanism*. Die Wirksamkeit des mannosylierten Lipoarabinomannans ist hierbei nicht auf die Modulation von LPS-induzierten Signalen beschränkt. Die Zytokinsekretion der dendritischen Zellen wird bei Verwendung unterschiedlicher TLR-abhängiger als auch TLR-unabhängiger aktivierender Liganden in Gegenwart von mannosyliertem Lipoarabinomannan verstärkt (Abbildung 5 A und B). Eine *de novo* Synthese von Zytokinen oder Chemokinen auf transkriptioneller Ebene oder Proteinebene wird jedoch nicht induziert (Abbildung 2 und 3). Das immunmodulatorische Potenzial des mannosylierten Lipoarabinomannans ist an die Präsenz eines kollaborativen Signals gebunden und kommt erst im Rahmen der Aktivierung dendritischer Zellen zum Tragen (Abbildung 4 C). Somit lässt sich mannosyliertes Lipoarabinomannan eventuell als ein in seiner Wirkungsweise dem in der Lunge exprimierten *surfactant protein A* (SP-A) nahe stehendes Molekül betrachten. Funktionelle Konsequenzen einer Stimulation von Alveolarmakrophagen mit dem *surfactant protein A* kommen ebenfalls erst bei einer LPS-Stimulation der Zellen zum Tragen. Dies ist begründet in einer Modulation des NF $\kappa$ -B *turnover* durch das *surfactant protein A* (139).

Der von Geijtenbeek und Mitarbeitern vorgeschlagenen Hypothese stehen neben den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten weitere, andere Arbeiten gegenüber, welche die in der Arbeit aufgezeigten Befunde unterstützen. So wurde gezeigt, dass dendritische Zellen nach mykobakterieller Infektion IL-10 sekretieren, dies aber in einem Makrophagen-ähnlichen Phänotyp resultiert und von einer Inhibition der intrazellulären mykobakteriellen Replikation begleitet ist (74). Auch konnte gezeigt werden, dass die Expression von DC-SIGN auf der Zelloberfläche nicht zwingend zu einer gesteigerten IL-10-Sekretion nach Interaktion mit isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan führt (127). Klinisch-epidemiologische Studien zeigen, dass mit einer gesteigerten Expression von DC-SIGN beim Menschen eine Reduktion des Risikos einhergeht, an Tuberkulose zu erkranken (140). Somit kann hier nicht von einem mykobakteriellen *immune escape mechanism*, vermittelt in Folge der Ligation von DC-SIGN, gesprochen werden. Ferner wurde beobachtet, dass dendritische Zellen nach mykobakterieller Stimulation durchaus in der Lage sind, sowohl IL-12 als auch TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  im Rahmen der Immunabwehr von

Mykobakterien oder der Interaktion mit mykobakteriellen Antigenen zu produzieren und damit nachhaltig T-Zell-Antworten induzieren können (54, 141, 142).

Neben der direkten Modulation, oder auch der parallelen Induktion alternativer, intrazellulärer Signalkaskaden, sind natürlich auch andere Möglichkeiten in Betracht zu ziehen, die zu der in dieser Arbeit beschriebenen Modulation von Immunantworten durch mannosyliertes Lipoarabinomannan führen können. Liegen zwei Moleküle in Lösung vor, hier LPS und mannosyliertes Lipoarabinomannan, so kann eine Interaktion dieser deren Eigenschaften, zum Beispiel das Transportverhalten über eine biologische Membran, modulieren. Ein geändertes Transportverhalten kann in einer veränderten zellulären Antwort resultieren.

Eine weitere Variante der Modulation der zellulären Antwort wäre in Folge der wechselseitigen Beeinflussung der beteiligten Rezeptoren, hier des Lipopolysaccharid-Rezeptorkomplexes und des DC-SIGN-Tetramers, nach Bindung der betreffenden Liganden, Lipopolysaccharid beziehungsweise mannosyliertes Lipoarabinomannan, denkbar. Der Aufnahme von Mykobakterien in die dendritische Zelle geht eine Interaktion zwischen mykobakterieller Zellwand und Membran der dendritischen Zelle voraus. Molekül-Molekül-Interaktionen können mithilfe des Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) untersucht werden. Hierbei können sowohl intakte Zellen als auch künstliche biologische Membranen verwendet werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden preliminäre Analysen des Rezeptor-unabhängigen Transportverhaltens des mannosylierten Lipoarabinomannans über die Membran artifizierender Liposomen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die durchgeführten FRET-Analysen ergaben, dass mannosyliertes Lipoarabinomannan weder alleine noch in Kombination mit dem LPS-bindenden Protein (LBP), das auch als Transportprotein für LPS fungiert, über die Zellmembran transportiert wird. Nicht geklärt ist bisher, wie sich die zusätzliche Anwesenheit von LPS und LBP auf das Integrationsverhalten von mannosyliertem Lipoarabinomannan in eine künstliche Membran auswirkt. Denkbar wäre eine Interaktion von LPS und mannosyliertem Lipoarabinomannan, die in Gegenwart von LBP zu einem Transport beider Moleküle über die Zellmembran führt. Die zuvor angesprochene Rezeptor-abhängige Interaktion des mannosylierten Lipoarabinomannans auf der dendritischen Zelle ist noch nicht untersucht. Die damit verbundenen Konsequenzen für zum Beispiel die Beeinflussung des LPS-Rezeptorkomplexes durch den Rezeptor DC-SIGN und damit die eventuelle Modulation intrazellulärer Signalkaskaden sind noch unklar.

In Anlehnung an die aktuelle Literatur ist im Hinblick auf DC-SIGN zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig geklärt, ob beziehungsweise welchen Einfluss die Ligation von DC-SIGN durch mannosyliertes Lipoarabinomannan alleine oder auch in Kooperation mit aktivierenden Liganden auf die Induktion nachgeschalteter Signalkaskaden hat. Kürzlich wurde beschrieben, dass eine Antikörper-vermittelte Ligation des CLR DC-SIGN zu der Aktivierung von ERK, PI3K und PLC- $\gamma$  führt (143). Nach aktuellem Kenntnisstand scheint die Aktivierung von CLR nicht an die Induktion bestimmter Kinasen gebunden zu sein. Die Modulation TLR-vermittelter Signale durch Mannose-bindende Rezeptoren ist sehr vielfältig und noch nicht im Detail untersucht oder verstanden. Für die Aktivierung des CLR Dektin-1 wurde vor kurzem zu der bekannten kollaborativen Aktivierung mit TLR-2 (56), die in einer verstärkten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine resultiert, zusätzlich eine TLR-2-unabhängige Induktion von Zytokinen nach Rekrutierung von Syk gezeigt (144). Für die Ligation des Mannose-Rezeptors auf murinen Makrophagen hingegen wurde eine Reduktion des TLR-abhängig induzierten pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 gezeigt, die in der Induktion von IRAK-M begründet ist (145).

Zusammenfassend lässt sich demnach festhalten, dass durch CLR in Abhängigkeit der betrachteten Zellen und des verwendeten Liganden ein breites Spektrum unterschiedlicher intrazellulärer Signalkaskaden moduliert werden kann. Die Aktivierung dendritischer Zellen in Gegenwart von isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan führt zu einer parallelen Modulation unterschiedlich immunologisch wirksamer Zytokine. Demzufolge ist denkbar, dass verschiedene Signalkaskaden, zum Beispiel die NF $\kappa$ -B-vermittelte Induktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie für die kollaborative Aktivierung von Dektin-1 und TLR-2 gezeigt (56), zum Beispiel TNF- $\alpha$  und IL-12, sowie die ERK-vermittelte Induktion des regulatorischen Zytokins IL-10, beeinflusst werden.

#### **4.1.2. Die Aktivierung dendritischer Zellen in Gegenwart von mannosyliertem Lipoarabinomannan resultiert in einer Th1-Orientierung von T-Zell-Antworten**

Pathogene zeichnen sich durch eine differenzielle Ausstattung mit unterschiedlichen Oberflächenmolekülen aus. Daraus resultiert eine selektive Erkennung durch

verschiedene Rezeptoren, die von Wirtszellen exprimiert werden. Die definierte Ligation bestimmter Rezeptoren hat eine distinkte Induktion von Signalkaskaden zur Folge. Dies führt letztendlich zu einem klaren Antwortmuster der betreffenden Wirtszelle mit den entsprechenden Implikationen für den Verlauf einer Infektion. So resultiert die TLR-vermittelte Aktivierung von NF $\kappa$ -B in der verstärkten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (44), wohingegen die Aktivierung von ERK mit der Induktion des regulatorischen Zytokins IL-10 (137) verbunden ist. Im Hinblick auf die Ligation von DC-SIGN als ein Hauptrezeptor für Mykobakterien auf dendritischen Zellen wurde die Induktion von ERK, PI3K und PLC- $\gamma$  beschrieben (143). Die Aktivierung dieser Signalwege hat nach aktuellem Kenntnisstand maßgeblich eine Th2-orientierte Immunantwort zur Folge. Aufgrund der selektiven Aktivierung der genannten Kinasen wird somit eine Th-2-Verschiebung der Immunantwort durch DC-SIGN-ligierende Pathogene diskutiert (143). Die Ligation von DC-SIGN führt laut Literatur jedoch nicht zu einer generellen Verschiebung des Zytokinprofils nachgeschalteter T-Zell-Antworten. Bisher wurde sowohl eine Th1- (124) als auch Th2-Orientierung (121) nach Ligation von DC-SIGN in Abhängigkeit der verwendeten Pathogene experimentell belegt. Die primäre Aktivierung dendritischer Zellen in Gegenwart des mannosylierten Lipoarabinomannans führt nicht zu einer qualitativen, sondern zu einer quantitativen Beeinflussung der Immunantwort, da die Sekretion aller durch dendritische Zellen sezernierter Zytokine gesteigert wird. Betrachtet man jedoch die vielfache Induktion einzelner Zytokine induziert durch LPS gegenüber der Induktion durch LPS und mannosyliertes Lipoarabinomannan, so erfährt das Th1-assoziierte Zytokin IL-12 die stärkste Steigerung. Dies ist als Indiz für eine mögliche Th1-Orientierung des T-Zell-Zytokinprofils anzusehen. Im Verlauf der immunologischen Reaktion differenzieren ursprünglich nicht determinierte Th0-Zellen in Richtung Th1- oder Th2-Zelle in Abhängigkeit des vorherrschenden Zytokinmilieus und der Art der Antigenpräsentation (146-148). Daraus resultieren unterschiedliche Mechanismen der Bekämpfung von Pathogenen. Die Bekämpfung von intrazellulären Bakterien oder auch von Viren erfolgt bevorzugt unter Th-1-Bedingungen. Th1-Zellen zeichnen sich durch die Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  und GM-CSF aus. Damit geht eine Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und Makrophagen einher, was zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion führt, in deren Verlauf das Abtöten intrazellulärer Pathogene ermöglicht wird (146, 149). Im Rahmen einer Th-2-orientierten T-Zell-Antwort werden zum Beispiel bevorzugt die Zytokine IL-4,

