

Aus der Fachrichtung Infektionsmedizin  
Abteilung für Transplantations- und Infektionsimmunologie  
der Universität des Saarlandes, Homburg Saar

**Durchflusszytometrischer Nachweis Antigen-spezifischer T Zellen mittels  
intrazellulärer Zytokinfärbung zur Diagnostik der latenten Infektion mit  
Mycobacterium tuberculosis beim Immungesunden**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

2011

vorgelegt von

Tobias Hodapp

geboren am 29.06.1979 in Neuwied am Rhein

In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern Astrid Hoppert und Ulrich Hodapp sowie  
deren Lebenspartnern, die mich jederzeit bei allen Vorhaben mit Kräften unterstützt  
und gefördert haben

Teile dieser Arbeit wurden in „Nephrology, Dialysis and Transplantation“ veröffentlicht:

Sester U., Junker H., **Hodapp T.**, Schütz A., Thiele B., Meyerhans A., Köhler H., Sester M. (2006), *Improved efficiency in detecting cellular immunity towards M. tuberculosis in patients receiving immunosuppressive drug therapy.*  
Nephrol Dial Transplant 21:3258-3268

Darüber hinaus wurde am 10.10.2011 folgende Publikation beim „European Respiratory Journal“ eingereicht:

**Hodapp T.\***, Sester U.\*, Mack U., Singh M., Meier, T., Wiech, E., Fisch P., Ehl S., Sester M., *Massive monoclonal expansion of CD4 T-cells specific for a M. tuberculosis ESAT-6 peptide*

\*Erstautorenschaft zu gleichen Teilen

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

- |         |   |
|---------|---|
| 09/2007 | <b>T. Hodapp</b> , U. Mack, U. Sester, H. Köhler, G.W. Sybrecht, M. Sester<br><i>Massive expansion of ppd-reactive cd4 t cells directed against a single peptide epitope from the m. tuberculosis esat-6 protein.</i><br>17 <sup>th</sup> Annual Congress European Respiratory Society, Stockholm, Schweden |
| 09/2007 | U. Mack, <b>T. Hodapp</b> , U. Sester, H. Köhler, M. Sester, Sybrecht G.W.<br><i>Comparison of mendel-mantoux skin test and detection of specific cd4-t-cells with an ifn-assay in whole blood.</i><br>17 <sup>th</sup> Annual Congress European Respiratory Society, Stockholm, Schweden                   |
| 03/2007 | <b>T. Hodapp</b> , U. Mack, U. Sester, H. Köhler, G.W. Sybrecht, M. Sester  |

*Massive Expansion PPD reaktiver CD4 T Zellen mit Spezifität gegen ein einzelnes Epitop aus dem M. tuberculosis ESAT-6 Protein.*

48. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, Mannheim

02/2007

**T. Hodapp**, U. Mack, U. Sester, H. Köhler, G.W. Sybrecht, M. Sester

*Massive Expansion PPD reaktiver CD4 T Zellen mit Spezifität gegen ein einzelnes Epitop aus dem M. tuberculosis ESAT-6 Protein.*

51. Jahreskongress Saarländisch-Pfälzische InternistenGesellschaft (SPIG e.V.), Neustadt

02/2007

M. Fousse, U. Mack, **T. Hodapp**, U. Sester, G.W. Sybrecht, H. Köhler, M. Sester

*Optimierter Nachweis einer Immunität gegen M. tuberculosis durch Analyse der T Zellreaktivität gegen die spezifischen Proteine ESAT-6 und CFP-10.*

51. Jahreskongress Saarländisch-Pfälzische Internisten Gesellschaft, (SPIG e.V.), Neustadt

09/2006

**T. Hodapp**, U. Sester, H. Junker, H. Köhler, M. Sester

*Improved efficiency in detecting cellular immunity towards M. tuberculosis in patients receiving immunosuppressive drug therapy.*

16<sup>th</sup> European Congress of Immunology (ECI), Paris

03/2006

U. Mack, H. Junker, **T. Hodapp**, M. Sester, U. Sester, H. Köhler, G.W. Sybrecht

*Immunantwort gegen Tuberkulin bei immunsupprimierten Patienten - Vergleich eines neuen Vollblutverfahrens mit dem etablierten Hauttest nach Mendel-Mantoux.*

47. Kongress der deutschen Gesellschaft für Pneumologie, Nürnberg

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	4
Summary .....	6
2. Einleitung.....	8
2.1 Ziele dieser Arbeit .....	19
3. Material und Methoden.....	21
3.1 Verwendete Abkürzungen .....	21
3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	23
3.3 Substanzen .....	24
3.3.1 Zusammensetzung von Puffer und Medium.....	25
3.4 Stimulanzen, Ko-Stimulanzen und Antikörper .....	26
3.4.1 Stimulanzen.....	26
3.4.2 Antikörper.....	26
3.5 Probanden- und Patientenkollektiv.....	27
3.6 Tuberkulin-Hauttest nach Mendel-Mantoux.....	28
3.6.1 Anlage.....	28
3.6.2 Ablesen .....	29
3.7 Blutentnahme, Lagerung und Isolation von Blutzellen.....	29
3.7.1 Blutentnahme und Lagerung.....	29
3.7.2 Isolation von <i>PBMC</i> über einen Dichtegradienten.....	30
3.7.3 Bestimmung der Zellzahl.....	30
3.8 Quantifizierung Antigen-spezifischer T Zellen aus dem Vollblut.....	31
3.8.1 Stimulation im Vollblut.....	31
3.8.2 Fixierung .....	32
3.8.3 Herstellen der Färbelösung.....	32
3.8.4 Färbung der Vollblut-Ansätze.....	33
3.8.5 Durchflusszytometrie.....	33
3.8.6 <i>HLA</i> -Hemmtest.....	34
3.9 EliSpot <sup>®</sup> -Assay .....	34
3.9.1 Stimulation .....	35
3.9.2 Anfärben der Spots .....	35
3.9.3 Auswertung.....	36
3.10 Proliferationsnachweis mittels <i>CFDA-SE</i> .....	36

3.10.1	Labelingreaktion mit <i>CFDA-SE</i> .....	37
3.10.2	Stimulation <i>CFDA-SE</i> markierter Zellen .....	37
3.10.3	Färbung <i>CFDA-SE</i> markierter Zellen .....	37
3.11	Proliferationsnachweis mittels <sup>3</sup> H Thymidin.....	38
3.11.1	Stimulation der Zellen für den Thymidin-Proliferations-Assay .....	38
3.11.2	Messung der Proliferation .....	38
3.12	Software .....	39
4.	Ergebnisse .....	40
4.1	<i>M. tuberculosis</i> -spezifische T Lymphozyten lassen sich <i>ex vivo</i> aus dem Vollblut nachweisen .....	40
4.2	Die Produktion von IFN $\gamma$ und TNF $\alpha$ durch Antigen-spezifische Stimulation ist intraindividuell vergleichbar .....	42
4.3	Frequenzen Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischer CD4 T Zellen zeigen eine hochsignifikante Korrelation .....	45
4.4	Die Frequenzen spezifischer CD4 T Zellen korrelieren mit dem <i>TST</i> und zeigen eine höhere Sensitivität und Spezifität.....	47
4.5	Expression von CD27 auf <i>M. tuberculosis</i> -spezifischen T Zellen.....	50
4.5.1	Tuberkulin- und ESAT-6-spezifische CD4 T Zellen unterscheiden sich bezüglich ihrer CD27-Expression von <i>CMV</i> -spezifischen CD4 T Zellen .....	50
4.5.2	Der Anteil CD27-positiver Zellen unter Tuberkulin-spezifischen T Zellen zeigt eine sehr geringe Korrelation mit deren Frequenz.....	52
4.5.3	Die Induration im <i>TST</i> korreliert nicht mit der Expression von CD27 auf Tuberkulin-spezifischen T Zellen.....	53
4.6	Durchflusszytometrische Analyse und EliSpot <sup>®</sup> zeigen vergleichbare Ergebnisse .....	53
4.7	Vergleichbare Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von EliSpot <sup>®</sup> und Durchflusszytometrie nach unabhängiger Auswertung durch verschiedene Untersucher .....	56
4.8	Im Verlauf eines positiven <i>TST</i> ist die Frequenz der zirkulierenden reaktiven T Zellen vermindert .....	58
4.9	Fallbeschreibung.....	59
4.9.1	Massive Expansion Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischer CD4 T Zellen eines einzelnen Probanden.....	59

4.9.2	Massive Antigen-spezifische Reaktivität ist in weiteren immunologischen Assays reproduzierbar.....	62
4.9.3	Tuberkulin- und ESAT-6-spezifische Zellen besitzen den gleichen Phänotyp .....	65
4.9.4	Die Antigen-spezifische Reaktivität ist gegen ein einzelnes Peptid des ESAT-6-Proteins gerichtet.....	67
4.9.5	Das relevante Epitop wird im Kontext von <i>HLA-DR</i> präsentiert.....	69
4.9.6	Gleiche V-beta Untereinheiten des T Zell-Rezeptors auf allen Antigen-spezifischen Zellen können nicht nachgewiesen werden .....	71
4.10	Verwendung des durchflusszytometrischen Assays im Rahmen einer Umfelduntersuchung zu einem Indexfall mit kulturell gesicherter Infektion.....	72
5.	Diskussion .....	75
6.	Literaturverzeichnis .....	91
7.	Danksagung .....	104
8.	Lebenslauf.....	105

## 1. Zusammenfassung

Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis* werden in der Regel vom immunkompetenten Wirt erfolgreich kontrolliert, sodass sich eine latente Infektion ausbildet, die im weiteren Verlauf in circa 10% der Fälle zu einer manifesten Erkrankung voranschreitet. Die Diagnostik der latenten Tuberkulose ist von essentieller Bedeutung, da latent Infizierte ein Erregerreservoir darstellen und nur die sichere Identifikation und konsequente Therapie dieser Patienten eine Kontrolle der weltweiten Pandemie ermöglichen würde. Über 100 Jahre lang war der Tuberkulin-Hauttest die einzige Möglichkeit eine latente Infektion zu diagnostizieren. In den letzten Jahren sind mit den Interferon- $\gamma$ -release-Assays (IGRA) neue Vollblut-basierte Diagnostika in der klinischen Medizin evaluiert worden, die ähnlich wie der Tuberkulin-Hauttest auf dem Nachweis einer Immunantwort gegen *M. tuberculosis*-spezifische Antigene beruhen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein durchflusszytometrischer 6-Stunden-Vollblut-Assay in einem Kollektiv von 528 immungesunden Probanden charakterisiert. Dies erfolgte durch Analyse der Antigen-spezifischen CD4 T Zellen gegen das im Tuberkulin-Hauttest verwendete Tuberkulin sowie das *M. tuberculosis*-spezifische Antigen ESAT-6. Bei den reaktiven Zellen handelt es sich um kürzlich aktivierte Effektor-Memory-Zellen, welche die Th1 Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  exprimieren. Beim direkten Vergleich des Hauttests mit der Durchflusszytometrie bei 315 Probanden fand sich eine gute Korrelation zwischen der Induration und der Frequenz Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischer Zellen. Desweiteren korrelierte der durchflusszytometrische Test gut mit Ergebnissen eines kommerziellen IGRA, dem EliSpot<sup>®</sup>-Assay.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit ein Proband mit einer massiven Expansion Tuberkulin-reaktiver CD4 T Zellen mit Spezifität gegen ein einzelnes Epitop aus dem *Mycobacterium tuberculosis*-spezifischen ESAT-6-Protein identifiziert. So waren bis zu 38,98% aller CD4 T Zellen spezifisch gegen Tuberkulin und bis zu 41,57% gegen ESAT-6 gerichtet. Diese starke spezifische Reaktivität wurde in weiteren Assays bestätigt und blieb mit abnehmender Tendenz über zwei Jahre erhalten. Bei den reaktiven Zellen handelt es sich um kürzlich aktivierte CD4 T Zellen vom Effektor-Memory-Phänotyp, die spezifisch gegen ein einzelnes Epitop

des ESAT-6-Proteins sind und deren Monoklonalität mittels T Zellrezeptor-Spektratyping und RNA-Sequenzierung nachgewiesen wurde. Möglicherweise ist dies der erste Fall einer T-Zell-Proliferation unklarer Signifikanz mit bekannter Spezifität der T Zellen. Abschließend wurde der durchflusszytometrische Assay in einer Umfelduntersuchung von Kontakten zu einem mikrobiologisch nachgewiesenen Indexfall verwendet.

Der durchflusszytometrische Assay könnte zukünftig eine valide Alternative zum Tuberkulin-Hauttest in der Diagnostik der latenten Tuberkulose beim Immungesunden darstellen. Die Durchführung innerhalb eines Arbeitstages und die Möglichkeit, spezifische Zellen weitergehend phänotypisch zu charakterisieren, stellen besondere Vorteile dieser Methode dar.

## Summary

### **Flow cytometric analysis of antigen-specific T cells using intracellular cytokine staining for the diagnosis of a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* in immunocompetent individuals**

Infections with *Mycobacterium tuberculosis* are in general well controlled by the immune system of the immunocompetent host, resulting in a latent infection, which may proceed to manifest disease in approximately ten per cent of infected individuals during a lifetime. Diagnosis of latent tuberculosis disease is essential, since the correct identification and consequent treatment of these individuals is crucial to control further transmission. The Tuberculin skin test according to Mendel and Mantoux has been the only tool in diagnosing latent *Mycobacterium tuberculosis* infection for the past century. Within the past years modern blood-based Interferon- $\gamma$ -release-assays (IGRAs) have been established as alternative. Both Tuberculin skin test and IGRAs share the common principle to detect an immune response against antigens of *M. tuberculosis*.

In the present study a 6-hour flow-cytometric whole blood assay has been characterized in a population of 528 immunocompetent individuals. CD4 T cells specific against tuberculin, the same antigen used by the Tuberkulin skin test, and ESAT-6, a *M. tuberculosis*-specific antigen, have been analyzed. The reactive cells detected are recently activated effector-memory-cells expressing the Th1 cytokines IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ . A good correlation between induration of the Tuberculin skin test and frequencies of both tuberculin- and ESAT-6-specific T cells has been found in 315 individuals. Furthermore, there was a good correlation between the flow cytometric assay and a commercial IGRA, the EliSpot<sup>®</sup> assay.

In addition, the present study has identified an individual with a massive expansion of tuberculin-specific CD4 T cells directed against a single epitope of the *M. tuberculosis* ESAT-6 protein. Up to 39.98% of all CD4 T cells were specifically activated by tuberculin, and up to 41.57% were activated specifically by ESAT-6. This strong specific reactivity was confirmed using further immunological assays and was rather stable during two years. The specific cells are recently activated CD4 T cells of effector-memory-phenotype, directed against a single peptide epitope from the

ESAT-6 protein. Their monoclonal origin has been proven by T-cell receptor V $\beta$ -spectratyping and sequencing. Possibly, this may be the first case of a T cell proliferation of unclear significance with known antigenic specificity. Finally, the flow cytometric assays has been used in the setting of contact tracing of an index case with active tuberculosis.

The flow cytometric assays evaluated in the present study may in future represent a valid alternative to the Tuberculin skin test in detecting latent tuberculosis infection in immunocompetent individuals. The fact, that the assay can be performed within one working day and the possibility of further phenotypic characterisation of specific cells represent particular advantages of this approach.

## 2. Einleitung

Die *Tuberkulose (TBC)* zählt zu den häufigsten bakteriellen Infektionskrankheiten weltweit. Nach Schätzungen der *Weltgesundheitsorganisation (WHO)* sind zwei Milliarden Menschen, circa ein Drittel der Weltbevölkerung, mit *Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis)* infiziert und stellen damit ein enormes Erregerreservoir dar. Im Jahr 2009 traten circa 9,4 Millionen Fälle der manifesten Erkrankung auf, dies entspricht einer Inzidenz von 137 pro 100.000 Einwohner weltweit. Sie ist für geschätzte 1,3 Millionen Todesfälle bei HIV-negativen und 380.000 Todesfälle unter HIV-positiven Patienten pro Jahr verantwortlich. Mitteleuropa zählt zu den Gebieten niedriger Inzidenz im Vergleich zu Asien und Afrika. Die Migration vor allem aus Staaten Osteuropas trägt jedoch zu einem weiteren Auftreten der *TBC* in unseren Breiten bei. Ein zusätzliches Problem stellt die Zunahme medikamentenresistenter (*multidrug-resistant, MDR*) *TBC* dar. Die *WHO* schätzt, dass in 2008 440.000 Fälle von Stämmen verursacht wurden, die Resistenzen gegen die Medikamente der ersten Wahl Isoniazid und Rifampicin zeigen. Die *MDR-TBC* ist sehr ungleichmäßig verteilt, 86% der Fälle traten in nur 27 Nationen auf, 15 davon liegen innerhalb der Europäischen Union. Die Staaten der ehemaligen UdSSR sind nach China und Indien die Region mit dem häufigsten Auftreten resistenter Stämme (WHO, 2010). Aufsehen erregte das Auftreten von Fällen extrem resistenter *TBC (extensively drug-resistant, XDR)* in einer afrikanischen Studie mit einer Prävalenz von 39% für *MDR-TBC* und 6% für *XDR-TBC* unter allen Patienten mit kulturell nachgewiesener *TBC*. 52 der 53 Patienten mit nachgewiesener *XDR-TBC* starben, ihr medianes Überleben lag bei 16 Tagen nach Diagnosestellung (GANDHI et al., 2006). *XDR-TBC* ist definiert als Erreger mit Resistenzen neben der *MDR*-Resistenz gegenüber allen Fluorchinolonen und mindestens einem der Injektions-Tuberkulostatika Kapreomycin, Kanamycin oder Amikacin. Bis Juli 2010 haben laut der *WHO* 58 Nationen über das Auftreten von mindestens einem Fall von *XDR-TBC* berichtet (WHO, 2010).

Die Entdeckung des *M. tuberculosis* durch Robert Koch widerlegte den damaligen Glauben, die als Schwindsucht bekannte Erkrankung sei hereditären Ursprungs oder auf die ungesunden Lebensgewohnheiten der Arbeiterklassen der frühen Industrialisierung zurückzuführen. Am 24. März 1882 präsentierte er in seinem Vortrag „Aetiologie der Tuberkulose“ in Berlin nicht nur seine Entdeckung des *TBC*-

Erregers, sondern auch die berühmten Henle-Koch-Postulate, die eine Kausalität pathogener Keime für Infektionserkrankungen beschreiben (DANIEL, 2006). Inzwischen ist bekannt, dass die für den Menschen pathogenen *TBC*-Erreger die Bakterien *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* und *M. microti* sind. Diese werden zum *M. tuberculosis* Komplex zusammengefasst. Die *M. bovis* Impfstämme *Bacille Calmette-Guérin* (*BCG*) sind weitgehend apathogen und nicht übertragbar. Mikrobiologisch handelt es sich um 0,4µm breite und 3-4µm lange, nicht sporenbildende, unbewegliche Stäbchen, die zur Familie der Mycobacteriaceae und dem Genus Mycobacterium gehören (KAYSER FH, 2010). Die offene *TBC*, definiert als Nachweis des Erregers im Sputum und Darstellung von Kavernen in der Röntgenaufnahme des Thorax, führt zur Ausscheidung des Erregers. Im Sinne einer Tröpfcheninfektion werden mycobacterienhaltige Partikel abgehustet und von Kontaktpersonen per inhalationem aufgenommen. Das Risiko der Übertragung ist eng mit der Expositionsdauer und Expositionshäufigkeit in geschlossenen Räumen verknüpft (HOUK et al., 1968; LOUDON, SPOHN, 1969). Die offene *TBC* ist ein bedeutender Risikofaktor für die Übertragung im Falle eines Kontaktes. Bei nahen Kontakten zu Indexfällen mit offener *TBC* trat eine Übertragung in 62% der Kontakte auf, wenn der Indexfall sowohl eine positive Sputumkultur als auch Kavernen im Röntgenbild zeigte. Im Gegensatz dazu trat eine Übertragung in 33% der Kontakte auf, wenn nur eine positive Sputumkultur und in 44% der Kontakte, wenn nur Kavernen im Röntgenbild vorlagen. Die Nähe des Kontaktes ist ebenfalls bedeutend für das Übertragungsrisiko; innerhalb einer Wohn- oder Lebensgemeinschaft ist das Risiko, infiziert zu werden, besonders hoch (MARKS et al., 2000; REICHLER et al., 2002). Die kritische Größe eines inhalierten Aerosols zur Erreichung der Alveole liegt bei circa 5µm. Größere Partikel werden von den Zilien der Atemwege abgefangen und durch mukoziliäre Clearance entfernt. Nach erfolgreicher Übertragung hängen das weitere Schicksal des Erregers und der Verlauf der Erkrankung von der Immunreaktion des Wirts ab.

Im Folgenden sollen zunächst einige immunologische Grundlagen der Erregerspezifischen Immunität eingeführt werden, bevor Besonderheiten in der Immunologie der *TBC* betrachtet werden.

Bei der Bekämpfung von Krankheitserregern bedient sich der Organismus spezifischer und unspezifischer Abwehrmechanismen. Letztere stehen von Geburt an zur Verfügung und bedingen keinen vorherigen Erregerkontakt. Phagozytisch

aktive Zellen stellen eine erste und effektive Verteidigungslinie gegen Infektionen dar. Viele Mikroorganismen, die in den menschlichen Körper gelangen, werden von ihnen aufgenommen und zerstört, ohne dass die Ausbildung einer spezifischen Immunität notwendig ist (JANEWAY, TRAVERS, 2005). Verschiedene Erreger besitzen Fähigkeiten ihrer Vernichtung durch das unspezifische Immunsystem zu entkommen. Erkennung und Bekämpfung dieser ist Aufgabe des spezifischen, adaptiven Immunsystems. Die Aktivierung einer Erreger-spezifischen Immunantwort verläuft in drei Phasen, der afferenten-, der Induktions- und der Effektorphase. Die afferente Phase der Immunantwort dient der Erkennung und adäquaten Präsentation von Antigenen an die Effektoren des Immunsystems. *Dendritische Zellen (DC)* sind gewebständige, phagozytische Zellen und stellen die effektivsten Initiatoren einer adaptiven Immunantwort dar. Sie zeigen ausgeprägte Aktivität und Bewegung zwischen Lungengewebe und drainierenden Lymphknoten, in Abhängigkeit von inflammatorischem Geschehen in der Lunge (COOK, BOTTOMLY, 2007). Bisher wurde angenommen, dass nur *DC* die Alveole verlassen können, um Antigene zum Lymphknoten zu transportieren. In einem Tiermodell konnte gezeigt werden, dass auch *Alveolarmakrophagen (AM)* diese Fähigkeit besitzen, nachdem sie bakterielles Antigen aufgenommen haben und damit wahrscheinlich ebenfalls zur Induktion der adaptiven Immunantwort beitragen (KIRBY et al., 2009). Beide Zelltypen scheinen damit bei der Induktion einer Immunantwort gegen pathogene Erreger aus dem Respirationstrakt beteiligt zu sein und fungieren als *Antigen-präsentierende Zellen (antigen-presenting cell, apc)*. Am Prozess der Erkennung und Endozytose des Erregers in die *apc* sind verschiedene Komponenten des unspezifischen humoralen Immunsystems, wie Komplement und Antikörper essentiell beteiligt, die einen Erreger als fremd markieren und damit die Aufnahme in *apc* begünstigen. Der endozytierte Erreger befindet sich in Phagosomen, einer erregerhaltige Vakuole im Inneren der *apc*. Diese Phagosomen fusionieren mit Lysosomen, wodurch die Bakterien einer Reihe toxischer Substanzen wie sauren Hydrolasen, Lysozym, Superoxid-Anionen und Hydroxyradikalen ausgesetzt werden. Sie werden abgetötet und ihre antigenen Bestandteile angedaut. Durch Antigenprozessierung werden Peptide aus Sequenzen von zwölf oder mehr Aminosäuren hergestellt (JANEWAY, TRAVERS, 2005).

*Haupthistokompatibilitätsantigene (major histocompatibility complex, MHC)* sind im endoplasmatischen Retikulum der Zelle synthetisierte, transmembranäre Proteine,

deren Funktion in der Präsentation von Peptiden auf der Zelloberfläche liegt. *MHC-I*-Moleküle werden von allen Körperzellen exprimiert und dienen der Präsentation von endogenen Peptidsequenzen. *MHC-II*-Moleküle werden von immunkompetenten B Zellen, Makrophagen und *DC* exprimiert. Sie werden nach Synthese über den Golgi-Apparat mit Phagosomen verbunden, um exogene Peptidsequenzen aufzunehmen. Der Komplex aus *MHC*-Molekül und antigenem Peptid des Erregers wird an die Zelloberfläche geschleust (KLEIN, SATO, 2000a, b). Die Zelle wandert nach Aufnahme des Antigens mit dem Lymphstrom in regionale Lymphknoten, um sich dort im parakortikalen Bereich anzusiedeln. Auf diesem Weg reift sie zur differenzierten *apc* und exprimiert eine hohe Dichte von Antigen-*MHC-II*-Komplexen auf ihrer Oberfläche. Nun folgt die Induktionsphase der adaptiven Immunantwort. Für ein bestimmtes Antigen sind nur einige wenige T Lymphozyten spezifisch. Sie zirkulieren im Blutstrom, um die Wahrscheinlichkeit eines Kontaktes mit „ihrem“ Antigen zu erhöhen. In einem Zyklus verbleiben sie nur circa 30 Minuten im Blutstrom, um dann wieder in Lymphknoten einzuwandern. T Zellen werden anhand phänotypischer Eigenschaften in CD8-positive, zytotoxische und CD4-positive T Helferzellen unterschieden. CD8 T Zellen erkennen im Kontext von *MHC-I* präsentierte, intrazelluläre Peptide auf allen Körperzellen und können diese zum Beispiel im Rahmen eines viralen Infektes lysieren. CD4 T Zellen erkennen Antigen-*MHC-II*-Komplexe präsentiert von *apc*. Die nachfolgende Aktivierung der CD4 T Zelle ist ein komplexer Prozess, in den zahlreiche Oberflächenmoleküle involviert sind. Nach Erkennung des Antigen-*MHC-II*-Komplexes mittels des *T Zellrezeptors (TCR)* erfolgt dessen Quervernetzung mit CD3. CD3 ist ein transmembranäres Protein, an dessen intrazellulärem Ende immunoreceptor tyrosine-based activation motifs phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung aktiviert ein Downstream-Signal über ZAP-70 zum Zellkern und mündet in einer vermehrten Gentranskription unter anderem von Zytokinen. Die initiale Bindung eines *MHC-II*-Antigen-Komplexes an den *TCR-CD3-CD4*-Komplex dient der Antigenerkennung. Für die vollständige Aktivierung der T Zellen sind kostimulatorische Signale notwendig. Sie werden in sehr hoher Dichte in Form von CD80 und CD86 auf aktivierten *apc* exprimiert und binden an CD28 auf der T Zelle. Damit ist die Induktionsphase der Immunantwort abgeschlossen und die aktivierte T Zelle kann klonal expandieren und in Effektor- und/oder Memory-Zellen differenzieren, die Effektorphase beginnt. T Helferzellen differenzieren in zwei verschiedene Effektor-Zellsubtypen. Th2 Zellen exprimieren die

Zytokine Interleukin (IL)-4, IL-5 und IL-10 und fördern die durch B Zellen vermittelte humorale Immunantwort. Th1 Zellen wandern an den Ort der Infektion und sezernieren die Zytokine *Interferon gamma (IFN $\gamma$ )*, *Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ )* und IL-2. Damit können sie zum einen Makrophagen in deren Effektivität intrazelluläre Erreger abzutöten steigern und zum anderen weitere immunkompetente Zellen anlocken (KLEIN, SATO, 2000a, b; VON ANDRIAN, MACKAY, 2000; DELVES, ROITT, 2000a, 2000b; JANEWAY, TRAVERS, 2005).

Im Falle des *M. tuberculosis* hat die Reaktion des Immunsystems fundamentalen Einfluss auf den Verlauf der Infektion. In 80-90% der Fälle gelingt es die Infektion erfolgreich zu kontrollieren und einen Ausbruch der Erkrankung zu verhindern. In Alveolen gelangte Mycobakterien werden von gewebständigen, phagozytischen Zellen aufgenommen. Entgegen früherer Annahmen spielen neben den AM auch DC eine fundamentale Rolle in der Induktion einer Immunantwort. Im Mausmodell konnte die Rolle von DC bei der Induktion einer CD4- und CD8 T Zell vermittelten Immunantwort gegen das *M. tuberculosis*-spezifische Antigen ESAT-6 gezeigt werden (TIAN et al., 2005). Im Gegensatz zur Aufnahme von Mycobakterien in Makrophagen, welche über Komplementrezeptor 3 und Mannoserezeptoren erfolgt, ist die Aufnahme in DC über ein C-Typ Lektin, das „*DC-specific intercellular adhesion molecular-3 grabbing non integrin*“ (DC-SIGN) vermittelt, welches an das für Mycobakterien spezifische Lipoglycan *Lipoarabinomannan (LAM)* bindet (TAILLEUX et al., 2003). Makrophagen stellen jedoch die wichtigste Wirtszelle für *M. tuberculosis* dar. Mycobakterien verfügen über verschiedene Mechanismen, um Makrophagen in ihrer Effizienz Erreger abzutöten, beeinträchtigen und können dadurch intrazellulär persistieren. Die Reifung des Mycobakterien-haltigen Phagosoms wird durch verschiedene Zellwandbestandteile wie LAM oder Sulfolipide in einem frühen Stadium unterbrochen und damit deren Fusion mit Lysosomen verhindert. In Mycobakterien-haltigen Vakuolen fehlen transmembranäre Protonen-ATPasen, die energieabhängig Protonen in Phagosomen transportieren, daraus resultiert ein höherer pH-Wert in den Phagosomen (STURGILL-KOSZYCKI et al., 1994; ROHDE et al., 2007). Aktivierung der Makrophagen durch IFN $\gamma$  führt zu einer Reifung und Fusion der Phagosomen mit Lysosomen und damit zu einer Exposition der Mycobakterien gegenüber einem verminderten pH-Wert und toxischen Sauerstoff- (reactive oxygen intermediates, ROI) und Stickstoffmetaboliten (reactive nitrogen intermediates, RNI). NADH-abhängige Peroxydasen, Peroxynitritreduktasen oder

Superoxyddismutasen sind nur einige Beispiele für Mechanismen, mit deren Hilfe Mycobacterien diesem so genannten respiratorischen burst toxischer Substanzen im Phagolysosom widerstehen können. Verschiedene Zellwandbestandteile, wie LAM oder OmpATp, sind bei der Resistenz gegenüber niedrigem pH-Wert beteiligt, wahrscheinlich über eine Verminderung der Zellwandpermeabilität (CHAN, FLYNN, 2004; EHRT, SCHNAPPINGER, 2009).

Mycobacterien, ihre antigenen Bestandteile aus Zelldebris oder abgestorbenen Makrophagen werden von DC aufgenommen und in regionale Lymphknoten transportiert. Eine Antigenpräsentation und Induktion einer spezifischen Immunantwort in zuvor beschriebener Weise ist die Folge. Vor allem CD4 T Zellen vom Th1 Subtyp dominieren die zelluläre Immunantwort gegen *M. tuberculosis*. Sie sezernieren die Zytokine IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-2, welche Makrophagen in der Effizienz intrazelluläre Pathogene abzutöten unterstützen. CD8 T Zellen exprimieren unter anderem Granulysin und Perforine und zerstören infizierte Zellen über eine Bindung an Komplexe aus MHC-I-Molekülen und Antigenen. Weitere immunkompetente Zellen werden durch die Zytokine IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-2 angelockt und formieren einen Wall um die Mycobacterien-haltigen Makrophagen. Ein Granulom entsteht, bestehend aus einem nekrotischen Zentrum mit Zelldebris umgeben von infizierten AM, die zu epitheloiden Zellen und Langerhans-Riesenzellen differenzieren. Der äußere Wall enthält vor allem leukozytären Zellen, hauptsächlich CD4 und CD8 T Zellen und B Zellen. Die Organisation der Zellen kann lymphofollikuläre Ausmaße annehmen, in denen zahlreichen Interaktionen zwischen den verschiedenen immunkompetenten Zellen stattfinden. Histologisch können sie an sekundäre lymphatische Organe erinnern. Eine Vergrößerung der granulomatösen Läsion im Lungenparenchym sowie der hilären Lymphknoten im Thoraxröntgenbild wird als Ghon-Komplex (Primärkomplex) bezeichnet. Dem Immunsystem gelingt auf diese Weise zwar die Eindämmung des Erregers, aber das Granulom ist wahrscheinlich gleichzeitig der Ort der Persistenz von Mycobacterien. Ein Gleichgewicht entsteht, bedingt aber komplexe Interaktionen zwischen Wirt und Erreger (CHAN, FLYNN, 2004; ULRICHS, KAUFMANN, 2006; SAUNDERS, BRITTON, 2007; DHEDA et al., 2010). Aktuell werden modulatorische Einflüsse auf die sich bildende Immunantwort untersucht. Regulatorische T Zellen (Treg), ein Foxp3 und CD25 exprimierender Subtyp der CD4 T Zellen, produzieren die inhibitorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ . Im Mausmodell konnte eine hierdurch bedingte Suppression der CD4 T Zell-

Reaktivität gezeigt werden (KURSAR et al., 2007). Th17 Zellen, ein CD4 T Zell Subtyp, sezernieren IL-17 und haben damit ebenfalls regulierenden Einfluss auf die sich bildende Immunreaktion (KHADER, COOPER, 2008). Diese Mechanismen sind noch weitgehend unklar, sie könnten einer überschießenden Reaktion mit extensiver Gewebedestruktion entgegenwirken, die im Rahmen der latenten Infektion angesichts der chronischen Antigenstimulation entstehen kann.