IL-5, IL-10 und IL-13 produziert, was in einer Aktivierung Antikörper-produzierender B-Zellen resultiert, jedoch nicht zu der unter Th1-Bedingungen auftretenden Entzündungsreaktion zur Eliminierung intrazellulärer Pathogene führt (146). Th1- und Th2-assoziierte Zytokine unterliegen einer wechselseitigen Regulation. Dies gewährleistet den Erhalt der Qualität der initial induzierten Immunantwort. Für Krankheitserreger bietet sich an dieser Stelle die Möglichkeit zur gezielten Manipulation der Wirtszelle. Der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle folgt eine selektive Interaktion mit Rezeptoren auf der Wirtszelle und damit Induktion von pro- (Th1) oder anti-inflammatorischen (Th2) Signalkaskaden in der Wirtszelle. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessene T-Zell-Zytokinprofil zeigt eine klare Th1-Verschiebung. Das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  wird in Abhängigkeit von mannosyliertem Lipoarabinomannan verstärkt freigesetzt. Parallel wird die Sekretion der Th2-assoziierten Zytokine IL-5 und IL-13 in Abhängigkeit von mannosyliertem Lipoarabinomannan reduziert. (Abbildung 12 und 13). Die Interaktion von mykobakteriellem mannosyliertem Lipoarabinomannan mit dendritischen Zellen hat den experimentellen Befunden nach *in vitro* somit keine Suppression der Immunantwort zugunsten des Pathogens zur Folge. Auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass es eine Korrelation zwischen einer gesteigerten Expression von DC-SIGN (Polymorphismen im Promoter) und einem verringerten Risiko, an Tuberkulose zu erkranken, gibt (127). Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte Verschiebung in Richtung Th-1-orientierter Immunantworten durch isoliertes mannosyliertes Lipoarabinomannan impliziert die Möglichkeit einer erfolgreichen Bekämpfung mykobakterieller Infektionen und bietet somit eine Erklärung für den durch eine gesteigerte Expression von DC-SIGN vermittelten Schutz vor TB-Erkrankungen.

Die Erkennung von Mykobakterien oder deren Bestandteilen durch dendritische Zellen, die im Gegensatz zu dem Makrophagen, der primären mykobakteriellen Wirtszelle, potente Induktoren spezifischer Immunantworten darstellen, bietet damit die Möglichkeit der effektiven Bekämpfung mykobakterieller Infektionserreger durch das Immunsystem.

#### 4.1.3. Mannose-Rezeptor und DC-SIGN: Antagonistische Wirkung von C-Typ-Lektin-Rezeptoren auf TLR-Signale?

Die simultane Ligation einer Vielzahl von Rezeptoren auf einer Wirtszelle durch unterschiedlichste Pathogen-assoziierte molekulare Muster führt zu einer multiplen Aktivierung der betreffenden Zellen. Intrazellulär bedarf eine kollaborative Aktivierung verschiedener Rezeptoren einer Integration der verschiedenen eingehenden Signale. Die Mechanismen zur wechselseitigen Beeinflussung des intrazellulären *cross talk* sind bisher wenig bekannt. Für die kollaborative Aktivierung des CLR Dektin-1 und TLR-2 ist gezeigt, dass dies in einer verstärkten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine resultiert (56, 150). Eine Signalweiterleitung über Dektin-1 kann jedoch auch ohne Beteiligung von TLR-2 erfolgen (151). Für einen weiteren CLR, den Mannose-Rezeptor, wurde ebenfalls eine modulierende Wirkung auf TLR-Signalwege beschrieben. Nigou und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die kombinierte Aktivierung von TLR-4 durch LPS und des Mannose-Rezeptors durch mannosyliertes Lipoarabinomannan in einer reduzierten Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 resultiert (152). Aufgrund dieses experimentellen Befundes wurde postuliert, dass die Modulation TLR-abhängiger Signale durch die parallele Aktivierung von CLR zu einer Inhibition zellulärer Immunantworten führt. Geijtenbeek und Mitarbeiter fanden übereinstimmend damit eine verstärkte Sekretion des regulatorischen Zytokins IL-10 in Folge der Ligation des CLR DC-SIGN durch mannosyliertes Lipoarabinomannan in Gegenwart des TLR-4-Liganden LPS. Aufgrund dieser Datenlage wurde die Hypothese eines *immun escape mechanism* (70) aufgestellt, begründet in der erhöhten Freisetzung von IL-10, begleitet von der reduzierten Sekretion von IL-12, nach Konfrontation dendritischer Zellen mit mannosyliertem Lipoarabinomannan (100, 152). Demzufolge wurde mannosyliertes Lipoarabinomannan als Virulenzfaktor betrachtet, der zelluläre Immunantworten inhibiert und somit Immunantworten zugunsten des Pathogens moduliert (153-155).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten zeigen, dass mannosyliertes Lipoarabinomannan Mannose- bzw. DC-SIGN-abhängig jedoch nicht nur die Freisetzung des regulatorischen Zytokins IL-10 verstärkt, sondern auch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , s. Abbildung 4 A) steigert.

*In vitro* generierte dendritische Zellen tragen den Mannose-Rezeptor und DC-SIGN. *In vivo* ist dies nach bisherigem Kenntnisstand nur für Alveolarmakrophagen beschrieben (127). Die Stimulation von humanen Alveolarmakrophagen mit mannosyliertem Lipoarabinomannan in Gegenwart von LPS führt jedoch interessanterweise nicht zur einer erhöhten IL-10-Freisetzung gegenüber alleiniger LPS-Stimulation (127). Somit wird der Rezeptor DC-SIGN von Alveolarmakrophagen zwar exprimiert, dies hat aber nicht die zuvor durch Geijtenbeek und Mitarbeiter postulierten funktionellen Konsequenzen im Rahmen einer TB-Infektion zur Folge. Die Expression der CLR DC-SIGN und Mannose-Rezeptor ist streng gewebespezifisch reguliert und wird zusätzlich maßgeblich durch die lokale Mikroumgebung moduliert (156-158). Die Expression des Mannose-Rezeptors wird beispielsweise unter inflammatorischen Bedingungen induziert (158). Die Expression von DC-SIGN kann im Rahmen einer TB-Infektion durch bisher nicht identifizierte Moleküle induziert werden, die von infizierten Makrophagen freigesetzt werden (127). Daraus ergeben sich unterschiedliche Expressionsmuster der genannten CLR mit entsprechenden funktionellen Konsequenzen (157). Mit der Expression des Mannose-Rezeptors beziehungsweise von DC-SIGN sind ebenfalls unterschiedliche immunologische Konsequenzen verbunden: Die Aktivierung des Mannose-Rezeptors resultiert in einer Inhibition pro-inflammatorischer Immunantworten (152), die Aktivierung von DC-SIGN führt, wie in dieser Arbeit gezeigt, zu einer rein qualitativen, nicht jedoch quantitativen Modulation der Immunantwort dendritischer Zellen. Wie zuvor erwähnt, ist die parallele Expression von DC-SIGN und des Mannose-Rezeptors *in vivo* lediglich für humane Alveolarmakrophagen beschrieben (127), wobei die Expression von DC-SIGN nicht wie postuliert die Zellaktivierung beeinflusst (127, 154). Zusammenfassend können die bisherigen Daten zur Expression von CLR auf Antigen-präsentierenden Zellen und die daraus resultierende Modulation von TLR-Signalen somit wie folgt interpretiert werden: Ist eine dendritische Zelle ausschließlich positiv für den Mannose-Rezeptor, so resultiert eine Immunantwort, die sich deutlich von der einer ausschließlich DC-SIGN-positiven dendritischen Zelle unterscheidet. Werden beide Rezeptoren exprimiert, so bestimmt letztendlich das Verhältnis der Expressionsstärke das Antwortverhalten der dendritischen Zelle bei einem gegebenen Stimulus. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *in vitro* generierten dendritischen Zellen sind ausnahmslos positiv für DC-SIGN und den Mannose-Rezeptor, wobei über das Verhältnis der

Expressionsstärke beider Rezeptoren an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden kann. Funktionell kommt jedoch dem Mannose-Rezeptor keine Bedeutung im Rahmen der Modulation der Immunantworten der dendritischen Zellen durch mannosyliertes Lipoarabinomannan zu. Das immunmodulatorische Potenzial ist auf DC-SIGN-exprimierende dendritische Zellen beschränkt (Abbildung 7). Somit stehen sich hier im Hinblick auf die Modulation TLR-vermittelter Signale nicht zwei im immunologischen Sinne antagonistisch wirksame (im Hinblick auf die Modulation der IL-12-Sekretion) CLR, Mannose-Rezeptor und DC-SIGN, gegenüber. Vielmehr erlaubt eine hoch differenzierte Expression einzelner Rezeptoren auf der Oberfläche dendritischer Zellen eine hoch selektive Immunantwort bezüglich Stimulus, Lokalisation und Mikroumgebung. Dadurch wird letztendlich eine definierte Reaktion des Immunsystems in Folge der parallelen Ligation von CLR und TLR gewährleistet. Auf der einen Seite sind Pathogene zur selektiven Ligation bestimmter Rezeptoren befähigt. Auf der anderen Seite sind auch die betreffenden Wirtszellen zu einer differenziellen Erkennung von Pathogenen in der Lage (69). Somit erfolgt stets eine wechselseitige Manipulation von Immunzelle und Pathogen (159). Die Interaktionen von Pathogenen mit Wirtszellen sind sehr vielfältig und komplex (159, 160). Speziell die Modulation von Immunantworten, insbesondere durch glykosylierte Strukturen, ist bisher nur exemplarisch beschrieben (161) und auch nicht im Detail verstanden (162). Basierend auf den bisherigen Kenntnissen zur Modulation TLR-induzierter Signalkaskaden durch CLR ist festzuhalten, dass bei simultaner Ligation von TLR und CLR die TLR-vermittelten Signale sehr unterschiedlich beeinflusst werden können (111). Eine kollaborative Aktivierung von CLR und TLR kann sowohl in der Promotion pro-inflammatorischer Signale, wie am Beispiel von Dektin-1 und TLR-2 gezeigt (163), als auch in der Verstärkung anti-inflammatorischer Signale, wie am Beispiel des Mannose-Rezeptors und TLR-4 gezeigt (152), resultieren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der CLR DC-SIGN TLR-abhängige als auch TLR-unabhängige Signale weit reichend modulieren kann. Sowohl die Sekretion pro- als auch anti-inflammatorischer Zytokine wird nachhaltig gesteigert. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen somit neben den bereits beschriebenen Varianten eine weitere Möglichkeit der Modulation aktivierender Signale durch CLR auf.