Die latente Infektion ist ein Zustand der völligen Symptombefreiheit nach erfolgreicher Infektion. Das Bakterium persistiert jedoch nach Infektion im Wirtsorganismus und kann nach unbestimmter Zeit eine manifeste Erkrankung verursachen (AREND, VAN DISSEL, 2002; LILLEBAEK et al., 2002; LILLEBAEK et al., 2003). Das Lebenszeitrisiko eines mit *M. tuberculosis* latent Infizierten an einer aktiven *TBC* zu erkranken wird auf circa 5-10% geschätzt, und ist den ersten beiden Jahren nach Neuinfektion am höchsten. In diesem Zeitraum manifestieren sich 50% aller Erkrankungen (HORSBURGH, 2004; HARRIES, DYE, 2006). Alter unter fünf Jahren, Mangelernährung sowie intravenöser Drogenabusus sind bedeutende Risikofaktoren. Aber auch Patienten mit Immundefekten jeglicher Genese sind wesentlich anfälliger. Ein gehäuftes Auftreten aktiver *TBC* konnte für HIV-Patienten (HAVLIR, BARNES, 1999), immunsupprimierte Organtransplantatempfänger (KLOTE et al., 2004) sowie Patienten, die Antikörper gegen TNF $\alpha$  zur Behandlung rheumatoider Erkrankungen erhalten (KEANE et al., 2001; KEANE, 2004; WOLFE et al., 2004; SOLOVIC et al., 2010) gezeigt werden.

Im Falle der aktiven *TBC* ergibt sich die Diagnose aus der Zusammenschau anamnestischer, klinischer, radiologischer und labormedizinischer Daten in Zusammenhang mit einem direkten Erregernachweis. Mycobakterien können bei der offenen Lungentuberkulose aus Sputum, Bronchialaspirat oder Magennüchternsekret mikroskopisch als säurefeste Stäbchen nachgewiesen werden. Für die selteneren extrapulmonalen Manifestationen werden Biopsien (Lymphknotenbiopsien) oder Punktate (Pleura, Liquor, Urin) zum Erregernachweis verwendet. Die Färbung nach Ziehl-Neelsen ist die gängigste Methode zum lichtmikroskopischen Nachweis säurefester Stäbchen, eine Fluoreszenzmikroskopie nach Auraminfärbung wird ebenfalls verwendet. Der Goldstandard ist jedoch die Isolierung durch verschiedene Kulturverfahren mit anschließender molekularbiologischer Identifizierung oder der Nachweis durch Nukleinsäureamplifikationstechniken. Mittels neuerer Flüssigkultursysteme können schon innerhalb von 1-2 Wochen Ergebnisse vorliegen.

Die Kenntnis von Genmutationen, welche Antibiotikaresistenzen vermitteln, ermöglicht inzwischen in einigen Fällen sogar schon die Resistenztestung durch molekularbiologische Methoden (BRODIE, SCHLUGER, 2005; RUSCH-GERDES, HILLEMANN, 2008).

Für die latente Infektion mit *M. tuberculosis* ist derzeit kein direkter Nachweis teilungsfähiger Erreger möglich. Als persistierender Erreger führt *M. tuberculosis* in der latenten *TBC* zur Aufrechterhaltung einer spezifischen Immunantwort (MACK et al., 2009). Diese kann als Surrogat für eine Infektion abgebildet werden. Robert Koch isolierte 1890 die Substanz Tuberkulin aus Mycobakterien und verwendete sie zunächst versuchsweise zur Therapie und später zur Diagnostik der *TBC*. In den 1930er Jahren stellte Florence Seibert *purified protein derivative (PPD)* in seiner noch heute nahezu unverändert verwendeten Form her. Damit war der Tuberkulin-Hauttest (*tuberculin skin test, TST*) nach Mendel-Mantoux geboren und wird seitdem in der Diagnostik der latenten *TBC* eingesetzt (DANIEL, 2006). Tuberkulin ist eine hochgereinigte Mischung aus antigenen Proteinen des *M. tuberculosis*, die intrakutan in die Volarseite des Unterarmes der Testperson inokuliert wird. Durch lokale Inflammation und Zytokinproduktion im Sinne einer verzögerten Immunreaktion entsteht nach 48 bis 72 Stunden eine granulomatöse Induration, deren Durchmesser semiquantitativ Auskunft über die bestehende Immunität gibt (HUEBNER et al., 1993). Trotz Standardisierung birgt der *TST* gravierende Nachteile sowohl bezüglich der Validität seiner Ergebnisse, als auch der Durchführbarkeit in der klinischen Routine. Bis Ende der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde die Lebendimpfung gegen *TBC* mit attenuierten Bacille Calmette-Guérin- (*BCG*) Stämmen durchgeführt. *BCG* zeigt eine ausgeprägte antigene Kreuzreaktivität mit *M. tuberculosis*, sodass mittels *TST* eine sichere Unterscheidung zwischen Impfung und tatsächlicher Infektion unmöglich ist. In Ländern niedriger Prävalenz der *TBC* ist eine Induration bis 18 Millimetern im *TST* bei Probanden jünger als 40 Jahre wahrscheinlicher auf eine Impfung mit *BCG* als auf eine tatsächliche Infektion zurückzuführen. Dies führt zu einer erheblichen Einschränkung der Spezifität des *TST* (WANG et al., 2002; TISSOT et al., 2005). In den letzten beiden Jahrzehnten sind neuere in-vitro-Tests, die *Interferon  $\gamma$  release Assays (IGRA)*, entwickelt worden, die zum Teil noch im Stadium der klinischen Evaluation sind. Vor allem für Patienten mit Defiziten des Immunsystems jedweder Genese liegt eine verminderte Sensitivität des *TST* nahe. In aktuelleren Studien konnten Hinweise darauf für Patienten mit

rheumatoider Arthritis (DINSER et al., 2008; PONCE DE LEON et al., 2008), chronischer Niereninsuffizienz (SESTER et al., 2004; PASSALENT et al., 2007; WINTHROP et al., 2008), immunsupprimierte Patienten nach Nierentransplantation (SESTER et al.; 2006) sowie HIV-Patienten (COBELENS et al., 2006; STEPHAN et al., 2008) bestätigt werden. Bezüglich des Grenzwertes für einen positiven *TST* besteht zwischen den verschiedenen nationalen Guidelines Uneinigkeit ebenso wie bezüglich der Interpretation seiner Ergebnisse in Zusammenhang mit vorangegangenen *BCG*-Impfungen oder erhöhtem Infektionsrisiko (BOTHAMLEY et al., 2008).

In den letzten Jahren wurden, wie zuvor erwähnt, verschiedene *ex vivo* Tests zur Diagnostik der latenten Infektion mit *M. tuberculosis* entwickelt. *IGRA* untersuchen die Zytokinproduktion *peripherer mononukleärer Zellen (PBMC)* nach Stimulation mit spezifischen Antigenen *in vitro*. In einem Testwell werden die Zellen mit Antigenen inkubiert und sezernieren daraufhin Zytokine. In einem zweiten Schritt können diese Zytokine mittels Markerantikörper durch *ELISA* (enzyme linked immunosorbent assay) oder *ELISPOT* (enzyme linked immunosorbent spot) dargestellt werden. Die Verwendung der *M. tuberculosis*-spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 schließt Kreuzreaktionen mit den *BCG*-Impfstämmen aus. ESAT-6 und CFP-10 werden in der *region of difference (RD) 1* kodiert, welche in den Genomen von *M. bovis BCG* und den meisten apathogenen Mycobacterien deletiert sind (MAHAIRAS et al., 1996; GEY VAN PITTIUS et al., 2006). Mehrfach konnte gezeigt werden, dass die Spezifität der Antigene ESAT-6 und CFP-10 dem Tuberkulin in der Diagnostik der latenten Tuberkulose überlegen sind (LALVANI et al., 2001b; DOHERTY et al., 2002; CODECASA et al., 2006).

Der QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold in-tube (Cellestis International Pty Ltd., Chadstone, Australien), der T-Spot<sup>®</sup>.TB (Oxford Immunotec Ltd., Abingdon, Großbritannien) sowie der EliSpot<sup>®</sup> (AID GmbH, Strassberg, Deutschland) sind verschiedene, derzeit kommerziell erhältliche *IGRAs*. Erstere beiden scheinen dem *TST* in der Diagnostik einer latenten Infektion überlegen zu sein (PAI et al., 2004; FERRARA et al., 2006; AREND et al., 2007; LALVANI, 2007; MENZIES et al., 2007; PAI et al., 2008). Die amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention haben bereits 2005 Leitlinien zur Verwendung des QuantiFERON<sup>®</sup>-TB veröffentlicht (MAZUREK et al., 2005) und in einer aktuellen Fassung die Verwendung von T-Spot<sup>®</sup>.TB mit aufgenommen (MAZUREK et al., 2010).

Eine weitere Methode zum ex vivo Nachweis einer T zellulären Immunantwort stellt die durchflusszytometrische Analyse Antigen-spezifischer T Zellen dar. In einem Vollblut-Assay werden T Zellen eines Probanden mit Erreger-spezifischen Antigenen stimuliert und anschließend ihre Zytokinproduktion mittels Sekretionsblockade und intrazellulärer Färbung gemessen. Eine vorherige Isolation der Zellen oder ihre Vermehrung durch Kultur in vitro ist nicht notwendig. Mit Hilfe dieser Methode zum Nachweis Antigen-spezifischer CD4 und CD8 T Zellen gelang es, zellvermittelte Immunantworten für verschiedene persistierende Erreger sowohl immunologisch zu charakterisieren als auch im klinischen Setting zu monitieren. HIV-spezifische CD4 und CD8 T Zellen konnten nachgewiesen, und ihre zahlenmäßige Verringerung unter antiretroviraler Therapie gezeigt werden (SESTER et al., 2000; SESTER et al., 2007). CD4 vermittelte zelluläre Immunantwort gegen *Cytomegalievirus (CMV)* kann mittels der Durchflusszytometrie dargestellt werden und ist in Kombination mit einer Messung der Viruslast ein potentes Diagnostikum *CMV*-induzierter Komplikationen nach Organ- und Knochenmarkstransplantationen (SESTER et al., 2001; SESTER et al., 2003; SESTER et al., 2005; WIDMANN et al., 2008). Die zelluläre Immunantwort gegen Adenovirus wurde mittels dieses Assays charakterisiert und deren altersabhängige Abnahme gezeigt, die wahrscheinlich auf eine Eradikation des Erregers in höherem Alter zurückzuführen ist (SESTER et al., 2002a). Für den Nachweis einer Infektion mit humanem Herpesvirus 8 konnte ebenfalls eine Überlegenheit des durchflusszytometrischen Assays im Vergleich zu konventionellen serologischen Nachweismethoden gezeigt werden (LÖNARD et al., 2007). Alle diese Studien zeigten eine höhere oder vergleichbare Sensitivität der durchflusszytometrischen Analyse Antigen-spezifischer T Zellen gegenüber herkömmlichen Verfahren zum Nachweis einer Infektion mit persistierenden Erregern. Methodisch scheint die Durchflusszytometrie einige Vorteile gegenüber den oben erwähnten kommerziellen *IGRA* zu bieten. *IGRA* weisen zum einen ausschließlich Antigen-spezifische Zytokinproduktion gegen die *M. tuberculosis*-spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 nach. Dadurch ist ein direkter Vergleich mit dem *TST*, bei dem Tuberkulin als Stimulanz verwendet wird, unmöglich. Im durchflusszytometrischen Assay hingegen können, wie anhand von zahlreichen oben genannten Studien belegt, variable Antigene eingesetzt werden. Damit ist der direkte Vergleich der intrakutanen Reaktivität gegen Tuberkulin mit der Reaktivität in vitro unter Verwendung exakt gleicher Antigene möglich. Reaktive Zellen bei den ELISA-

oder ELISPOT-basierten *IGRA* werden nach Stimulation ausgewaschen und die sezernierten Zytokine als „footprint“ der Zelle im Testwell mit Hilfe von Sekundärantikörpern dargestellt. Eine Zuordnung der Zytokine zu der entsprechenden Zelle ist unmöglich, während in durchflusszytometrischen Assays das Zytokin in der entsprechenden Zelle fixiert wird und diese zur Analyse immunologischer Merkmale zur Verfügung steht. So können verschiedene Oberflächenmarker und Effektoren, wie Zytokine, betrachtet werden, um Auskunft über Reifestadium oder Funktionalität der betreffenden Zellen zu erhalten (BREINIG et al., 2006).

Latent mit *M. tuberculosis* infizierte Personen sind zum einen dem Risiko einer Manifestation der Erkrankung ausgesetzt und zum anderen stellen sie einen bedeutenden Pool potentieller Krankheitsüberträger da. Die Entstehung einer aktiven *TBC* kann jedoch nach frühzeitiger Identifikation latent infizierter Personen durch medikamentöse Therapie verhindert werden (BASS et al., 1994; RAVIGLIONE et al., 1997; ROSE, 2000). Daher sind Methoden zur sicheren Identifikation einer latenten Infektion essentiell zur Kontrolle dieser weltweit verbreiteten Infektionserkrankung (KEELER et al., 2006). Der durchflusszytometrische Nachweis Antigen-spezifischer T Zellen gegen *M. tuberculosis* stellt einen viel versprechenden Ansatz zum Nachweis einer latenten Infektion im klinischen Setting dar. Darüber hinaus ist eine immunologische Charakterisierung der beteiligten Zellen möglich. Dies ist von essentieller Notwendigkeit, um die Daten eines neuen Assays verstehen und interpretieren zu können. Seine Etablierung könnte die Diagnostik der latenten Infektion mit *M. tuberculosis* nicht nur vereinfachen, sondern gleichzeitig zur weiteren Aufklärung über die Mechanismen T-zellulärer Immunität gegen *TBC* beitragen.

## 2.1 Ziele dieser Arbeit

Die durchflusszytometrische Analyse zum Nachweis Antigen-spezifischer T Zellen gegen *CMV*, *HIV* und Adenovirus wurde bereits etabliert. Einzelne Arbeiten liegen zum durchflusszytometrischen Nachweis Antigen-spezifischer Zellen gegen *TBC* vor. Ziel der dieser Arbeit ist es, dieses Verfahren an einem großen Kollektiv immungesunder Probanden zu evaluieren. Die beiden Read-out Parameter einer T zellulären Aktivierung IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  sollen verglichen werden. Inzwischen liegen zahlreiche Untersuchungen bezüglich der *IGRA* vor, die eine erhöhte Sensitivität und Spezifität in vitro gemessener T zellulärer Immunreaktion im Vergleich zum *TST* zeigen. Diese Tests verwenden *M. tuberculosis*-spezifische Antigene ESAT-6 und CFP-10, bei denen kein direkter Vergleich der Reaktivität gegen Tuberkulin möglich ist. In einem großen Kollektiv immungesunder Patienten soll die Häufigkeit positiver *TST* sowie Häufigkeit des Nachweises Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischer CD4 T Zellen bestimmt werden, und die in vitro gemessene T-zelluläre Reaktivität gegen Tuberkulin mit den Ergebnissen des *TST* direkt verglichen werden. Darüber hinaus soll im gleichen Kollektiv die in vitro gemessene Reaktivität gegen das spezifische Antigen ESAT-6 untersucht und im Zusammenhang mit den vorangehenden Ergebnissen betrachtet werden. Der durchflusszytometrische Assay soll in einer Subgruppe einem kommerziell erhältlichen *IGRA*, dem EliSpot<sup>®</sup>, gegenübergestellt werden.

Die Charakterisierung der an einer Erreger-spezifischer Immunreaktion beteiligten Zellen ist essentiell für das Verständnis der Immunologie eines Erregers. Das Oberflächenprotein CD27 ist ein Reifemarker von CD4 T Zellen. Die an der spezifischen Immunantwort gegen *M. tuberculosis* beteiligten CD4 T Zellen sollen bezüglich der Expression dieses Reifemarkers charakterisiert und mit *CMV*-reaktiven T Zellen verglichen werden.

Im Laufe dieser Untersuchungen zeigte ein Proband eine massive zelluläre Immunantwort gegen *TBC*. Diese soll genutzt werden, um eine differenzierte immunologische Aufarbeitung in Bezug auf den Reifestatus und Funktionalität der beteiligten Zellen durchzuführen.

Der in dieser Arbeit verwendete Assay könnte nach weiterführender Evaluation gegebenenfalls zur Diagnostik der latenten Infektion mit *M. tuberculosis* verwendet werden. Im Rahmen einer Umfelduntersuchung eines kulturell gesicherten Indexfalles in einer pädiatrischen Praxis soll dieser Test neben dem *TST* verwendet werden.

Zusammenfassend verfolgt die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

- Evaluation des durchflusszytometrischen Assays für den Nachweis *TBC*-spezifischer CD4 T Zellen bei immungesunden Probanden
- Vergleich der in vitro gemessenen Reaktivität gegen Tuberkulin und ESAT-6 mit den Ergebnissen im *TST* in einem großen Kollektiv immungesunder Patienten der Lungenfachklinik in Homburg
- Intraindividuelle Vergleich der Ergebnisse des durchflusszytometrischem Assay mit dem EliSpot® in einer Subgruppe
- Charakterisierung des Reifungszustandes *M. tuberculosis*-spezifischen CD4 T Zellen mittels des phänotypischen Markers CD27
- Differenzierte immunologische Charakterisierung der reaktiven CD4 T Zellen eines einzelnen Probanden mit ausgeprägter Reaktivität gegen Antigene des *M. tuberculosis*
- Verwendung des durchflusszytometrischen Assays in Rahmen einer Umfelduntersuchung der Kontakte zu einem Indexfall mit kulturell gesicherter Infektion mit *M. tuberculosis*

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Abkürzungen

---

Abkürzung	Langtext
a	anti
a. dest.	aqua destillata
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AM	Alveolarmakrophage
APC	Allophycocyanin
apc	antigen presenting cell (Antigen-präsentierende Zelle)
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CFDA-SE	Carboxy-Fluorescein Diacetat-Succinimidyl-Ester
CFP-10	Culture filtrate protein-10
Ci	Curie
CMV	Zytomegalievirus
cpm	counts pro Minute
DC	Dendritische Zelle
DL	detection limit (Detektionsgrenze)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunosorbent spot

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Langtext</b>
ESAT-6	Early secretory antigenic target 6
FACS	fluorescence activated cell scanning
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HLA	human leukocyte antigen (humanes Leukozyten-Antigen)
HSA	humanes Serumalbumin
IE	internationale Einheit
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
Ko-Ag	Kontroll-Antigen
Li-Heparin	Lithium-Heparin
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
Tab.	Tabelle
TBC	Tuberkulose
TCR	t cell receptor (T-Zell-Rezeptor)
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TST	tuberculin skin test (Tuberkulin-Hauttest) nach Mendel-Mantoux
Upm	Umdrehungen pro Minute

### 3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät / Material	Hersteller
1,5ml Reaktionsgefäße	Greiner, Frickenhausen
AID EliSpot® Reader HR	AID GmbH, Straßberg
Autoklav "Systec 2540 EL"	Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg
Bottletop dispenser (Seridos)	Selzer, Labortechnik GmbH, Waghäusel
Brutschrank "CO <sub>2</sub> -Auto-Zero"	Heraeus, Hamburg
Absaug-Harvester	Wallach, Freiburg
Stab-Pipetten „Costar Stripette“ (1 ml, 2 ml, 5ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
Elektrische Pipettiergeräte („Pipetboy acu“, „Pipetboy plus“)	Integra, Biosciences, Fernwald
Eppendorffzentrifuge, Minifuge	Eppendorf, Hamburg
FACS Calibur Durchflussszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
FACS-Röhrchen (5ml Polystyrol-Rundbodenröhrchen)	BD Biosciences, Heidelberg
Filtermatten	Wallac, Freiburg
Geschliffene Deckgläser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Heizplatte	Fischer Scientific GmbH, Schwerte
Kanüle, subkutan, Mikrolance 27 Gauge	Becton Dickinson, Drogheda, Ireland
Kolbenhubpipette „Pipetman P“ (10 / 20 / 100 / 200 und 1000µl)	Gilson, Middleton, USA
Kulturplatten (48- und 96- Wellplatten, Rundboden)	Greiner, Frickenhausen
Leukozytenfilter PALL RCXL2	PALL Medical, Portsmouth, Großbritannien
Li-Heparin-Monovette (4,7 / 9ml)	Sarstedt, Nümbrecht
MACSmix-Roller	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop Nikon TMS	Nikon, Düsseldorf

<b>Gerät / Material</b>	<b>Hersteller</b>
Milli-Q UF Plus	Millipore, Schwalbach
Neubauer Zählkammern	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pipettentips (10 / 20 / 100 /200 und 1000µl)	Greiner, Frickenhausen
Szintillationswachs (Microbeta Meltilex)	Wallac, Freiburg
Szintillationszähler Beta Counter®	Wallac, Freiburg
Sterile Werkbank Clean Air Type DLF BSS4	Clean Air Technik bv, Woerden, Niederlande
Sterile Werkbank Tecnoflow	Integra Biosciences, Fernwald
Spritze, 1ml	Becton Dickinson, Madrid, Spanien
Vacusaft Absauggerät	Integra Biosciences, Fernwald
Vortex Mixer „neoLab 7-2020“	neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Zentrifuge „Hettich Rotanta / RPC“	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge „Labofuge“	Heraeus, Hanau

### 3.3 Substanzen

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen
BFA	Sigma, Deisenhofen
BSA	Serva, Heidelberg
CFDA-SE Cell Tracer Kit	MoBiTec GmbH, Göttingen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure (CH <sub>3</sub> -COOH)	Sigma, Deisenhofen
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
FCS	BioWittaker, Belgien
FicoLite-H Separation Medium (Human)	Linaris, Wertheim-Bettingen
<sup>3</sup> H-Thymidin	ICN BIOMEDICALS GmbH, Eschwege
L-Glutamin	PAA, Cölbe
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Fluka, Buchs, Schweiz
Natrium-Heparin	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen
PBS	Linaris, Wertheim-Bettingen
Penicillin	PAA, Cölbe
Paraformaldehyd	Aldrich-Chemie, Steinheim
RPMI 1640 Zellkulturmedium	Biochrom AG, Berlin
Saponin	Sigma, Deisenhofen
Streptomycin	PAA, Cölbe

### 3.3.1 Zusammensetzung von Puffer und Medium

FACS-Puffer	PBS + 5% FCS + 2,5% BSA + 0,1% NaN <sub>3</sub> (FCS wurde für 25 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert und durch den „PALL RCXL2“ Leukozytenfilter gefiltert)
<i>CFDA-SE</i> Labelinglösung	PBS + 0,1% HSA + 10mM <i>CFDA-SE</i> (aus Stocklösung in DMSO)
Saponin-Puffer	FACS-Puffer + 0,1% Saponin
Zellkulturmedium	RPMI 1640 + 1% Glutamin+ je 1% Penicillin und Streptomycin + 0,5% HSA (sofern nicht anders angegeben)

### 3.4 Stimulanzen, Ko-Stimulanzen und Antikörper

#### 3.4.1 Stimulanzen

Zur Stimulation von Antigen-spezifischen T Zellen im Vollblut-Assays und in den Proliferations-Assays wurden die in Tabelle 1 genannten Stimulanzen verwendet. Neben dem Hersteller sind die in den Versuchen verwendeten Konzentrationen angegeben.

**Tabelle 1:** Stimulanzen und Ko-Stimulanzen für Vollblut- und Proliferationsassays

Stimulanz	Klon	Konzentration	Hersteller
aCD28	L293	1µg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
aCD49d	9F10	1µg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
CFP-10	-	0,5mg/ml	Lionex, Braunschweig
CFP-10 Einzel-peptide (C1-16)	-	50µg/ml	Oxfordimmunotec, Großbritannien
CMV-Ag	-	32µl/ml	BioWhittaker, Belgien
CMV Ko-Ag	-	32µl/ml	BioWhittaker, Belgien
ESAT-6	-	0,5mg/ml	Lionex, Braunschweig
ESAT-6 Einzel-peptide (E1-17)	-	50µg/ml	Oxfordimmunotec, Großbritannien
SEB	-	2,5µg/ml	Sigma, Deisenhofen
Tuberkulin	-	222IE/ml	Chiron Behring, Marburg

#### 3.4.2 Antikörper

In der durchflusszytometrischen Analyse von CD4 T Zellen wurden zur Charakterisierung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Zytokinen die in Tabelle 2 dargestellten monoklonalen Antikörper verwendet. Angegeben sind konjugierte Fluorochrome, der Klon sowie die eingesetzten Konzentrationen pro Färbeansatz. Die kostimulatorischen Antikörper aCD28 und aCD49d (siehe Tabelle 1) wurden unkonjugiert verwendet. Alle Antikörper werden unter

Sättigungsbedingungen eingesetzt, wozu in Vorversuchen die notwendigen Konzentrationen ausgetestet wurden.

**Tabelle 2:** Monoklonale, fluorochromkonjugierte Antikörper

<b>Antikörper + Fluorochrom</b>	<b>Klon</b>	<b>Volumen pro Färbeansatz</b>	<b>Hersteller</b>
aCCR7 PE	3D12	3µl	BD Biosciences, Heidelberg
aCD3 APC	SK7	5µl	BD Biosciences, Heidelberg
aCD4 APC	SK3	0,5µl	BD Biosciences, Heidelberg
aCD8 PerCP	SK1	4µl	BD Biosciences, Heidelberg
aCD27 PE	L128	2µl	BD Biosciences, Heidelberg
aCD45RO PE	UCHL-1	4µl	BD Biosciences, Heidelberg
aCD62L PE	DREG-56	8µl	BD Biosciences, Heidelberg
aCD69 PerCP	L78	2µl	BD Biosciences, Heidelberg
aIFN $\gamma$ FITC	4S.B3	0,5µl	BD Biosciences, Heidelberg
aIL-2 FITC	MQ1-17H12	0,5µl	BD Biosciences, Heidelberg
aIL-4 PE	8D4-8	1µl	BD Biosciences, Heidelberg
aTNF $\alpha$ FITC	MAb11	0,5µl	BD Biosciences, Heidelberg
aTNF $\alpha$ PE	MAb11	0,5µl	BD Biosciences, Heidelberg
aHLA-DP	B7/21	12µl	BD Biosciences, Heidelberg
aHLA-DQ	SK10	12µl	BD Biosciences, Heidelberg
aHLA-DR	L243	12µl	BD Biosciences, Heidelberg
V $\beta$ -Antikörper	IO Test $\beta$ Mark V $\beta$ Kit	je 0,3µl	Beckman Coulter, Krefeld

### 3.5 Probanden- und Patientenkollektiv

Nach Aufklärung und Einwilligung in die Durchführung eines Hauttest erfolgte die Rekrutierung der Probanden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Ulrich Mack aus der Klinik für Innere Medizin V am Universitätsklinikum des Saarlandes. Bei 315

Probanden wurden ein *TST* sowie eine Blutentnahme zur Stimulation von T Zellen *in vitro* durchgeführt. Sofern der *TST* vom Probanden abgelehnt wurde oder eine Kontraindikation gegen die Durchführung bestand (manifeste *TBC* in der Anamnese, manifester Hauterkrankung), wurden die Daten der durchflusszytometrischen Analysen alleine für einzelne Auswertungen (siehe im entsprechenden Kapitel) verwendet. Insgesamt wurden die Daten von 528 immungesunden Probanden im Alter von 18 bis 92 Jahren untersucht (Median: 55 Jahre). In den jeweiligen Kapiteln wird näher spezifiziert, sofern von einzelnen Probanden mehrere Datensätze in eine Auswertung eingeflossen sind, oder retrospektiv zusätzliche Datensätze in die Auswertung aufgenommen wurden.

Im Rahmen einer Umfelduntersuchung wurden 48 Personen retrospektiv untersucht, die Kontakt zu einem Indexfall mit *M. tuberculosis* im familiären Umfeld (n=12), während einer ambulanten Behandlung (n=17) in einer Kinderarztpraxis und während eines stationären Aufenthaltes (n=19) hatten.

### 3.6 Tuberkulin-Hauttest nach Mendel-Mantoux

Im Jahre 2004 stellte die Firma Chiron Bering GmbH & Co KG, Marburg die Produktion des Präparates Tuberkulin GT10 unerwartet ein. Daher wurde nach Aufbrauchen der Restbestände auf das Präparat BiocineTest-PPD der Firma Chiron Vaccines, Italien umgestellt. Die beiden in Tabelle 3 genannten Präparate zur intrakutanen Testung der Reaktivität gegen Tuberkulin sind in den in dieser Arbeit verwendeten Dosierungen bioäquivalent (SAGEBIEL et al., 2005).

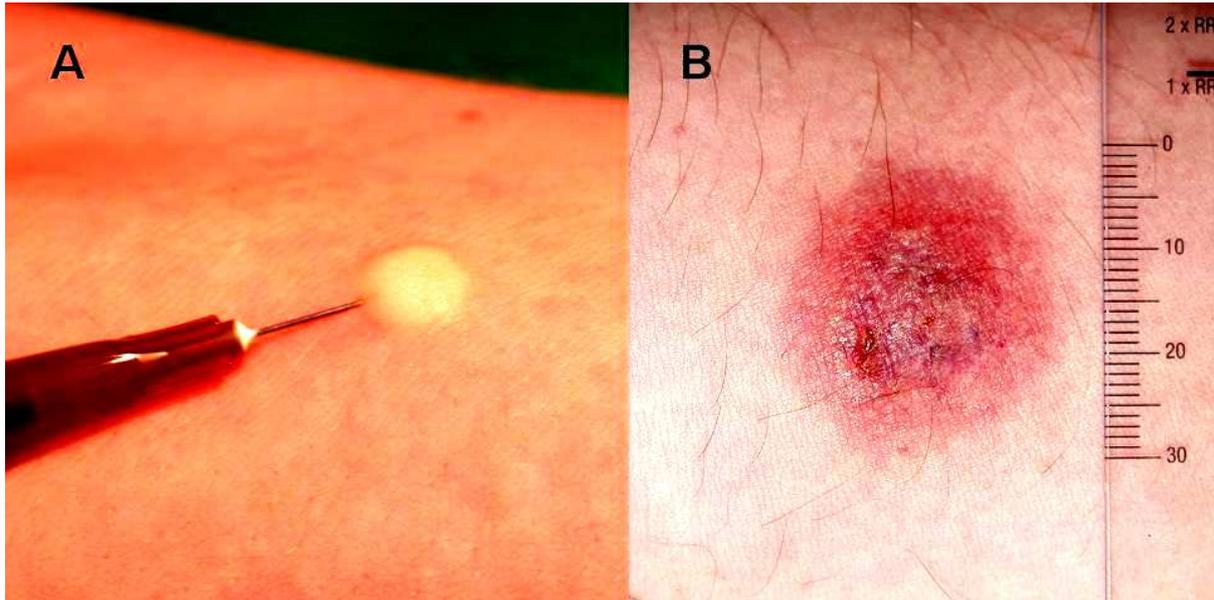
**Tabelle 3:** Tuberkulin-Präparate

Präparat	Konzentration	Hersteller
Tuberkulin GT10	100IE/ml	Chiron Bering GmbH & Co KG, Marburg
BiocineTest PPD	50IE/ml	Chiron Vaccines, Italien

#### 3.6.1 Anlage

Nach lokaler Hautdesinfektion erfolgte die Inokulation von 0,1ml des jeweiligen Präparates streng intrakutan in die Volarseite des Unterarmes. Als Negativkontrolle

diente die Inokulation der gleichen Menge Lösungsmittel an eine benachbarte Stelle. Die Ausbildung einer charakteristischen Blase in der Haut, dargestellt in Abb. 1A, wurde als korrekte Applikation angesehen. Trat diese Blase nicht auf, ein Hinweis für subkutane Applikation, wurde der Test an gleicher Stelle des kontralateralen Arms wiederholt. Abb. 1B zeigt eine Induration von 20 Millimetern nach einem *TST*. Neben der charakteristischen Induration und Hautrötung zeigt sich hier eine zentrale Nekrose der Haut.



**Abb. 1:** Im Teil **A** ist die korrekte Anlage eines *TST* gezeigt. Auf der Volarseite des Unterarmes wird mit einer 27 Gauge Kanüle in flachem Winkel intrakutan eingestochen und 0,1ml der Testsubstanz injiziert. Die Entstehung einer weißen Blase in der Haut diente als Anzeichen für eine korrekte Applikation der Testsubstanz. In Teil **B** ist ein positiver *TST* gezeigt. Neben der charakteristischen Rötung und Induration hat sich in diesem Falle eine Hautnekrose gebildet. Die Induration betrug in diesem Beispiel 20 Millimeter.