#### **4.2. Die Rolle von Zellwand-assoziiertem mannosyliertem Lipoarabinomannan im Rahmen der Interaktion von Mykobakterien mit dendritischen Zellen**

Die Untersuchung isolierter Strukturen von Pathogenen dient zunächst dem mechanistischen Verständnis der Interaktion mit den betreffenden Wirtszellen auf molekularer Ebene. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei in erster Linie auf der Analyse prominenter und dominanter Interaktionen. Im Rahmen der Infektion dendritischer Zellen mit Mykobakterien des TB-Komplexes ist die Ligandbindung des CLR DC-SIGN auf der Oberfläche dendritischer Zellen durch mykobakterielles mannosyliertes Lipoarabinomannan als eine prominente Interaktion anzusehen. DC-SIGN stellt den Hauptrezeptor für Mykobakterien für deren Aufnahme in dendritische Zellen dar. Diese Interaktion ist Mannose-abhängig und kann daher neben der Verwendung eines  $\alpha$ -DC-SIGN-Antikörpers durch Mannan inhibiert werden (Abbildung 14).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Präsenz beider Bindungspartner, mannosyliertes Lipoarabinomannan und DC-SIGN, die mykobakterielle Bindung an dendritische Zellen maßgeblich verstärkt (Abbildung 15 A). Weiterhin legen die Daten nahe, dass parallel andere Moleküle sowohl auf der mykobakteriellen Zellwand als auch auf der Oberfläche der dendritischen Zellen eine zusätzliche Mannose-unabhängige Interaktion und Aufnahme der Mykobakterien ermöglichen. Die Interaktion von Mykobakterien und dendritischen Zellen führt auch in Abwesenheit von DC-SIGN und mannosyliertem Lipoarabinomannan zu einer Bindung und Aufnahme der Mykobakterien durch dendritische Zellen. Die hier zu Grunde liegenden Mechanismen ermöglichen sowohl Mykobakterien der TB-Familie als auch nicht-tuberkulösen Mykobakterien eine Interaktion mit dendritischen Zellen (Abbildung 15 A und B).

Basierend auf den durchgeführten *in vitro* Analysen unter Verwendung von isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan aus *M. tuberculosis* H37Rv konnten diesem Molekül eindeutig immunmodulatorische Eigenschaften im Rahmen einer kollaborativen, TLR-abhängigen als auch TLR-unabhängigen (Abbildung 5) Aktivierung dendritischer Zellen zugeordnet werden. Interagieren dendritische Zellen nun mit Mykobakterien des TB-Komplexes beziehungsweise mit nicht-tuberkulösen Mykobakterien, so sind qualitativ unterschiedliche Immunantworten denkbar,

begründet in den immunmodulatorischen Eigenschaften des mannosylierten Lipoarabinomannans.

Die dargestellten Untersuchungen unter Verwendung von Mykobakterien des TB-Komplexes und nicht-tuberkulösen Bakterien sowie DC-SIGN-exprimierenden und nicht DC-SIGN-exprimierenden Zellen zeigen überraschenderweise keine qualitativ veränderte Sekretion von Zytokinen durch die aktivierte dendritische Zelle. Weder die Präsenz des mannosylierten Lipoarabinomannans auf der mykobakteriellen Oberfläche, noch die Präsenz von DC-SIGN auf der Oberfläche dendritischer Zellen führt zu einer bevorzugten Induktion pro- oder anti-inflammatorisch orientierter Immunantworten, betrachtet man das Verhältnis der Sekretion der Zytokine IL-10 und TNF- $\alpha$  (Abbildung 17 und 18).

Im Verlauf der Infektion mit *M. tuberculosis* ist das Lipoarabinomannan als entscheidendes Molekül im Rahmen der klinischen Manifestation einer Tuberkulose anzusehen (s. Einleitung 1.2.2.). Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass hierbei zum Beispiel maßgeblich die Acylierung des Lipoarabinomannans verantwortlich für die resultierenden immunmodulatorischen Effekte ist (164).

Der Modifikation des Lipoarabinomannans mit terminalen Mannose-Resten wird ebenfalls eine große Bedeutung zugeschrieben. Diese Modifikationen sind spezifisch für einzelne mykobakterielle Spezies (s. Einleitung 1.2.2.). Im Hinblick auf das mannosylierte Lipoarabinomannan wurde ursprünglich eine exklusive Expression dieses Moleküls durch *M. tuberculosis*-Stämme postuliert und eine Korrelation mit deren Virulenz angenommen (165). Mit dem Nachweis des mannosylierten Lipoarabinomannans auf *M. bovis* BCG wurde diese Aussage mittlerweile revidiert (166). Vielmehr geht mit der Spezies-spezifischen Modifikation des Lipoarabinomannans zunächst eine selektive Erkennung von Mykobakterien durch bestimmte Rezeptoren, zum Beispiel DC-SIGN, einher (69).

Die Interaktion von Mykobakterien des TB-Komplexes mit dendritischen Zellen durch Ligation von DC-SIGN durch mannosyliertes Lipoarabinomannan ist somit von großer Bedeutung für eine effektive Aufnahme von Mykobakterien des TB-Komplexes in dendritische Zellen. Funktionelle Konsequenzen im Hinblick auf die Modulation von Immunantworten resultieren jedoch zunächst nicht aus der genannten Interaktion. Zellwand-assoziiertes mannosyliertes Lipoarabinomannan kann somit in erster Linie zunächst als ein Virulenzfaktor betrachtet werden, der die Aufnahme von

Mykobakterien des TB-Komplexes in die Wirtszellen verstärkt. Immunmodulatorische Eigenschaften sind hingegen maßgeblich dem isolierten Molekül zuzuschreiben. Im Verlauf einer mykobakteriellen Infektion, zum Beispiel mit *M. tuberculosis*, können Lipoarabinomannane jedoch sowohl in Zellwand-gebundener als auch in isolierter (löslicher) Form auftreten. Im Blut von TB-Patienten konnten lösliche Lipoarabinomannane nachgewiesen werden (136). Auch die Sekretion bisher unidentifizierter mykobakterieller Substanzen führt zu einer Induktion von DC-SIGN in Alveolarmakrophagen (127). Nach Bindung und Aufnahme der Mykobakterien in die entsprechenden Immunzellen des Wirtes kann die Manipulation der Wirtszellen somit über den Erstkontakt zwischen Pathogen und Wirtszelle hinausgehen. In Abbildung 19 ist dazu ein 2-Phasen-Modell zur Rolle des mannosylierten Lipoarabinomannans im Verlauf einer mykobakteriellen Infektion dargestellt.

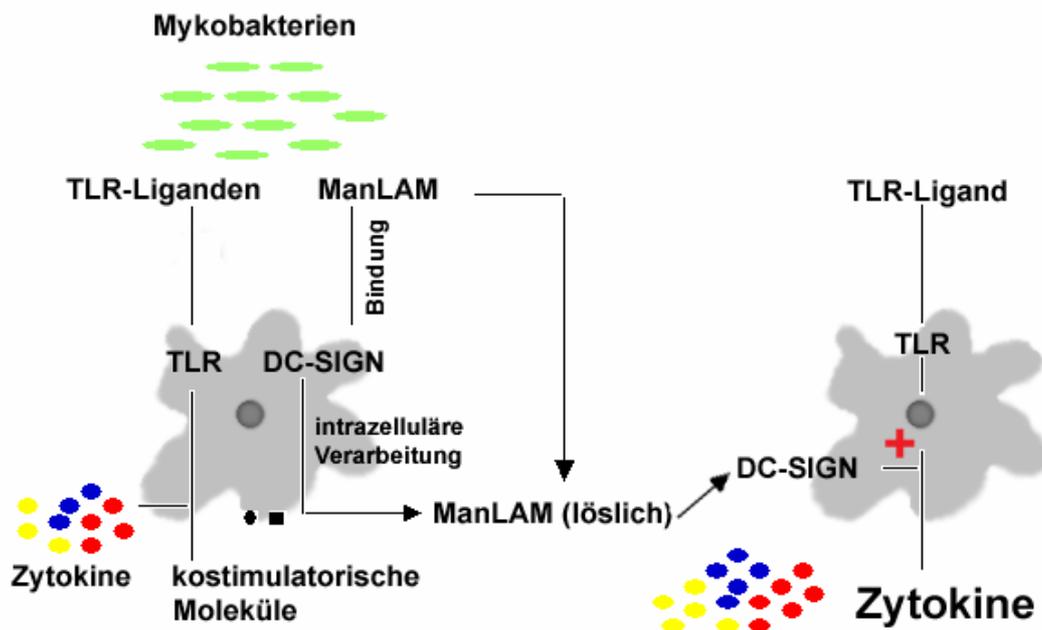


Abbildung 19:

**2-Phasen-Modell zur Rolle des mannosylierten Lipoarabinomannans im Verlauf einer mykobakteriellen Infektion.** Zellwand-gebundenes Lipoarabinomannan erleichtert die mykobakterielle Aufnahme in dendritische Zellen. Nach intrazellulärer Prozessierung und Freisetzung des Lipoarabinomannans erfolgt die Modulation der Immunantwort dendritischer Zellen durch nun löslich vorliegendes mannosyliertes Lipoarabinomannan.

Am Beispiel mykobakteriell infizierter Makrophagen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass ein intrazellulärer Transport des Lipoarabinomannans unter Beteiligung verschiedener Zellorganellen erfolgt und schließlich in einer Freisetzung des Lipoarabinomannans resultiert (135). Mechanistisch liegt diesem Prozess eine Kalzium-abhängige Exozytose lysosomaler Vesikel zu Grunde (167). Die freigesetzten Lipoarabinomannan-haltigen Vesikel können von anderen Zellen, zum Beispiel zuvor nicht infizierten dendritischen Zellen, aufgenommen werden, was zu einer Modulation der Immunantwort der betreffenden Zellen führt. Denkbar ist also, dass erst zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion nach Freisetzung des löslichen Lipoarabinomannans eine Modulation von Immunantworten dendritischer Zellen erfolgt, die letztendlich zu einer nachhaltigen Induktion spezifischer Immunantworten zur Bekämpfung des Pathogens führt.