### 3.6.2 Ablesen

Das Ablesen des *TST* erfolgte innerhalb von 48 bis 72 Stunden, gemessen wurde der Durchmesser in Millimeter der palpierbaren Induration an der Injektionsstelle. Eine Induration von fünf Millimetern und mehr wurde als positives Ergebnis erachtet.

## 3.7 Blutentnahme, Lagerung und Isolation von Blutzellen

### 3.7.1 Blutentnahme und Lagerung

Zur Vollblut-Stimulation (siehe 3.8) wurde den Probanden mindestens 2ml peripherenvenöses Blut in eine Li-Heparin-Monovette entnommen. Zur Isolation von *PBMC* für

den ELISpot<sup>®</sup>-Assay (siehe 3.9) oder die Proliferations-Assays (siehe 3.10 und 3.11) wurden mindestens 9ml venöses Blut ebenfalls in Li-Heparin-Röhrchen entnommen. Vor der Weiterverarbeitung und Stimulation der Zellen wurde das Blut maximal 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Die zur Verwendung in Proliferations-Assays vorgesehenen Blutproben wurden sofort nach Entnahme weiterverarbeitet.

### 3.7.2 Isolation von *PBMC* über einen Dichtegradienten

Zur Trennung der *PBMC* von den übrigen zellulären Bestandteilen des Vollblutes wurde ein Ficoll-Gradient verwendet; alle Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank. Es werden mindestens 9ml heparinisiertes Vollblut in ein 50ml Falconröhrchen gegeben, mit kaltem, sterilem PBS-0,02% EDTA auf 35ml aufgefüllt und vorsichtig gemischt. 13ml Ficoll werden mit einer Pipette langsam unterschichtet, ohne dass sich beide Phasen vermischen. Nun wird das Falconröhrchen für 20 Minuten bei 2500 Upm, bei Raumtemperatur und ausgeschalteter Bremse zentrifugiert.

Die Methode beruht auf dem Prinzip der Dichtentrennung. Mononukleäre Zellen lagern sich hierbei als Interphase zwischen dem Ficoll und dem Plasma-*PBS*-Gemisch ab. Die übrigen zellulären Bestandteile passieren aufgrund ihrer höheren Dichte das Ficoll und finden sich am Boden des Falconröhrchens wieder.

Das Plasma-*PBS*-Gemisch wird verworfen, der *PBMC*-Saum mit einer Pipette abgenommen und in ein neues 50ml Falconröhrchen überführt. Dieses wird mit 50ml kaltem, sterilem PBS-0,02% EDTA aufgefüllt, bei 1800 Upm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dieser Waschschrift wird wiederholt. Danach wird das Zellpellet in einem Milliliter Zellkulturmedium (Zusammensetzung siehe 3.3.1) resuspendiert.

### 3.7.3 Bestimmung der Zellzahl

Der Zellsuspension (aus 3.7.2) werden 10µl entnommen und in einem 1,5ml Reaktionsgefäß im Verhältnis 1:10 mit 3%iger Essigsäure verdünnt. Nach einer Inkubation von drei Minuten sind noch vorhandene Erythrozyten lysiert und die *PBMC* können gezählt werden.

10µl der verdünnten Lösung werden in eine Neubauer Zählkammer überführt, auf die zuvor ein geschliffenes Deckglas aufgesetzt wurde. Ausgezählt werden mindestens

zwei sich diagonal gegenüberliegende Quadranten, aus denen der Mittelwert X gebildet wird. Nach folgender Formel wird die Zellzahl N pro ml Medium berechnet:

$$N = X \cdot 10^4 \text{ (Kammerfaktor)} \cdot 10 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

Nun kann durch weiteres Auffüllen mit Zellkulturmedium die gewünschte Zellkonzentration eingestellt werden.

### 3.8 Quantifizierung Antigen-spezifischer T Zellen aus dem Vollblut

Die Quantifizierung Antigen-spezifischer T Zellen aus Vollblut erfolgt mittels Durchflusszytometrie. In dem hier verwendeten Vollblut-Assay werden T Zellen mit einem Antigen in vitro stimuliert und bezüglich ihrer Zytokinproduktion analysiert. Zusätzlich können die Zellen mittels verschiedener Oberflächenmarker phänotypisch charakterisiert werden. Der prozentuale Anteil Zytokin-produzierender, CD69-positiver CD4 Zellen an der Gesamtzahl aller CD4 T Zellen wird im Folgenden als Frequenz Antigen-spezifischer T Zellen bezeichnet.

Die Stimulation erfolgt in 15ml Falconröhrchen, die im Folgenden als Stimulationsansatz bezeichnet werden. In der Regel werden 450µl Vollblut pro Stimulationsansatz verwendet; Zellen aus dieser Menge können auf zwei Färbungen aufgeteilt werden. Falls mehr als zwei Färbungen durchgeführt werden, können bis zu 900µl Vollblut in einem Stimulationsansatz stimuliert werden.

#### 3.8.1 Stimulation im Vollblut

Das zu stimulierende heparinisierte Vollblut eines Patienten wird mit jeweils 1µl/ml kostimulatorischer Antikörper (aCD28 und aCD49d, siehe Tabelle 1) versetzt. Anschließend wird das Blut auf die einzelnen Stimulationsansätze verteilt, wodurch ein exakt gleiches Mischungsverhältnis von Blut und kostimulatorischer Antikörper in allen Stimulationsansätzen gewährleistet ist. Nun werden die Antigene in den in Tabelle 1 genannten Konzentrationen hinzugegeben.

Mit einem Vortex-Mixer wird der Ansatz kurz gemischt und bei 37°C und 6%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Während dieses ersten Inkubationsschrittes erfolgt die Antigenprozessierung und -präsentation. Nach zwei Stunden werden 10µg/ml des Pilztoxins *Brefeldin A (BFA)* hinzugegeben, und die Ansätze für weitere vier Stunden im Brutschrank inkubiert. *BFA* bewirkt eine

Blockade der Sekretion aus dem Golgi-Apparat. Die reaktiv auf den Antigenstimulus gebildeten Zytokine werden nicht sezerniert, sondern akkumulieren in der Zelle und können später intrazellulär mittels Antikörper markiert werden. Sie dienen neben CD69 als Marker für die Antigen-spezifische Aktivierung einer Zelle.

### 3.8.2 Fixierung

Während der Inkubationszeit haben sich Interaktionen zwischen den einzelnen Zellen ausgebildet, bei der Antigen-spezifische T-Zellen an die *apc* binden. Immunkompetente Zellen verändern bei Aktivierung ihre Oberfläche, so dass sie *in vitro* an der Oberfläche des Reaktionsgefäßes adhären können. Um dies zu verhindern und um die Zellen zu separieren, werden die Zellen mit 2mM *EDTA* (aus 20mM Stocklösung) versetzt, mit dem Vortex-Mixer für zehn Sekunden gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nun werden dem Ansatz 9ml/ml Lysing Solution hinzugegeben. Sie bewirkt zum einen eine Lyse von Erythrozyten, zum anderen fixiert sie die Leukozyten. Die Fixierung geschieht über eine Denaturierung und damit Verklebung der Proteine innerhalb der Zelle. Dieser Schritt bewirkt, dass die Zellen bei der späteren Perforation mit Saponin nicht zerstört werden und die akkumulierten Zytokine bei der Permeabilisierung nicht herausdiffundieren. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die Zellen bei 1300 Upm für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Es folgt ein Waschschrift mit 2ml FACS-Puffer (siehe 3.3.1). Anschließend wird das Zellpellet pro durchzuführenden Färbeansatz in 200µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Zellen können entweder sofort gefärbt oder bei 4°C für maximal 72 Stunden aufbewahrt werden.

### 3.8.3 Herstellen der Färbelösung

Für jede zu färbende Probe werden 50µl Färbelösung verwendet, welche unter der sterilen Werkbank hergestellt wird. Sie setzt sich wie folgt zusammen: Die Antikörper werden in den in Tabelle 2 angegebenen Konzentrationen eingesetzt, zusätzlich wird 1µl 5%iges Saponin zugegeben und mit FACS-Puffer auf ein Volumen von 50µl aufgefüllt. Der FACS-Puffer hat einen hohen Proteingehalt und dient dazu, möglichst viele unspezifische Bindungsstellen der Antikörper auf der Zelle zu sättigen.

### 3.8.4 Färbung der Vollblut-Ansätze

Zur Färbung werden die Zellen in 5ml Polystyrol-Rundbodenröhrchen (FACS-Röhrchen) überführt. Wie in 3.8.2 bereits beschrieben, werden pro Färbung 200µl Zellsuspension verwendet. Zur Anfärbung der in den Zellen akkumulierten Zytokine müssen die Zellmembran und die Membranen des Golgi-Apparates perforiert werden. Dazu wird den Proben 2ml Saponin-Puffer (siehe 3.3.1) zugegeben, und diese für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zehn Minuten Zentrifugation bei 1300 Upm und Absaugen des Überstandes wird die Färbelösung hinzugegeben. In dieser Lösung herrscht die gleiche Konzentration Saponin wie zuvor im Saponin-Puffer, um die Perforation der Membranen aufrecht zu erhalten und ein Eindringen der Antikörper in die Zelle zu ermöglichen. Die Färbung wird bei Raumtemperatur im Dunkeln für 30 bis 45 Minuten inkubiert. Mit 3ml FACS-Puffer wird die Färbereaktion gestoppt, die Probe bei 1300 Upm für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wird in 200µl Paraformaldehyd aufgenommen und kann bis zur Messung maximal 24 Stunden bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt werden.

### 3.8.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Verfahren, welches eine Bestimmung Zell-spezifischer Parameter auf Einzelzellniveau erlaubt. Die in Suspension vorliegenden Einzelzellen werden über ein hydrodynamisches System durch eine Flußzelle einzeln an zwei Lasern vorbeigeführt. Hierbei entstehen Streulichteffekte, die von opto-elektrischen Detektoren unter zwei verschiedenen Winkelbereichen erfasst werden. Nur geringfügig gestreutes Licht wird als Vorwärtsstreulicht (forward scatter) bezeichnet und ist ein relatives Maß für die Größe der Zelle. Das in größerem Winkel gestreute Licht (Seitwärtsstreulicht, side scatter) dient als relatives Maß für die Granularität der Zelle. Diese beiden Informationen, in einem zweidimensionalen Punktdiagramm (Dotplot) aufgetragen, erlauben bereits eine Differenzierung der Blutzellen in unterschiedliche Subpopulationen (Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten). Mit dem hier verwendeten Durchflusszytometer können darüber hinaus vier verschiedene Fluoreszenzen detektiert werden. Diese sind Emissionen charakteristischer Wellenlänge eines Fluorochroms, welches zuvor von einem der beiden Laser angeregt wurde. Die Intensität des emittierten Lichtes ist proportional

zur Expressionsdichte des jeweiligen Markers auf der Zelle. In jeder Probe werden mindestens 15.000 CD4 T Zellen analysiert. Mit Hilfe von eindimensionalen Histogrammen oder zweidimensionalen Dotplots mit Darstellung von einem oder zwei der sechs gemessenen Parameter lassen sich nun einzelne Zellpopulationen getrennt voneinander betrachten und über eine Histogramm- oder Quadrantenstatistik quantifizieren.

### 3.8.6 HLA-Hemmtest

Jedes Antigen wird nach Phagozytose und Prozessierung in *apc* in Form von kurzen Peptiden im Kontext von *HLA*-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Der Komplex aus *HLA*-Molekül und Antigen wird von spezifischen Effektor-Zellen des Immunsystems erkannt, welche ihrerseits eine spezifische Immunantwort induzieren. Im menschlichen Organismus existieren drei unterschiedliche Subtypen des *HLA*-Moleküls, die Moleküle *HLA*-DR, -DP und -DQ. Im *HLA*-Hemmtest wurde die Stimulation mit Antigenen wie in 3.8.1 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurden zeitgleich zu den jeweiligen Antigenen spezifische, nicht-fluorochromkonjugierte Antikörper gegen die einzelnen *HLA*-Subtypen in den in Tabelle 2 genannten Konzentrationen zugefügt. Der weitere Versuchsablauf entspricht dem in 3.8 beschriebenen Vorgehen.

## 3.9 EliSpot<sup>®</sup>-Assay

Dieser Assay basiert auf der spezifisch nach Stimulation mit Antigenen induzierten Zytokinproduktion. Im Vergleich zum durchflusszytometrischen Assay wird die Sekretion der Zytokine nicht intrazellulär blockiert, sondern die Zellen sezernieren Zytokine in ein mit Antikörpern gegen IFN $\gamma$  beschichtetes Mikrotiter-Well. Über eine dem ELISA ähnliche Färbereaktion werden nach Entfernung der Zellen die Stellen, an denen Zytokine sezerniert wurden, sichtbar gemacht. Diese „Fußabdrücke“ werden im Folgenden als Spots bezeichnet.

Bei diesen Versuchen, die freundlicherweise im immunogenetischen Labor von Herrn Dr. med. B. Thiele in Kaiserslautern durchgeführt werden durften, wurde der EliSpot<sup>®</sup> Basiskit ELSP 5500 und die Antigene ELSP 5918 (ESAT-6) und ELSP 5929 (CFP-10) der Firma AID GmbH, Straßberg verwendet. Es wurden die im Testkit

enthaltenen Reagenzien (Tabelle 4) verwendet, die Ausführung erfolgte streng nach Anweisungen des Herstellers.

**Tabelle 4:** Bestandteile des Testkits EliSpot® Kit ELSP 5500

Menge	Reagenzien	Endverdünnung
1	Multitestplatte, beschichtet mit Antikörpern gegen IFN $\gamma$	-
40ml	Waschpuffer, 10x Konzentrat (PBS mit Tween)	40ml + 360ml a. dest.
10ml	Verdünnungspuffer 1 (VP1), 10x Konzentrat	10ml + 90ml a. dest.
5ml	Verdünnungspuffer 2 (VP2), zur Verdünnung von GABA	gebrauchsfertig
50 $\mu$ l	Biotin-konjugierter Sekundärantikörper	40 $\mu$ l + 10ml VP1
150 $\mu$ l	Gold-konjugierter anti-Biotin Ak (GABA)	100 $\mu$ l + 5ml VP2
je 7ml	Aktivatorlösung A und B	A und B 1:1 mischen
2 x 1,5ml	Pokeweed Mitogen	gebrauchsfertig
Je 1,5ml	ELSP 5918 (ESAT-6) und ELSP 5929 (CFP-10)	gebrauchsfertig

### 3.9.1 Stimulation

Zur Stimulation werden isolierte *PBMC* (siehe 3.7.2) in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter RPMI 1640-Medium (+10% hitzeinaktiviertes FCS + 290 $\mu$ g/ml L-Glutamin) verwendet. Zunächst werden 100 $\mu$ l der jeweiligen Stimulanzen in die Wells verbracht. Das Medium dient als Negativkontrolle, Pokeweed Mitogen als Positivkontrolle. In jedes Well werden 100 $\mu$ l Zellsuspension gegeben und die Platte erschütterungsfrei bei 37°C und 6%iger CO $_2$ -Atmosphäre für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

### 3.9.2 Anfärben der Spots

Zum Abstoppen der Stimulation werden alle Wells mit je 200 $\mu$ l Waschpuffer sechsmal gefüllt und durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entleert. Dieser Waschschrift entfernt alle Zellen aus den Wells und legt die zu färbenden IFN $\gamma$ -Spots frei. Als Sekundärantikörper dient ein Biotin-konjugierter Antikörper, spezifisch für IFN $\gamma$ , von welchem nun 100 $\mu$ l hinzugegeben werden, und der bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert wird. Die Platte wird anschließend wie oben beschrieben

viermal gewaschen. Nun werden 50µl des Gold-Konjugierten anti-Biotin Antikörpers (GABA) zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Es folgen wieder sechs Waschschritte, bevor 100µl des Gemisches aus Aktivatorlösung A und B hinzugegeben werden. Diese enthält einen Silberverstärker, der die Spots durch einen unlöslichen weißen Niederschlag sichtbar macht. Der Farbumschlag entwickelt sich bei Raumtemperatur innerhalb von circa 15 Minuten. Die Reaktion wird durch dreimaliges Waschen mit Leitungswasser abgestoppt. Vor der Auswertung ist die Platte vollständig zu trocknen, da Artefakte durch Flüssigkeitsrückstände entstehen können.

### 3.9.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgt mit einem automatisierten EliSpot-Reader<sup>®</sup>, zusätzlich wurden die einzelnen Wells unter dem Lichtmikroskop von zwei Personen (U.S. und T.H.) unabhängig voneinander ausgezählt. Bei grober Abweichung des Gerätes, die vor allem bei starker Zytokinproduktion und daraus resultierend konfluierenden Spots entstand, wurde die gemittelte Spotanzahl aus beiden manuellen Zählungen verwendet. Gemäß den Vorgaben des Herstellers wurden Probanden mit mehr als zehn Spots in der Negativkontrolle bzw. weniger als 50 Spots in der Positivkontrolle von der Auswertung ausgeschlossen.

### 3.10 Proliferationsnachweis mittels *CFDA-SE*

Hierzu wurden zuvor isolierte *PBMC* (siehe 3.7.2) verwendet. *CFDA-SE* ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in Zellen diffundiert und mit Proteinen eine unspezifische kovalente Bindung eingeht. Bei Teilung der Zelle verteilt sich der Farbstoff zu gleichen Teilen auf beide Tochterzellen, seine Intensität nimmt somit in jeder Generation um die Hälfte ab. Mittels Durchflusszytometrie lässt sich die Fluoreszenz des Farbstoffes detektieren und bei bekannter Ausgangsintensität die Generation der einzelnen Zellen bestimmen. Rechnerisch kann nun das Ausmaß der spezifischen Proliferation auf einen Stimulus ermittelt werden. Zusätzlich können bis zu drei weitere Fluoreszenzen detektiert werden, um die proliferierenden Zellen phänotypisch zu charakterisieren.

### 3.10.1 Labelingreaktion mit *CFDA-SE*

Zuerst müssen die *PBMC* mittels Ficoll isoliert und mit *CFDA-SE* angefärbt werden. Dies erfolgt in einem 15ml Falconröhrchen, in welches die Zellen in einer Konzentration von  $1-50 \times 10^6$  Zellen pro ml gegeben werden. Die 2x Labelinglösung (siehe 3.3.1) wird in einem Verhältnis 1ml pro ml Zellsuspension zugesetzt. Diese Mischung wird zehn Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert und währenddessen von einem MACSmix-Roller kontinuierlich bei 70 Upm gemischt. Zum Abstoppen der Färbereaktion werden 13ml Zellkulturmedium (siehe 3.3.1) zugegeben. Die Probe wird für zehn Minuten bei 1300 Upm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wird in 15ml des oben genannten Mediums resuspendiert, für fünf Minuten im Brutschrank und MACS-Roller inkubiert, zentrifugiert und abgesaugt. Dieser Schritt wird nochmals wiederholt. Nun wird das Pellet in der entsprechenden Menge Medium aufgenommen, um eine Konzentration von  $10 \times 10^6$  Zellen pro ml herzustellen.

### 3.10.2 Stimulation *CFDA-SE* markierter Zellen

Die Stimulation erfolgt in 48-Wellplatten. Pro Well werden 200µl (200.000 *PBMC*) der *CFDA-SE* gefärbten Zellsuspension eingesetzt. In einem gemeinsamen Ansatz für alle Stimuli werden die kostimulatorischen Antikörper zugegeben, dann werden die Zellen auf die einzelnen Wells verteilt. Nun werden die Antigene zugegeben. Die Konzentrationen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Die Proben werden bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden werden die Wells mit 800µl RPMI +1% Glutamin +je 1% Penicillin und Streptomycin + 5% autologem Plasma aufgefüllt und für weitere vier Tage inkubiert.

### 3.10.3 Färbung *CFDA-SE* markierter Zellen

An Tag fünf werden die Zellen der Proben nach zwölfmaliger Resuspension mit einer Pipette entnommen. Die Zellen werden in Polystyrol-FACS-Röhrchen überführt, mit 2mM EDTA versetzt, zehn Sekunden mit dem Vortex-Mixer gemischt, und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun werden 2ml FACS-Puffer zugegeben, die Proben unter vorgenannten Bedingungen zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zu dem Zellpellet wird die Färbelösung zugegeben, die nach Angaben in

Absatz 3.8.3, in diesem Falle jedoch ohne die Verwendung von Saponin, hergestellt wird. Das weitere Vorgehen ist analog zu Absatz 3.8.4. Die Zellen werden bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt und innerhalb von 24 Stunden gemessen.

### **3.11 Proliferationsnachweis mittels <sup>3</sup>H Thymidin**

#### **3.11.1 Stimulation der Zellen für den Thymidin-Proliferations-Assay**

Die durch einen Ficoll isolierten *PBMC* (siehe 3.7) werden in Zellkulturmedium mit 5% autologem Plasma resuspendiert um eine Zellzahl von 10<sup>6</sup> Zellen pro ml zu erhalten. Die kostimulatorischen Antikörper (siehe Tabelle 1) werden hinzugegeben, und die Suspension auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte verteilt, sodass ein Well 200µl Suspension mit 2 x 10<sup>5</sup> Zellen enthält. Die Antigene werden in den in Tabelle 1 genannten Konzentrationen zugegeben. Jedes Antigen wird in dreifachem Ansatz getestet. Die Platte wird nun im Brutschrank bei 37°C und 6%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Nach 72 Stunden werden die Proben mit 0,25µCi/Well <sup>3</sup>H-Thymidin versetzt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Nach bereits erfolgter Proliferation für drei Tage wird nun der radioaktiv markierte DNA-Baustein in die DNA der sich teilenden Zellen eingebaut.

#### **3.11.2 Messung der Proliferation**

Die Platten werden in einem Szintillationszähler vermessen. Zunächst müssen die Zellen aus den Wells mittels eines Absaugharvester auf eine Filtermatte übertragen werden. Der Inhalt eines jeden Wells wird angesaugt und durch ein designiertes Areal der Filtermatte gepresst. Höhermolekulare Bestandteile (DNA, Zelltrümmer etc.) bleiben in dem feinmaschigen Material der Matte hängen, während nicht eingebautes <sup>3</sup>H-Thymidin diese passiert und verworfen wird. Die Matte wird auf einer Heizplatte für drei Minuten getrocknet, um dann mit einer Wachsplatte verschmolzen zu werden, die einen Szintillationscocktail enthält. Mit Hilfe eines Beta Counters<sup>®</sup> werden die radioaktiven Emissionen des <sup>3</sup>H-Thymidins in jedem Areal gemessen. Das Ergebnis wird in *cpm* (counts pro Minute) angegeben. Die Ergebnisse der drei Ansätze eines jeden Antigens werden gemittelt und der Quotient aus spezifischer Proliferation und Kontroll-Stimulation ergibt den spezifischen Stimulationsindex (SI).

### 3.12 Software

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die in Tabelle 5 aufgeführte Software verwendet.

**Tabelle 5:** Verwendete Software

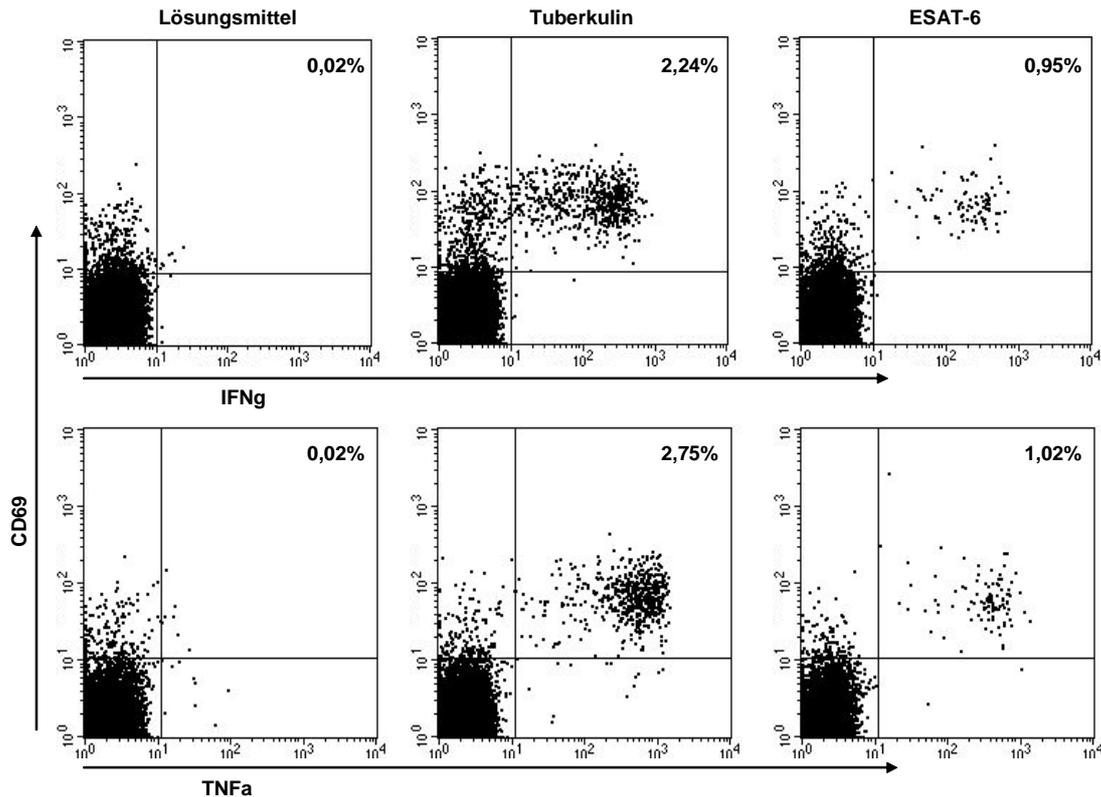
<b>Programm</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Hersteller</b>
CellQuest Pro 4.0.2	Durchflusszytometrische Daten	BD Biosciences, Heidelberg
EndNote 7.0.0	Literaturverzeichnis	Thomson ISI ResearchSoft, USA
Graphpad Prism 4.0.1	statistische Auswertung, Grafiken	Graphpad, USA
Microsoft Access 2003	Probanden-, Antikörper-Datenbanken	Microsoft, USA
Microsoft Excel 2003	Tabellenkalkulation, Grafiken	Microsoft, USA
Microsoft Picture Manager 2003	Bearbeiten von Fotos und Abbildungen	Microsoft, USA
Microsoft Power Point 2003	Präsentationen, Poster, Grafiken	Microsoft, USA
Microsoft Word 2003	Textverarbeitung	Microsoft, USA

## 4. Ergebnisse

### 4.1 *M. tuberculosis*-spezifische T Lymphozyten lassen sich *ex vivo* aus dem Vollblut nachweisen

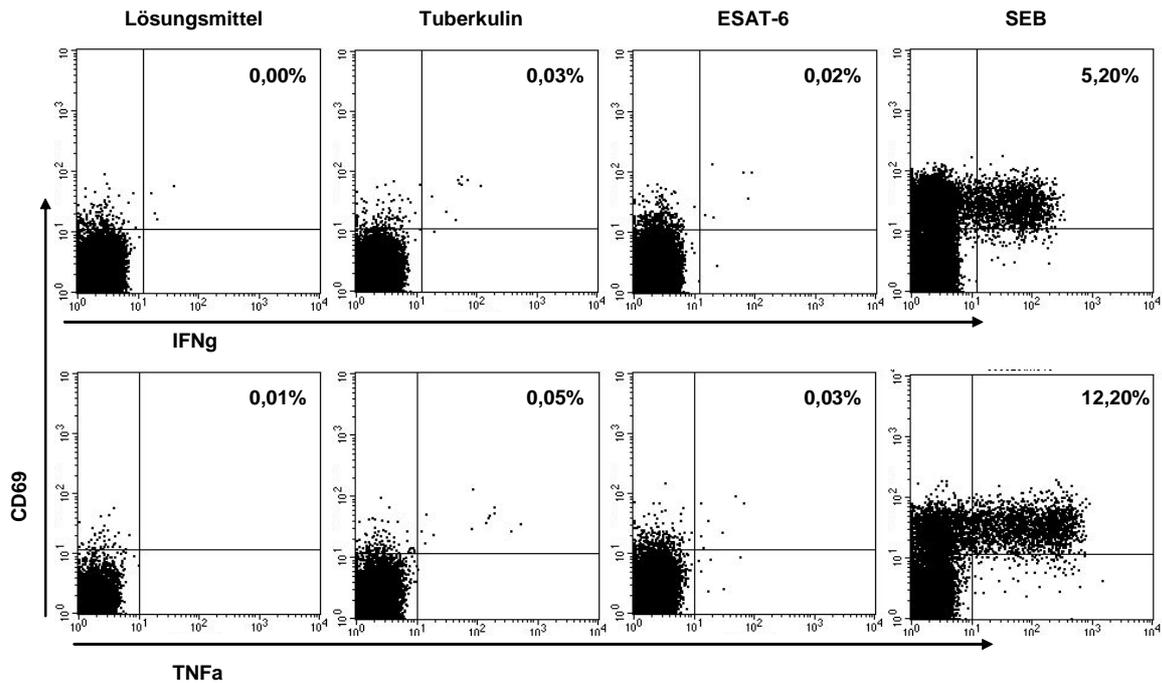
Zur Bestimmung spezifischer T Lymphozyten gegen *M. tuberculosis* wurde heparinisiertes Vollblut für sechs Stunden mit den Antigenen Tuberkulin und ESAT-6 inkubiert. Während dieser Zeit haben *apc* die Antigene aufgenommen, prozessiert und in membranständigen *MHC*-Klasse-II-Molekülen präsentiert. Antigen-spezifische T Zellen erkennen diesen Komplex aus *MHC*-Klasse-II-Molekül und Antigen mit ihrem *TCR* und werden aktiviert. Sie bilden Zytokine, welche *in vivo* sezerniert werden würden, um eine Inflammationsreaktion in Gang zu bringen. In diesem Assay wurde die Zytokinsekretion jedoch mit Brefeldin A blockiert. Die Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  wurden zur Identifizierung einer Antigen-spezifischen Aktivierung von CD4 T Zellen herangezogen. Abb. 2 zeigt charakteristische Dotplots eines immungesunden Probanden nach Stimulation seiner T Zellen mit Lösungsmittel (linke Spalte), Tuberkulin (mittlere Spalte) und ESAT-6 (rechte Spalte). Die Expression von IFN $\gamma$  ist in der oberen und die von TNF $\alpha$  in der unteren Reihe dargestellt. Es wurden jeweils alle CD4 T Zellen eines Stimulationsansatzes bezüglich ihrer Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 auf der Zelloberfläche sowie ihrer intrazellulären Akkumulation von Zytokinen analysiert. Spezifisch aktivierte T Zellen sind doppelt positiv, sie finden sich im rechten oberen Quadranten eines jeden Dotplots; der Anteil dieser Zellen an der Gesamtheit der CD4 T Zellen einer Probe ist in Prozent angegeben und wird im Folgenden als Frequenz Antigen-spezifischer T Zellen bezeichnet. Die Stimulation mit dem Lösungsmittel von Tuberkulin dient dem Ausschluss einer unspezifischen Aktivierung von T Zellen *in vitro*, hier ermittelte Frequenzen werden in allen Versuchsreihen dieser Arbeit von den jeweiligen Antigen-spezifischen Frequenzen abgezogen.

Im gewählten Beispiel ließ sich in den beiden Stimulationsansätzen mit Lösungsmittel keine relevante Zytokinproduktion nachweisen. Im Stimulationsansatz mit Tuberkulin fanden sich 2,24% der CD4 T Zellen positiv für IFN $\gamma$  und 2,75% der CD4 T Zellen positiv für TNF $\alpha$ . Nach Stimulation mit ESAT-6 produzierten 0,95% der CD4 T Zellen IFN $\gamma$  und 1,02% der Zellen TNF $\alpha$ .



**Abb. 2:** *M. tuberculosis*-spezifische T Lymphozyten werden ex vivo mittels Durchflusszytometrie aus dem Vollblut eines Probanden nachgewiesen. Zur Quantifizierung wurden CD4-positive Lymphozyten bezüglich ihrer Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 und der Produktion der Zytokine IFN $\gamma$  (obere Reihe) und TNF $\alpha$  (untere Reihe) analysiert. In den Ansätzen mit Lösungsmittel (links) ist keine relevante Produktion von Zytokinen nachzuweisen, im Ansatz mit Tuberkulin (Mitte) sind 2,24% der CD4 T Zellen positiv für IFN $\gamma$  und 2,75% positiv für TNF $\alpha$ . Für ESAT-6 (rechts) ergab sich ein Anteil von 0,95% der CD4 T Zellen positiv für IFN $\gamma$  und 1,02% positiv für TNF $\alpha$ .