Fasst man die bisher publizierten Daten und die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Befunde zur Rolle des isolierten (löslichen) und des Zellwand-assoziierten mannosylierten Lipoarabinomannans zusammen, so lässt sich das in Abbildung 19 illustrierte 2-Phasen-Modell im Verlauf einer mykobakteriellen Infektion anwenden: In der ersten Phase der Infektion wird durch Zellwand-gebundenes mannosyliertes Lipoarabinomannan die Aufnahme von Mykobakterien des TB-Komplexes in Immunzellen des Wirtes verstärkt. In der zweiten Phase der Infektion kann die Immunantwort der Wirtszellen, wie in dieser Arbeit gezeigt, nach Kontakt mit löslichem Lipoarabinomannan nachhaltig moduliert werden. Denkbar wäre somit der Einsatz von isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan als positiv verstärkender Immunmodulator. Wie zuvor beschrieben, stellt eine gesteigerte Expression von DC-SIGN einen Schutz vor TB-Infektionen dar. Dies wurde *in vivo* für die humane Situation beschrieben (127) und konnte auch im Mausmodell durch ein verlängertes Überleben DC-SIGN-transgener TB-infizierter Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe gezeigt werden (168). Die Konfrontation DC-SIGN-positiver dendritischer Zellen mit isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan könnte somit positiv den Verlauf einer Infektion zugunsten des Wirtes beeinflussen. Die systematische Manipulation dendritischer Zellen mit isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan bietet demzufolge die Möglichkeit diese gezielt, und dadurch sehr effektiv therapeutisch einzusetzen.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* der Einfluss von mykobakteriellem mannosyliertem Lipoarabinomannan in löslicher (isolierter) und in Zellwand-assoziiierter Form auf die Aktivierung humaner dendritischer Zellen untersucht. Ziel war es, die Integration multipler aktivierender, inflammatorischer Signale zu analysieren, denen dendritische Zellen im Rahmen einer Infektion ausgesetzt sind. Dazu wurde zunächst in einem Modellsystem der Einfluss von isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan aus *M. tuberculosis* H37Rv auf die LPS-vermittelte Aktivierung dendritischer Zellen betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass isoliertes mannosyliertes Lipoarabinomannan als potenter Immunmodulator im Hinblick auf eine universell verstärkte Sekretion sowohl pro- als auch anti-inflammatorischer Zytokine durch dendritische Zellen im Rahmen der Stimulation mit LPS oder anderen TLR-abhängigen sowie TLR-unabhängigen aktivierenden Stimuli fungiert. Es handelt sich hierbei um einen kostimulatorischen, synergistischen Effekt. Dieser führt zu einer quantitativen, nicht jedoch qualitativen Modulation der Immunantwort dendritischer Zellen. Die verstärkte Aktivierung dendritischer Zellen in Gegenwart von isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan hat funktionelle Konsequenzen für die Modulation nachgeschalteter T-Zell-Antworten. In Abhängigkeit von isoliertem mannosyliertem Lipoarabinomannan wird die Proliferation von T-Zellen gesteigert und das T-Zell-Zytokinprofil Richtung Th1-orientierter Immunantworten verschoben. Die Effektivität der Antigenpräsentation dendritischer Zellen wird hingegen durch isoliertes mannosyliertes Lipoarabinomannan nicht beeinflusst.

Im Verlauf einer mykobakteriellen Infektion tritt mannosyliertes Lipoarabinomannan sowohl in isolierter als auch Zellwand-gebundener Form auf. Daher wurde abschließend der Einfluss der Expression von mannosyliertem Lipoarabinomannan auf der mykobakteriellen Zellwand im Rahmen der Modulation der Zytokinantwort dendritischer Zellen betrachtet. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen experimentellen Befunden der Immunmodulation durch isoliertes mannosyliertes Lipoarabinomannan spielt Zellwand-assoziiertes mannosyliertes Lipoarabinomannan diesbezüglich eine untergeordnete Rolle. Essenziell ist es jedoch als Interaktionspartner, der die Bindung von Mykobakterien an dendritische Zellen verstärkt und damit deren Aufnahme in die Zelle erleichtert.

Auf Basis der ermittelten Daten lässt sich ein 2-Phasen-Modell zur Rolle des mannosylierten Lipoarabinomannans im Rahmen der Interaktion von Mykobakterien mit dendritischen Zellen vorschlagen. In der ersten Phase der Interaktion von Mykobakterium und Wirtszelle fungiert Zellwand-assoziiertes mannosyliertes Lipoarabinomannan als ein die Aufnahme in die Immunzelle des Wirtes erleichternder Ligand. Im weiteren Verlauf einer mykobakteriellen Infektion könnte mannosyliertes Lipoarabinomannan in der löslichen Form, zum Beispiel nach Freisetzung aus den betreffenden Zellen, nachhaltig das Antwortverhalten von Immunzellen modulieren.

**VI. LITERATURVERZEICHNIS**

1. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173:89-97.
2. Hamerman, J. A., K. Ogasawara, and L. L. Lanier. 2005. NK cells in innate immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 17:29-35.
3. Raulet, D. H. 2004. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat.Immunol.* 5:996-1002.
4. Reis e Sousa. 2004. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 16:21-25.
5. Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
6. Kapsenberg, M. L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat.Rev.Immunol.* 3:984-993.
7. Andrews, D. M., C. E. Andoniou, A. A. Scalzo, S. L. van Dommelen, M. E. Wallace, M. J. Smyth, and M. A. Degli-Esposti. 2005. Cross-talk between dendritic cells and natural killer cells in viral infection. *Mol.Immunol.* 42:547-555.
8. Burmester G. B., Pezutto A., 1998. *Taschenatlas der Immunologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p. 42.
9. Steinman, R. M. and Z. A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J.Exp.Med.* 137:1142-1162.
10. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J.Exp.Med.* 179:1109-1118.
11. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 18:767-811.
12. Reid, C. D., P. R. Fryer, C. Clifford, A. Kirk, J. Tikerpae, and S. C. Knight. 1990. Identification of hematopoietic progenitors of macrophages and dendritic Langerhans cells (DL-CFU) in human bone marrow and peripheral blood. *Blood* 76:1139-1149.
13. Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu.Rev.Immunol.* 9:271-296.
14. MacDonald, K. P., D. J. Munster, G. J. Clark, A. Dzionek, J. Schmitz, and D. N. Hart. 2002. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100:4512-4520.

15. O'Doherty, U., M. Peng, S. Gezelter, W. J. Swiggard, M. Betjes, N. Bhardwaj, and R. M. Steinman. 1994. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82:487-493.
16. Liu, Y. J. 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106:259-262.
17. Kohrgruber, N., N. Halanek, M. Groger, D. Winter, K. Rappersberger, M. Schmitt-Egenolf, G. Stingl, and D. Maurer. 1999. Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J.Immunol.* 163:3250-3259.
18. Robinson, S. P., S. Patterson, N. English, D. Davies, S. C. Knight, and C. D. Reid. 1999. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 29:2769-2778.
19. Romani, N., S. Holzmann, C. H. Tripp, F. Koch, and P. Stoitzner. 2003. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS* 111:725-740.
20. Visintin, A., A. Mazzoni, J. H. Spitzer, D. H. Wyllie, S. K. Dower, and D. M. Segal. 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J.Immunol.* 166:249-255.
21. Wagner, H. 2002. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr.Opin.Microbiol.* 5:62-69.
22. Hoene, V., M. Peiser, and R. Wanner. 2006. Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19. *J.Leukoc.Biol.* 80:1328-1336.
23. Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia, and M. Colonna. 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat.Med.* 5:919-923.
24. Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, and Y. J. Liu. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835-1837.
25. Biron, C. A. 1999. Initial and innate responses to viral infections--pattern setting in immunity or disease. *Curr.Opin.Microbiol.* 2:374-381.
26. Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan, and Y. J. Liu. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J.Exp.Med.* 194:863-869.
27. Sieling, P. A. and R. L. Modlin. 2002. Toll-like receptors: mammalian "taste receptors" for a smorgasbord of microbial invaders. *Curr.Opin.Microbiol.* 5:70-75.

28. Rothenfusser, S., E. Tuma, S. Endres, and G. Hartmann. 2002. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum.Immunol.* 63:1111-1119.
29. Kalinski, P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol.Today* 20:561-567.
30. Reis e Sousa, A. Sher, and P. Kaye. 1999. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr.Opin.Immunol.* 11:392-399.
31. Reis e Sousa, S. D. Diebold, A. D. Edwards, N. Rogers, O. Schulz, and R. Sporri. 2003. Regulation of dendritic cell function by microbial stimuli. *Pathol.Biol.(Paris)* 51:67-68.
32. Alters, S. E., J. R. Gadea, B. Holm, J. Lebkowski, and R. Philip. 1999. IL-13 can substitute for IL-4 in the generation of dendritic cells for the induction of cytotoxic T lymphocytes and gene therapy. *J.Immunother.* 22:229-236.
33. Ebner, S., S. Hofer, V. A. Nguyen, C. Furhapter, M. Herold, P. Fritsch, C. Heufler, and N. Romani. 2002. A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *J.Immunol.* 168:6199-6207.
34. Kadowaki, N., S. Antonenko, S. Ho, M. C. Rissoan, V. Soumelis, S. A. Porcelli, L. L. Lanier, and Y. J. Liu. 2001. Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells. *J.Exp.Med.* 193:1221-1226.
35. Mohamadzadeh, M., F. Berard, G. Essert, C. Chalouni, B. Pulendran, J. Davoust, G. Bridges, A. K. Palucka, and J. Banchereau. 2001. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J.Exp.Med.* 194:1013-1020.
36. Strobl, H., C. Bello-Fernandez, E. Riedl, W. F. Pickl, O. Majdic, S. D. Lyman, and W. Knapp. 1997. flt3 ligand in cooperation with transforming growth factor-beta1 potentiates in vitro development of Langerhans-type dendritic cells and allows single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions. *Blood* 90:1425-1434.
37. Zou, G. M. and Y. K. Tam. 2002. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur.Cytokine Netw.* 13:186-199.
38. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 21:335-376.
39. Takeda, K. and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int.Immunol.* 17:1-14.
40. Figdor, C. G., Y. van Kooyk, and G. J. Adema. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat.Rev.Immunol.* 2:77-84.