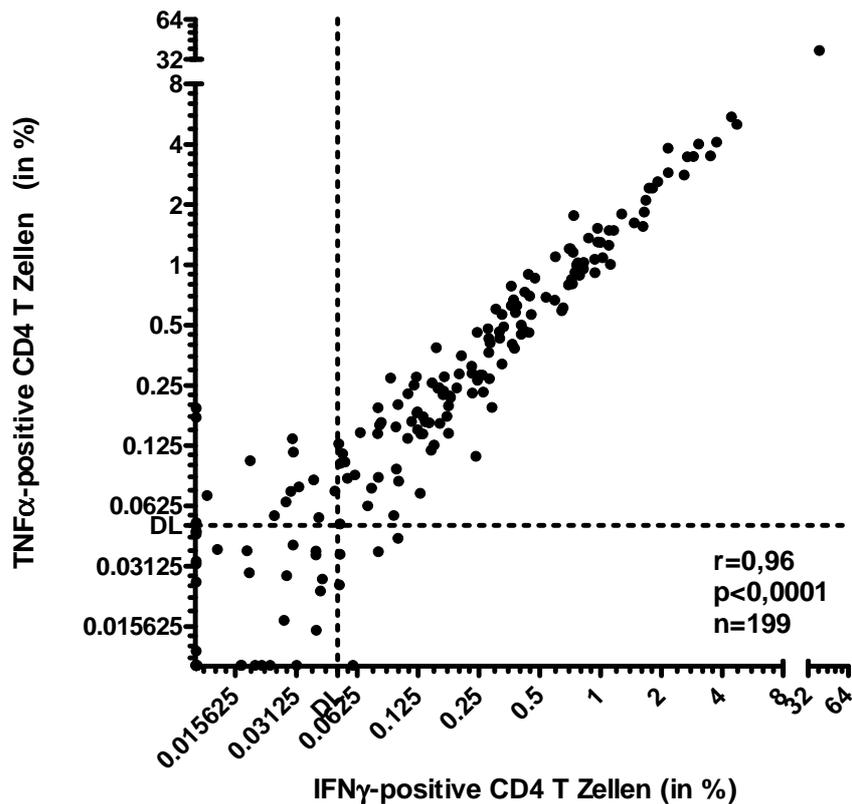
In Abb. 3 sind Dotplots eines immungesunden Probanden gezeigt, bei dem sich keine *M. tuberculosis*-spezifischen T Lymphozyten nachweisen lassen. Die ermittelten Frequenzen für Tuberkulin und ESAT-6 lagen unterhalb der Nachweisgrenze von 0,05% Zytokin-positiver CD4 T Zellen. Im gewählten Beispiel wurden Stimulationsansätze mit Staphylokokken Enterotoxin B (*SEB*) stimuliert, hier zeigt sich eine Frequenz von 5,20% IFN $\gamma$ -positiven und 12,20% TNF $\alpha$ -positiven CD4 T Zellen. Diese Positivkontrolle dient dem Nachweis von stimulationsfähigen T Zellen in der Probe und damit dem Ausschluss eines Versagens der Stimulation in vitro.



**Abb. 3:** Durchflusszytometrische Analyse eines Probanden, bei dem die Frequenz *M. tuberculosis*-spezifischer T Zellen unterhalb der Nachweisgrenze von 0,05% lag. Sowohl die Lösungsmittelkontrolle als auch die *M. tuberculosis*-spezifischen Antigene induzierten keine relevante Zytokinproduktion (<0,05%). Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) wurde als Positivkontrolle eingesetzt, 5,20% der CD4 T Zellen zeigten hier eine Produktion von IFN $\gamma$ , und 12,20% der Zellen eine Produktion von TNF $\alpha$ . Zur Bestimmung der Frequenz reaktiver CD4 T Zellen wurde die Reaktivität in der Lösungsmittelkontrolle stets von der der spezifischen Stimulation subtrahiert.

#### 4.2 Die Produktion von IFN $\gamma$ und TNF $\alpha$ durch Antigen-spezifische Stimulation ist intraindividuell vergleichbar

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  parallel aus jedem Stimulationsansatz analysiert, um die Frage zu beantworten, ob in Stimulationen mit mycobacteriellen Antigenen beide Zytokine in gleichem Maße nachweisbar sind. 199 Messungen wurden analysiert, bei denen nach Stimulation mit Tuberkulin sowohl die Produktion von IFN $\gamma$  als auch die von TNF $\alpha$  quantifiziert wurde. Abb. 4 zeigt eine hochsignifikante Korrelation der Frequenzen für IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  (n=199; r nach Spearman = 0,96; p<0,0001). Wenngleich TNF $\alpha$  von einem größeren Anteil der T Zellen (circa 1,65fach im Vergleich zu IFN $\gamma$ , Daten nicht gezeigt) produziert wird, können beide Zytokine als repräsentativer Parameter für die Aktivierung von T Zellen durch Antigene des *M. tuberculosis* verwendet werden.

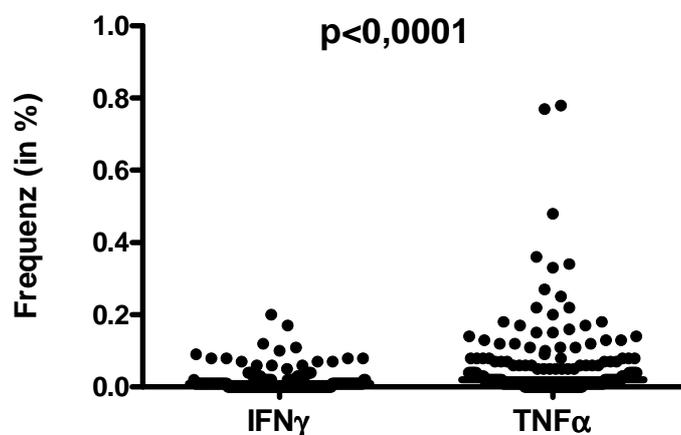


**Abb. 4:** Frequenzen Tuberkulin-spezifischer CD4 T Zellen positiv für IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Ermittelte Frequenzen aus jeweils dem gleichen Stimulationsansatz zeigen eine hochsignifikante Korrelation. (DL = detection limit von 0,05%; r nach Spearman =0,96; p<0,0001; n=199). Die Abbildung zeigt die logarithmische Darstellung der prozentualen Werte.

Ziel des Assays ist die Aussage, ob ein Proband Antigen-spezifische T Zellen gegen mycobacterielle Antigene aufweist. Diese Daten zeigen, dass eine parallele Bestimmung beider Zytokine keinerlei zusätzliche Information liefert, die für die Aussage des Assays relevant wäre.

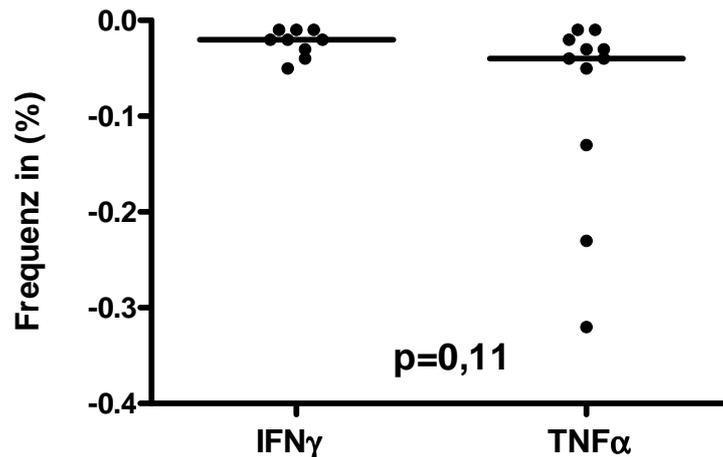
Da die Induktion der beiden Zytokine in Antigenstimulationen intraindividuell vergleichbar ist, soll im Folgenden die Spezifität der beiden Zytokine anhand der Negativkontrolle betrachtet werden. Als Negativkontrolle wurden Stimulationen mit dem Lösungsmittel des Tuberkulins durchgeführt. Dieses enthält kein Protein und sollte daher keinerlei Zytokine induzieren. In geringem Umfang werden jedoch auch in der Negativkontrolle Zytokin-positive Zellen nachgewiesen, die als unspezifische Aktivierungen von Zellen in vitro zu werten sind und im Folgenden als Hintergrundaktivität bezeichnet werden. Es soll nun ermittelt werden, ob eines der beiden Zytokine eine geringere Hintergrundaktivität aufweist und damit den spezifischeren Parameter für die Tuberkulin-spezifische Aktivierung von T Zellen darstellen könnte. Die Negativkontrollen der 199 zuvor betrachteten Probanden

wurden bezüglich ihrer Induktion der Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  verglichen (Abb. 5). Es konnten in 113 Messungen IFN $\gamma$ -positive CD4 T Zellen und in 151 Messungen TNF $\alpha$ -positive CD4 T Zellen detektiert werden. Der Median der Messungen für TNF $\alpha$  ist mit 0,02% höher als jener für IFN $\gamma$  mit 0,01%; der maximal erreichte Wert lag in den Messungen für IFN $\gamma$  bei 0,2% und in jenen für TNF $\alpha$  bei 0,78%. Median und maximal erreichter Wert von 0,02% für IFN $\gamma$  lag unterhalb des Grenzwertes von 0,05%. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zytokinen wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben ermittelt ( $p < 0,0001$ ; Konfidenz-Intervall 95%).



**Abb. 5:** 199 Stimulationen mit Lösungsmittel als Negativkontrolle. 113 Messungen zeigten eine unspezifische Induktion von IFN $\gamma$  und 151 Messungen eine Induktion von TNF $\alpha$ . Der Median der IFN $\gamma$ -Induktion lag bei 0,01%, der Maximalwert bei 0,2%; der Median der TNF $\alpha$ -Induktion lag bei 0,02%, der Maximalwert hingegen bei 0,78% ( $p < 0,0001$ , Mann-Whitney-U-Test, Konfidenz-Intervall 95%).

Regelhaft wurde in allen Auswertungen dieser Arbeit die ermittelte Frequenz der Negativkontrolle von denen der Antigenstimulation subtrahiert, um eine unspezifische Aktivierung von T Zellen in vitro auszuschließen. Zeigte sich die Frequenz Zytokin-positiver Zellen in der Negativkontrolle größer als in der Antigenstimulation, ergab sich hierbei ein negativer Wert. Bei den 199 analysierten Probanden ergaben sich bei neun Messungen für IFN $\gamma$  und bei elf Messungen für TNF $\alpha$  negative Werte nach Abzug der Frequenzen aus Negativkontrollen (Abb. 6), hier konnte jedoch mittels dem Mann-Whitney-U-Test kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zytokinen dargestellt werden ( $p = 0,11$ ; Konfidenz-Intervall 95%).



**Abb. 6:** Nach Abzug der Frequenzen Zytokin-positiver Zellen der Negativkontrollen von denen des Ansatzes mit Tuberkulin ergaben sich bei neun IFN $\gamma$ - und elf TNF $\alpha$ -Messungen negative Werte. Hier sind die Messwerte der Negativkontrolle höher als die der Stimulationen mit Antigen. Diese Werte sind sicher als unspezifische Aktivierung zu werten. Dargestellt sind die prozentualen Messwerte sowie der Median, eine statistische Signifikanz konnte mittels Mann-Whitney-U-Test nicht erreicht werden ( $p=0,11$ , Konfidenz-Intervall 95%).

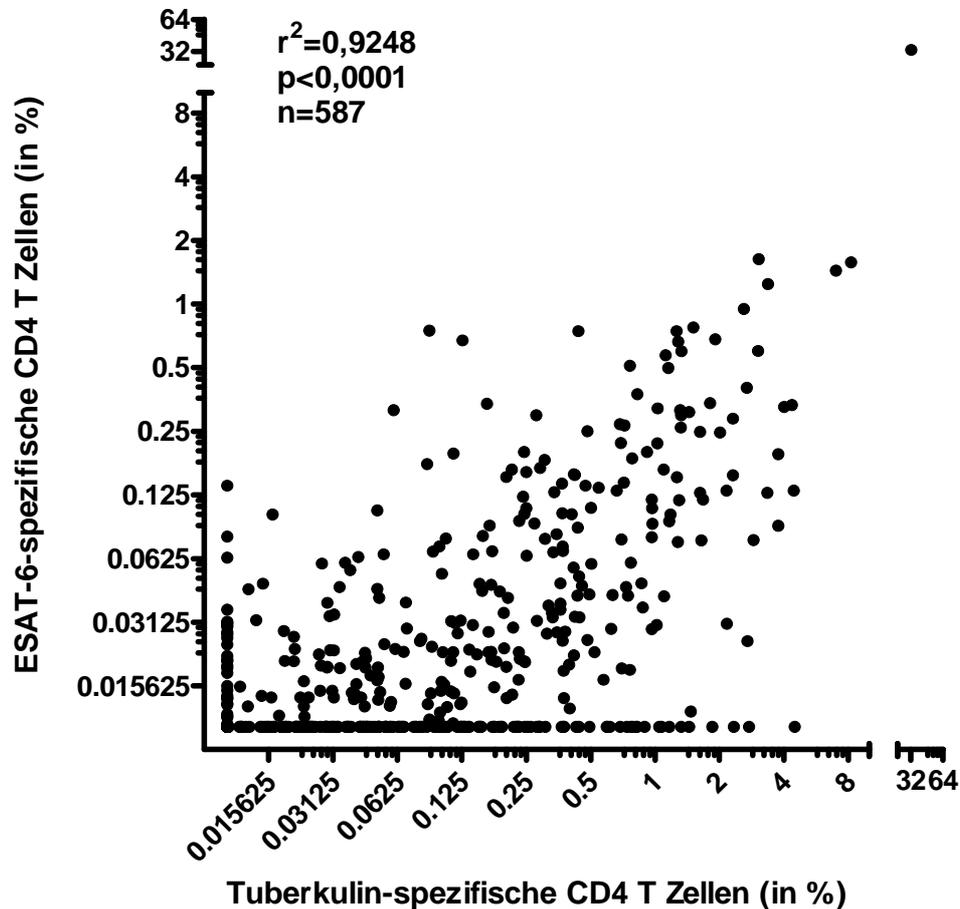
Diese Ergebnisse zeigen, dass die beiden Read-out-Parameter für Antigen-spezifische T Zellaktivierung IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  vergleichbare Ergebnisse zeigen. In dem Vergleich der Negativkontrollen ist ein minimaler Unterschied zwischen beiden Zytokinen zu sehen, der auf eine gering erhöhte Spezifität von IFN $\gamma$  im Vergleich zu TNF $\alpha$  hinweist. Im weiteren Verlauf der Studie wurde auf den Nachweis von TNF $\alpha$  verzichtet und die Produktion von IFN $\gamma$  als Surrogatparameter zur Quantifizierung Antigen-spezifischer T Zellen gegen die getesteten Antigene herangezogen.

#### 4.3 Frequenzen Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischer CD4 T Zellen zeigen eine hochsignifikante Korrelation

Im Falle einer stattgehabten Infektion eines Probanden mit *M. tuberculosis* ist davon auszugehen, dass sein Immunsystem sowohl Tuberkulin als auch ESAT-6 erkennt, und beide Antigene eine Zytokinproduktion in T Zellen induzieren.

Es stellte sich nun die Frage, in welchem Zusammenhang die gemessenen Reaktivitäten gegen beide Antigene intraindividuell stehen. Hierzu wurden die Frequenzen IFN $\gamma$ -positiver CD4 T Zellen nach Stimulation mit Tuberkulin und ESAT-6 aus 587 Messungen verglichen. Daten von insgesamt 528 Probanden flossen in diese Auswertung ein, 40 Probanden wurden zweifach, fünf Probanden dreifach und drei Probanden vierfach analysiert. Durchflusszytometrische Messungen für 462

Datensätze wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, 125 Datensätze von 125 immungesunden Probanden stammen aus der Datenbank der Arbeitsgruppe, sie wurden vor dieser Studie gemessen und retrospektiv in diese Analyse eingeschlossen.



**Abb. 7:** IFN $\gamma$ -positive CD4 T Zellen nach Stimulation mit Tuberkulin- und ESAT-6. Dargestellt sind die durchflusszytometrischen Frequenzen Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischer CD4 T Zellen in Prozent aus 587 Stimulationen von 528 Probanden. Es findet sich eine hochsignifikante Korrelation ( $n=587$ ;  $r^2=0,9248$ ;  $p<0,0001$ ). Darstellung in logarithmischer Achseneinteilung.

302 Probanden (57,2%) zeigten eine Frequenz Tuberkulin-spezifischer T Zellen über der Nachweisgrenze von 0,05% (Median 0,2579%, Range: >0,05%-38,98%), während die Frequenz ESAT-6-spezifischer T Zellen bei 115 Probanden (21,78%) über der Nachweisgrenze lagen (Median: 0,1383%, Range: >0,05%-41,57%). Von 302 Probanden mit nachgewiesenen Tuberkulin-spezifischen Zellen zeigten 107 Probanden (35,43%) ESAT-6-spezifische Zellen oberhalb der Nachweisgrenze (Median: 0,1518%, Range: >0,05-41,57%).

Es zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation ( $r^2=0,9248$ ;  $p<0,0001$ ;  $n=587$ ) zwischen den Frequenzen Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischer CD4 T Zellen (Abb.