41. Stahl, P. D. and R. A. Ezekowitz. 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr.Opin.Immunol.* 10:50-55.
42. Murray, P. J. 2005. NOD proteins: an intracellular pathogen-recognition system or signal transduction modifiers? *Curr.Opin.Immunol.* 17:352-358.
43. Philpott, D. J. and S. E. Girardin. 2004. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol.Immunol.* 41:1099-1108.
44. Kawai, T. and S. Akira. 2005. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 17:338-344.
45. Randolph, G. J., V. Angeli, and M. A. Swartz. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat.Rev.Immunol.* 5:617-628.
46. Croft, M. 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat.Rev.Immunol.* 3:609-620.
47. Santini, S. M., C. Lapenta, M. Logozzi, S. Parlato, M. Spada, T. Di Pucchio, and F. Belardelli. 2000. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J.Exp.Med.* 191:1777-1788.
48. Fricke, I., D. Mitchell, F. Petersen, A. Bohle, S. Bulfone-Paus, and S. Brandau. 2004. Platelet factor 4 in conjunction with IL-4 directs differentiation of human monocytes into specialized antigen-presenting cells. *FASEB J.* 18:1588-1590.
49. Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, and J. Banchereau. 1992. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360:258-261.
50. Santiago-Schwarz, F., E. Belilos, B. Diamond, and S. E. Carsons. 1992. TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. *J.Leukoc.Biol.* 52:274-281.
51. Veckman, V., M. Miettinen, J. Pirhonen, J. Siren, S. Matikainen, and I. Julkunen. 2004. Streptococcus pyogenes and Lactobacillus rhamnosus differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *J.Leukoc.Biol.* 75:764-771.
52. Frick, J. S., N. Zahir, M. Muller, F. Kahl, O. Bechtold, M. B. Lutz, C. J. Kirschning, J. Reimann, B. Jilge, E. Bohn, and I. B. Autenrieth. 2006. Colitogenic and non-colitogenic commensal bacteria differentially trigger DC maturation and Th cell polarization: an important role for IL-6. *Eur.J.Immunol.* 36:1537-1547.
53. Henderson, R. A., S. C. Watkins, and J. L. Flynn. 1997. Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis. *J.Immunol.* 159:635-643.

54. Fricke, I., D. Mitchell, J. Mittelstadt, N. Lehan, H. Heine, T. Goldmann, A. Bohle, and S. Brandau. 2006. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J.Immunol.* 176:5173-5182.
55. Tailleux, L., O. Schwartz, J. L. Herrmann, E. Pivert, M. Jackson, A. Amara, L. Legres, D. Dreher, L. P. Nicod, J. C. Gluckman, P. H. Lagrange, B. Gicquel, and O. Neyrolles. 2003. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J.Exp.Med.* 197:121-127.
56. Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, and D. M. Underhill. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J.Exp.Med.* 197:1107-1117.
57. Means, T. K., E. Lien, A. Yoshimura, S. Wang, D. T. Golenbock, and M. J. Fenton. 1999. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J.Immunol.* 163:6748-6755.
58. Lutz, M. B. and G. Schuler. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23:445-449.
59. McGuirk, P., C. McCann, and K. H. Mills. 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by Bordetella pertussis. *J.Exp.Med.* 195:221-231.
60. Reis e Sousa. 2004. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin.Immunol.* 16:27-34.
61. Runyon, E. H. 1974. Ten mycobacterial pathogens. *Tubercle.* 55:235-240.
62. Brown-Elliott, B. A. and R. J. Wallace, Jr. 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin.Microbiol.Rev.* 15:716-746.
63. Springer, B., L. Stockman, K. Teschner, G. D. Roberts, and E. C. Bottger. 1996. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J.Clin.Microbiol.* 34:296-303.
64. Schlesinger, L. S. 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J.Immunol.* 150:2920-2930.
65. Schlesinger, L. S., C. G. Bellinger-Kawahara, N. R. Payne, and M. A. Horwitz. 1990. Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J.Immunol.* 144:2771-2780.
66. Abou-Zeid, C., T. L. Ratliff, H. G. Wiker, M. Harboe, J. Bennedsen, and G. A. Rook. 1988. Characterization of fibronectin-binding antigens released by Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG. *Infect.Immun.* 56:3046-3051.

67. Rao, S. P., K. Ogata, and A. Catanzaro. 1993. Mycobacterium avium-M. intracellulare binds to the integrin receptor alpha v beta 3 on human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect.Immun.* 61:663-670.
68. Peterson, P. K., G. Gekker, S. Hu, W. S. Sheng, W. R. Anderson, R. J. Ulevitch, P. S. Tobias, K. V. Gustafson, T. W. Molitor, and C. C. Chao. 1995. CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized Mycobacterium tuberculosis by human microglia. *Infect.Immun.* 63:1598-1602.
69. Maeda, N., J. Nigou, J. L. Herrmann, M. Jackson, A. Amara, P. H. Lagrange, G. Puzo, B. Gicquel, and O. Neyrolles. 2003. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between Mycobacterium species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J.Biol.Chem.* 278:5513-5516.
70. van Kooyk, Y. and T. B. Geijtenbeek. 2003. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat.Rev.Immunol.* 3:697-709.
71. Daffe, M. and P. Draper. 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv.Microb.Physiol* 39:131-203.
72. Frehel, C., C. de Chastellier, C. Offredo, and P. Berche. 1991. Intramacrophage growth of Mycobacterium avium during infection of mice. *Infect.Immun.* 59:2207-2214.
73. Finlay, B. B. and P. Cossart. 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276:718-725.
74. Fortsch, D., M. Rollinghoff, and S. Stenger. 2000. IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent Mycobacterium tuberculosis. *J.Immunol.* 165:978-987.
75. Bilyk, N. and P. G. Holt. 1995. Cytokine modulation of the immunosuppressive phenotype of pulmonary alveolar macrophage populations. *Immunology* 86:231-237.
76. McCombs, C. C., J. P. Michalski, B. T. Westerfield, and R. W. Light. 1982. Human alveolar macrophages suppress the proliferative response of peripheral blood lymphocytes. *Chest* 82:266-271.
77. Rich, E. A., D. J. Tweardy, H. Fujiwara, and J. J. Ellner. 1987. Spectrum of immunoregulatory functions and properties of human alveolar macrophages. *Am.Rev.Respir.Dis.* 136:258-265.
78. Yeager, H., Jr., J. A. Sweeney, H. B. Herscowitz, I. S. Barsoum, and E. Kagan. 1982. Modulation of mitogen-induced proliferation of autologous peripheral blood lymphocytes by human alveolar macrophages. *Infect.Immun.* 38:260-266.
79. Heinzl, A. S., J. E. Grotzke, R. A. Lines, D. A. Lewinsohn, A. L. McNabb, D. N. Streblow, V. M. Braud, H. J. Grieser, J. T. Belisle, and D. M. Lewinsohn. 2002. HLA-E-dependent presentation of Mtb-derived antigen to human CD8+ T cells. *J.Exp.Med.* 196:1473-1481.

80. Kawashima, T., Y. Norose, Y. Watanabe, Y. Enomoto, H. Narazaki, E. Watari, S. Tanaka, H. Takahashi, I. Yano, M. B. Brenner, and M. Sugita. 2003. Cutting edge: major CD8 T cell response to live bacillus Calmette-Guerin is mediated by CD1 molecules. *J.Immunol.* 170:5345-5348.
81. Mellman, I., S. J. Turley, and R. M. Steinman. 1998. Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol.* 8:231-237.
82. Mellman, I. and R. M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255-258.
83. Pozzi, L. A., J. W. Maciaszek, and K. L. Rock. 2005. Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. *J.Immunol.* 175:2071-2081.
84. Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, and S. Amigorena. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 20:621-667.
85. Draper P., 1982. *The anatomy of mycobacteria. In: Rathledge C, Stanford JL (Hrsg). The Biology of Mycobacteria. Bd.1. Academic Press, London, pp. 9-52.*
86. Draper, P. 1998. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front Biosci.* 3:D1253-D1261.
87. Otte H. J., 1961. *Leitfaden der Medizinischen Mikrobiologie.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p. 31.
88. Wittkowski, M. Untersuchungen zur Struktur und biologischen Aktivität von Polysacchariden aus der Kapsel von *M. avium*. 2005. Thesis/Dissertation nach: Chatterjee, D. 1997. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 1:579-588.
89. Rastogi, N. 1991. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. *Res.Microbiol.* 142:464-476.
90. Gilleron, M., L. Bala, T. Brando, A. Vercellone, and G. Puzo. 2000. Mycobacterium tuberculosis H37Rv parietal and cellular lipoarabinomannans. Characterization of the acyl- and glyco-forms. *J.Biol.Chem.* 275:677-684.
91. Sibley, L. D., S. W. Hunter, P. J. Brennan, and J. L. Krahenbuhl. 1988. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect.Immun.* 56:1232-1236.
92. Roach, T. I., C. H. Barton, D. Chatterjee, and J. M. Blackwell. 1993. Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of Mycobacterium tuberculosis differentially induces the early genes c-fos, KC, JE, and tumor necrosis factor-alpha. *J.Immunol.* 150:1886-1896.

93. Yoshida, A. and Y. Koide. 1997. Arabinofuranosyl-terminated and mannosylated lipoarabinomannans from *Mycobacterium tuberculosis* induce different levels of interleukin-12 expression in murine macrophages. *Infect.Immun.* 65:1953-1955.
94. Zhang, Y., M. Broser, H. Cohen, M. Bodkin, K. Law, J. Reibman, and W. N. Rom. 1995. Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to *Mycobacterium tuberculosis* and its components. *J.Clin.Invest* 95:586-592.
95. Chan, J., X. D. Fan, S. W. Hunter, P. J. Brennan, and B. R. Bloom. 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect.Immun.* 59:1755-1761.
96. Chang, J. C., A. Wysocki, K. M. Tchou-Wong, N. Moskowitz, Y. Zhang, and W. N. Rom. 1996. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* and its components on macrophages and the release of matrix metalloproteinases. *Thorax* 51:306-311.
97. Knutson, K. L., Z. Hmama, P. Herrera-Velitz, R. Rochford, and N. E. Reiner. 1998. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. Role of the Src homology 2 containing tyrosine phosphatase 1. *J.Biol.Chem.* 273:645-652.
98. Tailleux, L., N. Maeda, J. Nigou, B. Gicquel, and O. Neyrolles. 2003. How is the phagocyte lectin keyboard played? Master class lesson by *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 11:259-263.
99. Nigou, J., A. Vercellone, and G. Puzo. 2000. New structural insights into the molecular deciphering of mycobacterial lipoglycan binding to C-type lectins: lipoarabinomannan glycoform characterization and quantification by capillary electrophoresis at the subnanomole level. *J.Mol.Biol.* 299:1353-1362.
100. Geijtenbeek, T. B., S. J. van Vliet, E. A. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C. M. Vandenbroucke-Grauls, B. Appelmelk, and Y. van Kooyk. 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J.Exp.Med.* 197:7-17.
101. Franz H. 1988. The Ricin Story. *Adv.Lectin Res.* 1:10-25.
102. Sharon, N. and H. Lis. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14:53R-62R.
103. Varki A. *Discovery and classification of animal lectins. In: Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 333-343.
104. Cambi, A. and C. G. Figdor. 2003. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15:539-546.
105. Lu, J., C. Teh, U. Kishore, and K. B. Reid. 2002. Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochim.Biophys.Acta* 1572:387-400.

106. Kawasaki, N., T. Kawasaki, and I. Yamashina. 1983. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *J.Biochem.(Tokyo)* 94:937-947.
107. McGreal, E. P., L. Martinez-Pomares, and S. Gordon. 2004. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol.Immunol.* 41:1109-1121.
108. Engering, A., T. B. Geijtenbeek, S. J. van Vliet, M. Wijers, E. van Liempt, N. Demaurex, A. Lanzavecchia, J. Fransen, C. G. Figdor, V. Piguet, and Y. van Kooyk. 2002. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J.Immunol.* 168:2118-2126.
109. Stahl, P., P. H. Schlesinger, E. Sigardson, J. S. Rodman, and Y. C. Lee. 1980. Receptor-mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: characterization and evidence for receptor recycling. *Cell* 19:207-215.
110. Tietze, C., P. Schlesinger, and P. Stahl. 1982. Mannose-specific endocytosis receptor of alveolar macrophages: demonstration of two functionally distinct intracellular pools of receptor and their roles in receptor recycling. *J.Cell Biol.* 92:417-424.
111. Cambi, A., M. Koopman, and C. G. Figdor. 2005. How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol.* 7:481-488.
112. Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk, and C. G. Figdor. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575-585.
113. Geijtenbeek, T. B., D. J. Krooshoop, D. A. Bleijs, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, V. Grabovsky, R. Alon, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat.Immunol.* 1:353-357.
114. van Gisbergen, K. P., T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2005. Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol.* 26:626-631.
115. van Gisbergen, K. P., I. S. Ludwig, T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2005. Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett.* 579:6159-6168.
116. van Gisbergen, K. P., M. Sanchez-Hernandez, T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2005. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J.Exp.Med.* 201:1281-1292.
117. Curtis, B. M., S. Scharnowske, and A. J. Watson. 1992. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:8356-8360.

118. Soilleux, E. J. 2003. DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) and DC-SIGN-related (DC-SIGNR): friend or foe? *Clin.Sci.(Lond)* 104:437-446.
119. Bernhard, O. K., J. Lai, J. Wilkinson, M. M. Sheil, and A. L. Cunningham. 2004. Proteomic analysis of DC-SIGN on dendritic cells detects tetramers required for ligand binding but no association with CD4. *J.Biol.Chem.* 279:51828-51835.
120. Mitchell, D. A., A. J. Fadden, and K. Drickamer. 2001. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J.Biol.Chem.* 276:28939-28945.
121. Bergman, M. P., A. Engering, H. H. Smits, S. J. van Vliet, A. A. van Bodegraven, H. P. Wirth, M. L. Kapsenberg, C. M. Vandenbroucke-Grauls, Y. van Kooyk, and B. J. Appelmek. 2004. Helicobacter pylori modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J.Exp.Med.* 200:979-990.
122. Cambi, A., K. Gijzen, J. M. de Vries, R. Torensma, B. Joosten, G. J. Adema, M. G. Netea, B. J. Kullberg, L. Romani, and C. G. Figdor. 2003. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for Candida albicans on dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 33:532-538.
123. Cambi, A., F. de Lange, N. M. van Maarseveen, M. Nijhuis, B. Joosten, E. M. van Dijk, B. I. de Bakker, J. A. Fransen, P. H. Bovee-Geurts, F. N. van Leeuwen, N. F. Van Hulst, and C. G. Figdor. 2004. Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J.Cell Biol.* 164:145-155.
124. Steeghs, L., S. J. van Vliet, H. Uronen-Hansson, A. van Mourik, A. Engering, M. Sanchez-Hernandez, N. Klein, R. Callard, J. P. van Putten, L. P. van der, Y. van Kooyk, and J. G. van de Winkel. 2006. Neisseria meningitidis expressing IgtB lipopolysaccharide targets DC-SIGN and modulates dendritic cell function. *Cell Microbiol.* 8:316-325.
125. Van, D., I, S. J. van Vliet, A. K. Nyame, R. D. Cummings, C. M. Bank, B. Appelmek, T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2003. The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for Schistosoma mansoni egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. *Glycobiology* 13:471-478.
126. Rappocciolo, G., F. J. Jenkins, H. R. Hensler, P. Piazza, M. Jais, L. Borowski, S. C. Watkins, and C. R. Rinaldo, Jr. 2006. DC-SIGN is a receptor for human herpesvirus 8 on dendritic cells and macrophages. *J.Immunol* 176:1741-1749.
127. Tailleux, L., N. Pham-Thi, A. Bergeron-Lafaurie, J. L. Herrmann, P. Charles, O. Schwartz, P. Scheinmann, P. H. Lagrange, J. de Blic, A. Tazi, B. Gicquel, and O. Neyrolles. 2005. DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis. *PLoS.Med.* 2:e381.

128. Rappocciolo, G., P. Piazza, C. L. Fuller, T. A. Reinhart, S. C. Watkins, D. T. Rowe, M. Jais, P. Gupta, and C. R. Rinaldo. 2006. DC-SIGN on B lymphocytes is required for transmission of HIV-1 to T lymphocytes. *PLoS Pathog* 2:e70.
129. Luo, Y., A. Szilvasi, X. Chen, W. C. DeWolf, and M. A. O'Donnell. 1996. A novel method for monitoring *Mycobacterium bovis* BCG trafficking with recombinant BCG expressing green fluorescent protein. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 3:761-768.
130. Loskog, A., T. H. Totterman, A. Bohle, and S. Brandau. 2002. In vitro activation of cancer patient-derived dendritic cells by tumor cells genetically modified to express CD154. *Cancer Gene Ther.* 9:846-853.
131. Boyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand.J.Clin.Lab Invest Suppl* 97:77-89.
132. Contreras, T. J., J. F. Jemionek, H. C. Stevenson, V. M. Hartwig, and A. S. Fauci. 1980. An improved technique for the negative selection of large numbers of human lymphocytes and monocytes by counterflow centrifugation-elutriation. *Cell Immunol.* 54:215-229.
133. Relloso, M., A. Puig-Kroger, O. M. Pello, J. L. Rodriguez-Fernandez, R. G. de la, N. Longo, J. Navarro, M. A. Munoz-Fernandez, P. Sanchez-Mateos, and A. L. Corbi. 2002. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J.Immunol.* 168:2634-2643.
134. Dzionek, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D. W. Buck, and J. Schmitz. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J.Immunol.* 165:6037-6046.
135. Beatty, W. L., E. R. Rhoades, H. J. Ullrich, D. Chatterjee, J. E. Heuser, and D. G. Russell. 2000. Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic.* 1:235-247.
136. Sada, E., D. Aguilar, M. Torres, and T. Herrera. 1992. Detection of lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis. *J.Clin.Microbiol.* 30:2415-2418.
137. Loscher, C. E., E. Draper, O. Leavy, D. Kelleher, K. H. Mills, and H. M. Roche. 2005. Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction. *J.Immunol.* 175:4990-4998.
138. Majumder N, Dey R, Mathur RK, Datta S, Maitra M, Ghosh S, Saha B, and Majumdar S. 2006. An unusual pro-inflammatory role of interleukin-10 induced by arabinosylated lipoarabinomannan in murine peritoneal macrophages. *Glycoconj.J.*

139. Wu, Y., S. Adam, L. Hamann, H. Heine, A. J. Ulmer, U. Buwitt-Beckmann, and C. Stamme. 2004. Accumulation of inhibitory kappaB-alpha as a mechanism contributing to the anti-inflammatory effects of surfactant protein-A. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 31:587-594.
140. Barreiro, L. B., O. Neyrolles, C. L. Babb, L. Tailleux, H. Quach, K. McElreavey, P. D. Helden, E. G. Hoal, B. Gicquel, and L. Quintana-Murci. 2006. Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. *PLoS.Med.* 3:e20.
141. Jiao, X., R. Lo-Man, P. Guernonprez, L. Fiette, E. Deriaud, S. Burgaud, B. Gicquel, N. Winter, and C. Leclerc. 2002. Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity. *J.Immunol.* 168:1294-1301.
142. Sanger, C., A. Busche, G. Bentien, R. Spallek, F. Jonas, A. Bohle, M. Singh, and S. Brandau. 2004. Immunodominant PstS1 antigen of mycobacterium tuberculosis is a potent biological response modifier for the treatment of bladder cancer. *BMC.Cancer* 4:86.
143. Caparros, E., P. Munoz, E. Sierra-Filardi, D. Serrano-Gomez, A. Puig-Kroger, J. L. Rodriguez-Fernandez, M. Mellado, J. Sancho, M. Zubiaur, and A. L. Corbi. 2006. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood* 107:3950-3958.
144. Rogers, N. C., E. C. Slack, A. D. Edwards, M. A. Nolte, O. Schulz, E. Schweighoffer, D. L. Williams, S. Gordon, V. L. Tybulewicz, G. D. Brown, and Reis e Sousa. 2005. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity.* 22:507-517.
145. Pathak, S. K., S. Basu, A. Bhattacharyya, S. Pathak, M. Kundu, and J. Basu. 2005. Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated IRAK-M induction negatively regulates Toll-like receptor-dependent interleukin-12 p40 production in macrophages. *J.Biol.Chem.* 280:42794-42800.
146. Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond MW, Giedlin M.A., and Coffman R.L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol* 136:2348-2357.
147. Del Prete G. 1998. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int.Rev.Immunol.* 16:427-455.
148. Yip H.C., Kyrulin A.Y., Tary-Lehmann M., Hesse M.D., Radeke H., Heeger P.S., Trezza R.P., Heinzl F.P., Forsthuber T., and Lehmann P.V. 1999. Adjuvant-guided type-1 and type-2 immunity: infectious/noninfectious dichotomy defines the class of response. *J.Immunol* 162:3949.
149. Cher D.J. and Mosmann T.R. 1987. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J.Immunol* 138:3688-3694.

150. Brown, G. D., J. Herre, D. L. Williams, J. A. Willment, A. S. Marshall, and S. Gordon. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J.Exp.Med.* 197:1119-1124.
151. Brown, G. D. 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat.Rev.Immunol.* 6:33-43.
152. Nigou, J., C. Zelle-Rieser, M. Gilleron, M. Thurnher, and G. Puzo. 2001. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J.Immunol.* 166:7477-7485.
153. Geijtenbeek, T. B. and Y. van Kooyk. 2003. Pathogens target DC-SIGN to influence their fate DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity. *APMIS* 111:698-714.
154. van Kooyk, Y., B. Appelmek, and T. B. Geijtenbeek. 2003. A fatal attraction: Mycobacterium tuberculosis and HIV-1 target DC-SIGN to escape immune surveillance. *Trends Mol.Med.* 9:153-159.
155. van Kooyk, Y., A. Engering, A. N. Lekkerkerker, I. S. Ludwig, and T. B. Geijtenbeek. 2004. Pathogens use carbohydrates to escape immunity induced by dendritic cells. *Curr.Opin.Immunol.* 16:488-493.
156. Soilleux, E. J., L. S. Morris, G. Leslie, J. Chehimi, Q. Luo, E. Levroney, J. Trowsdale, L. J. Montaner, R. W. Doms, D. Weissman, N. Coleman, and B. Lee. 2002. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J.Leukoc.Biol.* 71:445-457.
157. van Vliet, S. J., E. van Liempt, T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2006. Differential regulation of C-type lectin expression on tolerogenic dendritic cell subsets. *Immunobiology* 211:577-585.
158. Wollenberg, A., M. Mommaas, T. Opiel, E. M. Schottdorf, S. Gunther, and M. Moderer. 2002. Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J.Invest Dermatol.* 118:327-334.
159. Tailleux, L., Gicquel B., and O. Neyrolles. 2005. Mycobacterium tuberculosis and Dendritic cells: Who's manipulating whom? *Current Immunology Reviews* 1:101-105.
160. Pitarque, S., J. L. Herrmann, J. L. Duteyrat, M. Jackson, G. R. Stewart, F. Lecointe, B. Payre, O. Schwartz, D. B. Young, G. Marchal, P. H. Lagrange, G. Puzo, B. Gicquel, J. Nigou, and O. Neyrolles. 2005. Deciphering the molecular bases of Mycobacterium tuberculosis binding to the lectin DC-SIGN reveals an underestimated complexity. *Biochem.J.* 392:615-624.
161. Frison, N., M. E. Taylor, E. Soilleux, M. T. Bousser, R. Mayer, M. Monsigny, K. Drickamer, and A. C. Roche. 2003. Oligolysine-based oligosaccharide clusters: selective recognition and endocytosis by the mannose receptor and

- dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin. *J.Biol.Chem.* 278:23922-23929.
162. Daniels, M. A., K. A. Hogquist, and S. C. Jameson. 2002. Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat Immunol* 3:903-910.
163. Gantner, B. N., R. M. Simmons, and D. M. Underhill. 2005. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J.* 24:1277-1286.
164. Barnes, P. F., D. Chatterjee, J. S. Abrams, S. Lu, E. Wang, M. Yamamura, P. J. Brennan, and R. L. Modlin. 1992. Cytokine production induced by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. Relationship to chemical structure. *J.Immunol* 149:541-547.
165. Chatterjee, D., K. Lowell, B. Rivoire, M. R. McNeil, and P. J. Brennan. 1992. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannosyl residues in some strains. *J.Biol.Chem.* 267:6234-6239.
166. Venisse, A., J. M. Berjeaud, P. Chaurand, M. Gilleron, and G. Puzo. 1993. Structural features of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. Determination of molecular mass by laser desorption mass spectrometry. *J.Biol.Chem.* 268:12401-12411.
167. Beatty, W. L., H. J. Ullrich, and D. G. Russell. 2001. Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event. *Eur.J.Cell Biol.* 80:31-40.
168. Kessner, C. Die Rolle der C-Typ-Lektine DC-SIGN und Makrophagen-Mannose-Rezeptor in der experimentellen Tuberkulose. 2006. Thesis/Dissertation

## VII. ANHANG

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -	anti-
Ag	<u>A</u> ntigen
Ak	<u>A</u> ntik <u>ö</u> rper
BCG	<u>B</u> acillus <u>C</u> almette- <u>G</u> uérin
BDC	dendritische Zelle(n) des peripheren Blutes ( <u>b</u> lood <u>d</u> endritic <u>c</u> ell)
bp	Basenpaar(e) ( <u>b</u> ase <u>p</u> airs)
BSA	Rinderserum ( <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
$\beta$ 2M	<u><math>\beta</math></u> - <u>2</u> <u>M</u> ikroglobulin
CD	Differenzierungsmarker ( <u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation)
cDNA	komplementäre DNA ( <u>c</u> omplementary <u>D</u> NA)
CFU	Kolonie-bildende Einheit ( <u>c</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nit)
Ci	Curie
CCL /R	<u>C</u> C <u>C</u> hemokine <u>L</u> igand/ <u>R</u> ezeptor
CLR	<u>C</u> -Typ- <u>L</u> ektin- <u>R</u> ezeptor
cpm	<u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> illion
DC	dendritische Zelle(n) ( <u>d</u> endritic <u>c</u> ell(s))
DC-SIGN	<u>d</u> endritic <u>c</u> ell- <u>s</u> pecific <u>I</u> CAM-3- <u>g</u> rabbing- <u>n</u> on- <u>i</u> ntegrin
dCTP	2'- <u>D</u> esoxycytosin-5'- <u>t</u> riphosphat
dT	2'- <u>D</u> esoxythymidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <u>d</u> esoxy <u>r</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
dNTP	2'- <u>D</u> esoxynukleosid-5'- <u>t</u> riphosphat
DTT	<u>D</u> ithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacidsäure ( <u>e</u> thylend <u>a</u> min <u>t</u> etra <u>a</u> cidic <u>a</u> cid)
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunabsorptions-Assay ( <u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno- <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay)
ERK	<u>e</u> xtracellular <u>s</u> ignal- <u>r</u> egulated <u>k</u> inase
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung ( <u>f</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting)

FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> s <u>o</u> thiocyanat
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FRET	<u>F</u> örster- <u>R</u> esonanz- <u>E</u> nergie- <u>T</u> ransfer
g	<u>G</u> ravitationskonstante (9,81 m/s)
GFP	grün-fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GM-CSF	<u>G</u> ranulocyte- <u>m</u> acrophage <u>c</u> olony- <u>s</u> timulating factor
h	Stunde
HBSS	<u>H</u> anks <u>B</u> alanced <u>S</u> alt <u>S</u> olution
HIV	humanes Immundefizienzvirus ( <i>human immunodeficiency virus</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horse radish peroxidase</i> )
HS	<u>H</u> umanserum
IFN	<u>I</u> nterferon
IL	<u>I</u> nterleukin
IRAK-M	<u>I</u> nterleukin 1 <u>R</u> ezeptor- <u>a</u> ssoziierte <u>K</u> inase aus <u>M</u> akrophagen
kDa	KiloDalton
LAM	<u>L</u> ipoarabinomannan
LM	<u>L</u> ipomannan
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharid
MACS	magnetisch aktivierte Zellsortierung ( <i>magnetic activated cell sorting</i> )
ManLAM	<u>m</u> annosyliertes <u>L</u> ipoarabinomannan
MBP	<u>M</u> annose- <u>b</u> indendes <u>P</u> rotein
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. chelonae</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>
MFI	durchschnittliche Fluoreszenzintensität ( <i>mean fluorescence intensity</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute
MLR	gemischte Lymphozytenreaktion ( <i>mixed lymphocyte reaction</i> )
MNC	Mononukleäre Zelle(n) ( <i>mononuclear cells</i> )
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MR	<u>M</u> annose- <u>R</u> ezeptor
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
NF $\kappa$ -B	<u>N</u> uclear <u>f</u> actor of <u>k</u> appa light chain enhancer in <u>B</u> cells
NK-Zelle(n)	<u>N</u> atürliche <u>K</u> illerzelle(n)

OD	<u>o</u> ptische <u>D</u> ichte
PAM <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	<u>P</u> almitoyl-3- <u>c</u> ystein- <u>s</u> erin- <u>l</u> ysin-4
PAMP	<u>P</u> athogen <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> attern
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
pDC	<u>p</u> lasmacytoide <u>D</u> C
PE	<u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
PF-4	<u>P</u> lättchenfaktor <u>4</u>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenaktivität
PI3K	<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol- <u>3</u> - <u>k</u> inase
PLC- $\gamma$	<u>P</u> hospholipase <u>C</u> - $\gamma$
PPD	<u>T</u> uberculin-derived <u>p</u> urified <u>p</u> rotein <u>d</u> erivate
PRR	Mustererkennungsrezeptor ( <u>p</u> attern <u>r</u> ecognition <u>r</u> eceptor)
PS	<u>P</u> enicillin/ <u>S</u> treptomycin
rh-	<u>r</u> ekombinant, <u>h</u> uman
RPMI	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute
RNA	Ribonukleinsäure ( <u>r</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
RT	Raumtemperatur
ssRNA	Einzelstrang-Ribonucleinsäure ( <u>s</u> ingle <u>s</u> trand <u>r</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
<i>S. minnesota Salmonella enterica sv. minnesota</i>	
Syk	<u>s</u> plenic <u>t</u> yrosine <u>k</u> inase
TB	Tuberkulose
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orsäure- <u>E</u> DTA
TCR	T-Zell-Rezeptor ( <u>T</u> <u>c</u> ell <u>r</u> eceptor)
Th	<u>T</u> - <u>H</u> elferzelle(n)
TLR	<u>T</u> oll- <u>l</u> ike <u>R</u> ezeptor
TMB	<u>T</u> etramethyl <u>b</u> enzidin
TNF	<u>T</u> umor <u>n</u> ekrosefaktor
Tris	<u>T</u> ris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
U	Biologische Aktivitätseinheit ( <u>u</u> nit)
U/min	<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute
v	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen ( <u>v</u> olume/ <u>v</u> olume)
w/v	Gewicht pro Volumen ( <u>w</u> eight/ <u>v</u> olume)

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Die mykobakterielle Hülle (Schema) bestehend aus Plasmamembran, Zellwand und Kapsel (88).
- Abbildung 2: cDNA-Microarray-Analysen des mRNA-Transkriptionsprofils inflammatorischer Zytokine und ihrer Rezeptoren in stimulierten und unstimulierten DC.
- Abbildung 3: Analyse der DC-Aktivierung nach Stimulation mit ManLAM auf Zytokinebene (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$ ).
- Abbildung 4: Einfluss von ManLAM auf die LPS-induzierte Zytokinsekretion.
- Abbildung 5: Analyse des kostimulatorischen Potenzials von ManLAM in Kombination mit unterschiedlichen TLR-abhängigen und TLR-unabhängigen Liganden.
- Abbildung 6: Immunphänotypisierung DC-SIGN<sup>pos</sup> und DC-SIGN<sup>neg</sup> DC.
- Abbildung 7: Zytokinproduktion *in vitro* generierter DC-SIGN<sup>pos</sup> und DC-SIGN<sup>neg</sup> DC.
- Abbildung 8: A) CD1c- und DC-SIGN- (CD209)-Expression frisch isolierter BDC. B) IL-10-Sekretion frisch isolierter DC-SIGN<sup>neg</sup> BDC *ex vivo*.
- Abbildung 9: Proliferation von Gesamt-T-Zellen im Rahmen Antigen-unabhängiger T-Zell-Aktivierung (gemischte Lymphozytenreaktion, MLR) in Gegenwart von DC-SIGN<sup>pos</sup> (A) und DC-SIGN<sup>neg</sup> (B) DC.
- Abbildung 10: Proliferation naiver CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>-T-Zellen im Rahmen Antigen-unabhängiger T-Zell-Aktivierung (MLR) in Gegenwart von DC-SIGN<sup>pos</sup> DC.
- Abbildung 11: IFN- $\gamma$ -Sekretion von Gesamt-T-Zellen PPD<sup>pos</sup> Spender im Rahmen Antigen-abhängiger T-Zell-Aktivierung (Antigen-Präsentations-Assay) nach Kokultur mit LPS und/oder ManLAM-aktivierten DC und anschließender PPD-Restimulation.
- Abbildung 12: Th1/Th2-Profil von Gesamt-T-Zellen in Abhängigkeit von ManLAM.
- Abbildung 13: IFN- $\gamma$ -Sekretion naiver T-Zellen in Abhängigkeit von ManLAM.
- Abbildung 14: Inhibition der Bindung von *M. bovis* BCG an DC-SIGN<sup>pos</sup> DC.

- Abbildung 15: Rolle der Interaktion von DC-SIGN und ManLAM im Rahmen der Bindung von *M. bovis* BCG, *M. chelonae* und *M. smegmatis* an DC-SIGN<sup>pos</sup> und DC-SIGN<sup>neg</sup> DC.
- Abbildung 16: Mannose-Abhängigkeit der IL-10-Sekretion durch DC-SIGN<sup>pos</sup> DC nach Stimulation mit *M. bovis* BCG.
- Abbildung 17: Einfluss der Interaktion von DC-SIGN und ManLAM auf die TNF- $\alpha$ /IL-10-Balance im Rahmen mykobakterieller Stimulation von DC-SIGN<sup>pos</sup> DC mit *M. bovis* BCG, *M. chelonae*, *M. smegmatis*.
- Abbildung 18: Einfluss der Interaktion von DC-SIGN und ManLAM auf die TNF- $\alpha$ /IL-10-Balance im Rahmen mykobakterieller Stimulation von DC-SIGN<sup>pos</sup> und DC-SIGN<sup>neg</sup> DC mit *M. bovis* BCG.
- Abbildung 19: 2-Phasen-Modell zur Rolle des mannosylierten Lipoarabinomannans im Verlauf einer mykobakteriellen Infektion.

### 7.3. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1.: Tabellarische Auflistung verwendeter Ak
- Tabelle 2: Verwendete Primer mit ihren jeweiligen Anlagerungs- sowie Aufnahmetemperaturen, Fragmentgrößen und Sequenzen
- Tabelle 3: Verwendete ELISA-Kits

## 7.4. Veröffentlichungen

### Originalpublikationen:

Dreyer I., F. Porée, A. Schneider, J. Mittelstädt, A. Bertl, H. Sentenac, J.B. Thibaud and B. Mueller-Roeber. *Assembly of Shaker-like  $K_{out}$  channels requires two distinct sides of the channel alpha subunit. Biophys. J.* , 2004, 87: 858-872

Fricke I., D. Mitchell, J. Mittelstädt, N. Lehan, T. Goldmann, H. Heine, A. Böhle, S. Brandau. *Mycobacteria induce IFN- $\gamma$  production in human dendritic cells via triggering of toll-like receptor 2, J Immunol.* , 2006, 176: 5173-5182

Wittkowski M., J. Mittelstädt, S. Brandau, N. Reiling, B. Lindner, J. Torrelles, P. J. Brennan and O. Holst. *Putative capsular arabinomannans from Mycobacterium avium with morphotype specific structural differences but identical biological activity* (2006) (zur Publikation eingereicht, *J. Biol. Chem.*)

### Kongressbeiträge:

20th Meeting of the European Macrophage and Dendritic Cell Society. Freiburg, Deutschland. J. Mittelstädt and S. Brandau. *Mycobacterial-dendritic cell encounter: Differential effects of soluble and cell wall-associated mycobacterial mannosylated lipoarabinomannan (ManLAM)* (Oktober 2006)

28. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen. Borstel, Deutschland. J. Mittelstädt and S. Brandau. *Modulation of Cytokine Responses of Human Dendritic Cells by ManLAM – a Ligand for DC-SIGN (CD209)* (November 2005)

36th Meeting of the German Society of Immunology (DGFI). Kiel, Deutschland  
*Modulation of cytokine responses of human dendritic cells by ManLAM – a ligand for DC-SIGN (CD209)* (September 2005)

13th European Carbohydrate Symposium. Bratislava, Slowakei. M. Wittkowski, J. Mittelstädt, S. Brandau, N. Reiling, B. Lindner, J. Torettes, P. J. Brennan, and O. Holst. *Morphotype Specific Structural Differences in Capsular Arabinomannans from Mycobacterium avium with Reference to Biological Activity* (August 2005)

Spring School on Immunology. Ettal, Deutschland. *Synergistic Effect of ManLAM, a ligand for DC-SIGN (CD209), on Activation of Human Dendritic Cells* (März 2005)

Keystone Symposium, Vancouver, Kanada. I. Fricke, D. Mitchell, J. Mittelstädt, H. Heine, T. Goldmann, S. Brandau. *Mycobacteria induce interferon- $\gamma$  production in human dendritic cells via triggering of toll-like receptor 2.* (August 2005)

Joint Meeting of the German and Dutch Society of Immunology, Maastricht, Niederlande. I. Fricke, D. Mitchell, J. Mittelstädt, N. Lehan, H. Heine, T. Goldmann, S. Brandau. *Toll-like receptor 2 ligation by BCG mycobacteria induces interferon- $\gamma$  production in human dendritic cells.* (Oktober 2004)

## 7.5. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name	Mittelstädt
Vorname	Jessica
Geburtsdatum	03.10.1979
Geburtsort	Potsdam
Familienstand	ledig
Hauptwohnsitz	Parkallee 38d 23845 Borstel
Nebenwohnsitz	Mainstraße 4 14513 Teltow
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Bisheriger Werdegang:

seit 03/2004	Promotion am Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Abteilung Immunologie und Zellbiologie, Laborgruppe Immuntherapie
10/1999 - 01/2004	Studium der Biochemie an der Universität Potsdam, Abschluss Diplom-Biochemikerin (Diplom mit Auszeichnung)
08/1992 – 07/1999	Besuch des Immanuel-Kant-Gymnasiums, Teltow, Abschluss Abitur (Note „sehr gut“)
09/1986 – 07/1992	Besuch der Grundschule I Teltow, Teltow

**Preise und Stipendien:**

- Reisestipendium zum „20th Meeting of the European Macrophage and Dendritic Cell Society“, Freiburg, Deutschland (Oktober 2006) vom Verein zur Erforschung infektiologischer und allergischer Prozesse (VEIAP), Forschungszentrum Borstel
  
- Posterpreis im Rahmen der „Spring School on Immunology“, Ettal, Deutschland (März 2005)
  
- Reisestipendium zur „Spring School on Immunology“, Ettal, Deutschland (März 2005) vom Verein zur Erforschung infektiologischer und allergischer Prozesse (VEIAP), Forschungszentrum Borstel

## 7.6. Danksagung

In der LG Immuntherapie gilt mein Dank meinem Betreuer PD Dr. Sven Brandau zunächst für die Überlassung des Promotionsthemas und damit der Möglichkeit zur Anfertigung meiner Promotion in der AG Immuntherapie, Abteilung Immunologie und Zellbiologie, Forschungszentrum Borstel. Weiterhin danke ich ihm sowie Gabriele Steller und Kirsten Bruderek für die stets kritischen Diskussionen der experimentellen Daten. Kerstin Kopp und Stephanie Heller danke ich für die exzellente Durchführung zahlreicher Experimente bzw. geduldiges Korrigieren der Arbeit.

Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle die sehr hilf- und lehrreiche „außerdienstliche Betreuung“, die mir durch Gabi und Kirsten in den unterschiedlichsten Lebenslagen zuteil wurde und mich Vieles in einem anderem Licht betrachten lies.

Aus der LG Immunzellanalytik danke ich Herrn Dr. Martin Ernst für die Einführung am FACS-Calibur, in statistische Analysen sowie die stete Unterstützung im Rahmen meiner Arbeit. Frau Renate Bergmann danke ich für die Organisation der freiwilligen Blutspenden, diverse Zytokinbestimmungen mittels ELISA und Elutriationen sowie die immerwährende persönliche Unterstützung im Verlauf meiner Arbeit. Frau Erika Kaltenhäuser danke ich für zahlreiche Elutriationen.

Svenja Kröger und PD Dr. Norbert Reiling danke ich für die Möglichkeit, einzelne experimentelle Analysen in der LG Molekulare Infektiologie nach exzellenter Einarbeitung und mit vollster Unterstützung durchzuführen.

Frau Dr. Sabine Rüscher-Gerdes und Dr. Elvira Richter (Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien) danke ich für den Erhalt von *M. chelonae* und *M. smegmatis*.

In der LG Biophysik gilt mein Dank PD Dr. Andra Schromm und Christine Hamann für die Durchführung der FRET-Analysen sowie Herrn Klaus Brandenburg für den Erhalt von *compound 406* und *compound 506*.

Dem „Verein zur Erforschung infektiologischer und allergischer Prozesse“ (VEIAP, Forschungszentrum Borstel) danke ich für die mehrfache Unterstützung im Rahmen

unterschiedlicher Dienstreisen. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle das Engagement von Herrn PD Dr. Buko Lindner und Frau Dagmar Rühmann.

Für die großartige Unterstützung im Rahmen meiner Literaturrecherchen gilt mein Dank Herrn Dipl.-Biochem. Jörg A. Schenk.

Der „Mittwochabendrunde“ danke ich für Prosecco, Grillfleisch und Kommunikation nach anstrengenden Tagen. Im Besonderen denke ich hierbei an Mareike - herzlichen Dank, dass ich Euch alle kennen lernen durfte, und Du, Mareike, mit mir stets so wundervoll hochfrequente Gespräche geführt hast.

Nina, Dir danke ich für die moralische (Tee und Schokolade per Email) und praktische Unterstützung (Statistik) vom anderen Ende der Welt.

Manon, Regina - danke für das Wiederherstellen meines Realitätsbezuges durch die Diskussion der alltäglichen Dinge des Lebens bei leckerem Essen und passendem Getränk davor, dazu und danach, wenn wir bei Gesprächen über die Arbeit am Ende unseres Verständnisses angekommen waren.

Der größte Dank gilt meiner Familie und Göran ... ohne Euch wäre ich nicht hier angekommen.

### **7.7. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich, Jessica Mittelstädt, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine weiteren, als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Lübeck, Januar 2007

Jessica Mittelstädt