7). Der Befund eines Probanden mit einer Frequenz von nahezu 40% Antigen-spezifischer T Zellen gegen Tuberkulin und ESAT-6. wird in einem späteren Teil dieser Arbeit detailliert beschrieben (siehe 4.9).

#### **4.4 Die Frequenzen spezifischer CD4 T Zellen korrelieren mit dem *TST* und zeigen eine höhere Sensitivität und Spezifität**

Die Induration des *TST* entsteht durch intrakutane Zytokinproduktion aus Antigen-spezifischen T Zellen nach Inokulation von Tuberkulin und der daraus resultierenden Migration weiterer immunkompetenter Zellen. Der durchflusszytometrische Assay beruht auf dem gleichen biologischen Prinzip, einer durch Antigenpräsentation in vitro hervorgerufenen Produktion von Zytokinen in spezifischen T Zellen.

Es wurde im Folgenden überprüft, ob die Induration im *TST* mit der Antigen-spezifischen Induktion von Zytokinen in vitro korreliert. Ausgewertet wurden alle durchflusszytometrischen Messungen der Antigen-spezifischen CD4 T Zellreaktivität gegen Tuberkulin und ESAT-6, zu denen ein zeitnahes Ergebnis des *TST* vorlag. Bei einigen Probanden fanden sich mehrere durchflusszytometrische Messungen (siehe 4.3). Wenn diese innerhalb einer Zeitspanne von jeweils höchstens zwei Monaten zum *TST* lagen, wurden beide Messwerte mit dem *TST* korreliert. Lagen *TST* und durchflusszytometrische Messung länger als zwei Monate auseinander oder zeigte sich eine Konversion in einer der beiden Untersuchungen, wurden diese Werte ausgeschlossen. Insgesamt wurden 315 durchflusszytometrische Messungen Antigen-spezifischer T Zellen gegen Tuberkulin und 290 Messungen gegen ESAT-6 mit Indurationen in *TST* (n=315) korreliert. 241 Datensätze für *TST* und durchflusszytometrischer Messung wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt. 74 Datensätze stammen von vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe, sie sind der Datenbank der Arbeitsgruppe entnommen und wurden in diese Auswertung eingeschlossen, 25 Messungen davon wurden durchgeführt, als das Antigen ESAT-6 noch nicht zur Verfügung stand. Bei diesen wurde das *TST*-Ergebnis lediglich mit der Frequenz Tuberkulin-spezifischer T Zellen korreliert. Die Vierfelder-Tafeln in Tabelle 6 geben eine Übersicht über die Ergebnisse des *TST* und der durchflusszytometrischen Analyse Antigen-spezifischer T Zellen. Anhand des Grenzwertes von 5 Millimetern Induration waren 137 von 315 *TST* (43,49%) positiv

(Median: 15 Millimeter Induration, Range:5-50 Millimeter). Der Vergleich des *TST* mit den Frequenzen Tuberkulin-spezifischer T Zellen ergibt für 126 Probanden (40%) ein übereinstimmend positives Ergebnis, für 109 Probanden (34,6%) ein übereinstimmend negatives Ergebnis. 91,97% der 137 Probanden mit positiven *TST* zeigten auch Tuberkulin-spezifische T Zellen oberhalb der Nachweisgrenze. Betrachtet man die 178 Probanden mit negativen *TST*, von denen immerhin 69 (38,76%; 21,9% aller Probanden) Tuberkulin-spezifische T Zellen in vitro haben, so spricht dies für eine höhere Sensitivität der Durchflusszytometrie im Nachweis einer Immunität gegen Tuberkulin beim Immungesunden. Elf Probanden (3,49%) zeigten einen positiven *TST*, Frequenzen Tuberkulin-spezifischer T Zellen blieben jedoch unter der Nachweisgrenze. Von diesen elf zeigten sechs Probanden nur einen grenzwertig positiven *TST* (fünf Probanden fünf, und ein Proband sechs Millimetern Induration), lediglich drei Probanden waren hoch-positiv mit 22, 25 und 27 Millimetern Induration.

Von den grenzwertigen *TST* hatten drei Probanden keinerlei Tuberkulin-spezifische T Zellen, alle anderen zeigten Frequenzen zwischen 0,006 und 0,044%, die drei hochpositiven *TST* zeigten Frequenzen von 0,019%, 0,021% und 0,029%.

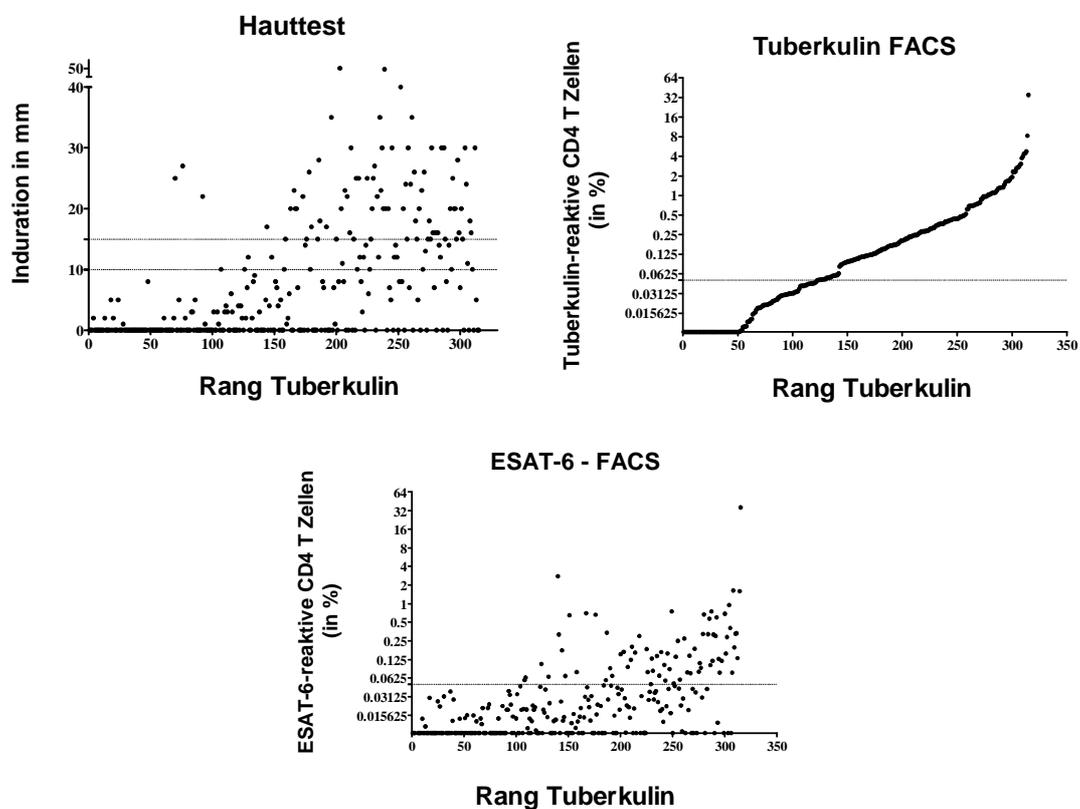
**Tabelle 6:** Ergebnisse des *TST* im Vergleich zu den Frequenzen Antigen-spezifischer T Zellen

<b>Tuberkulin versus <i>TST</i></b>	<b><i>TST</i> positiv (137; 43,49%)</b>	<b><i>TST</i> negativ (178; 56,51%)</b>	<b>Gesamt (315; 100%)</b>
Tuberkulin durchflusszytometrisch <b>positiv</b>	126 (40%)	69 (21,9%)	195
Tuberkulin durchflusszytometrisch <b>negativ</b>	11 (3,49%)	109 (34,6%)	120
<b>ESAT-6 versus <i>TST</i></b>	<b><i>TST</i> positiv (124; 42,76%)</b>	<b><i>TST</i> negativ (166; 57,24%)</b>	<b>Gesamt (290; 100%)</b>
ESAT-6 durchflusszytometrisch <b>positiv</b>	61 (21,03%)	16 (5,52%)	77
ESAT-6 durchflusszytometrisch <b>negativ</b>	63 (21,72%)	150 (51,72%)	213

Im Vergleich der *TST* mit den Frequenzen ESAT-6-spezifischer T Zellen bei 290 Probanden zeigten 61 Probanden (21,03%) ein übereinstimmend positives, und 150 Probanden (51,72%) ein übereinstimmend negatives Ergebnis in beiden Tests. Bei 63 von 124 Probanden (50,81%; 21,72% aller Probanden) mit positivem *TST* waren

keine ESAT-6-spezifische Zellen nachweisbar. Dies entspricht der höheren Spezifität des Antigens ESAT-6 für *M. tuberculosis* im Vergleich zum Tuberkulin des *TST*. Bei 16 von 166 Probanden (9,64%; 5,52% aller Probanden) mit negativem *TST* waren ESAT-6-spezifische T Zellen nachweisbar. Diese Daten sprechen möglicherweise für eine höhere Sensitivität des durchflusszytometrischen Nachweises ESAT-6-spezifischer Zellen für die Diagnostik einer latenten Infektion mit *M. tuberculosis* im Vergleich zum *TST*. Bei zwei der hoch-positiven *TST* mit negativer durchflusszytometrischer Analyse Tuberkulin-spezifischer Zellen fanden sich Frequenzen ESAT-6-spezifischer Zellen von 0,029% und 0,018%.

Die Korrelation der Indurationen im *TST* mit den Frequenzen Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischer CD4 T Zellen ist in Abb. 8 dargestellt.



**Abb. 8:** Korrelation der Induration im *TST* mit den Frequenzen Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischer CD4 T Zellen. Die Daten sind nach aufsteigender Frequenz gegen Tuberkulin sortiert, durchnummeriert und als Rangvergleich in drei einzelnen Graphen dargestellt. Für die Ergebnisse des *TST* zeigt sich eine hochsignifikante Korrelation sowohl zu den Frequenzen Tuberkulin-spezifischer T Zellen ( $n=315$ ,  $r=0,59$ ,  $p<0,0001$ ) als auch zu den Frequenzen ESAT-6-spezifischer T Zellen (für ESAT-6 und Induration:  $n=290$ ,  $r=0,49$ ,  $p<0,0001$ ). Die etablierten Grenzwerte der Hauttest-Induration und T Zellen sind als Linien eingezeichnet.

Es zeigten sich eine hochsignifikante Korrelationen der Indurationen des *TST* sowohl mit den Frequenzen Tuberkulin-spezifischer T Zellen ( $n=315$ ;  $r$  nach Spearman

=0,59;  $p < 0,0001$ ;) als auch mit denen ESAT-6-spezifischer T Zellen ( $n=290$ ;  $r$  nach Spearman =0,49;  $p < 0,0001$ ). Zur Darstellung der Korrelation bei dieser sehr hohen Anzahl Datensätze wurden die Frequenzen Tuberkulin-spezifischer CD4 T Zellen aufsteigend sortiert, durchnummeriert und die Werte für TST und Frequenz ESAT-6-spezifischer T Zellen als Rangvergleich in drei Graphen dargestellt.

#### **4.5 Expression von CD27 auf *M. tuberculosis*-spezifischen T Zellen**

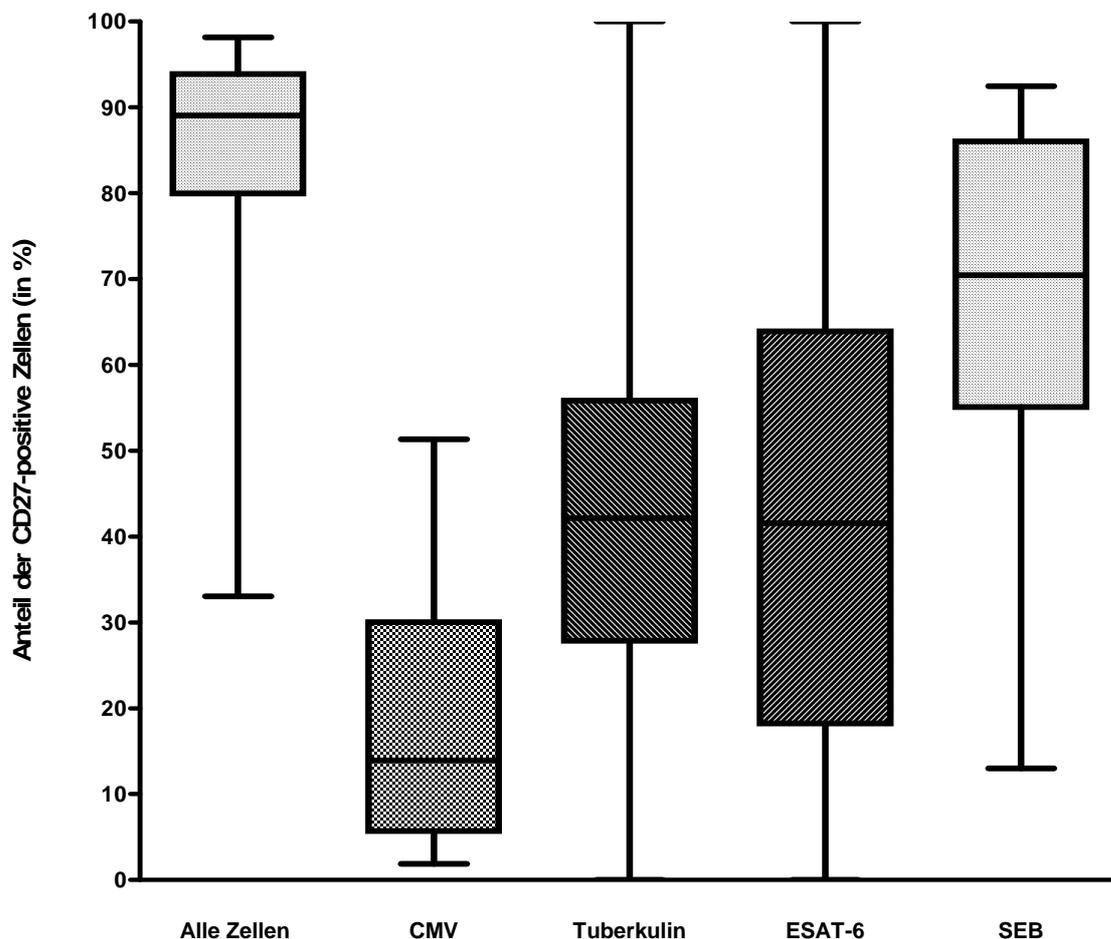
Der Oberflächenmarker CD27 wird auf kürzlich aktivierten Antigen-spezifischen T Zellen exprimiert und geht bei terminal differenzierten Effektor-Zellen wieder verloren. Seine Expression auf Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischen Zellen soll im Folgenden betrachtet werden und mit der von CMV-spezifischen und SEB-reaktiven Zellen verglichen werden.

4.5.1 Tuberkulin- und ESAT-6-spezifische CD4 T Zellen unterscheiden sich bezüglich ihrer CD27-Expression von CMV-spezifischen CD4 T Zellen

Die CD27-Expression auf *M. tuberculosis*-spezifischen CD4 T Zellen wurde im Vergleich mit 17 positiven Messungen CMV-spezifischer CD4 T Zellen sowie 31 Messungen SEB-reaktiver CD4 T Zellen durchgeführt. Verwendet wurden Messungen mit einer Reaktivität oberhalb der Nachweisgrenze ( $>0,05\%$  aller CD4 T Zellen positiv für IFN $\gamma$ ), ausgeschlossen wurden Messungen mit weniger als 5.000 detektierten CD4 T Zellen pro Stimulationsansatz und solche, die weniger als 15 IFN $\gamma$ -positive Zellen enthielten, da bei einer geringeren Gesamtzellzahl nicht valide zwischen CD27-positiven und CD27-negativen T Zell-Populationen unterschieden werden kann.

Berechnet wurde der Anteil CD27-positiver Zellen an allen IFN $\gamma$ -positiven und damit Antigen-spezifischen T Zellen eines Probanden. Zur Bestimmung der Anteile CD27-positiver Zellen an allen CD4 T Zellen eines Probanden wurden die Werte aller Zellen aus den Messungen Tuberkulin-spezifischer T Zellen und deren Negativkontrollen gemittelt. In Abb. 9 ist der Anteil CD27-positiver Zellen an allen CD4 T Zellen der Probanden, sowie der an CD4 T Zellen mit Spezifität gegen verschiedene Antigene in Prozent dargestellt.

Betrachtet man alle CD4 T Zellen der Probanden unabhängig von ihrer Antigenspezifität, so zeigt sich ein sehr hohen Anteil CD27-positiver Zellen (n=256, Median: 89,02%; 25-75% Quartile: 79,96-93,86%). CD4 T Zellen mit Spezifität gegen *CMV* sind zu einem geringen Anteil CD27-positiv (n=17; Median: 13,92%; 25-75% Quartile: 5,7-30,03%).



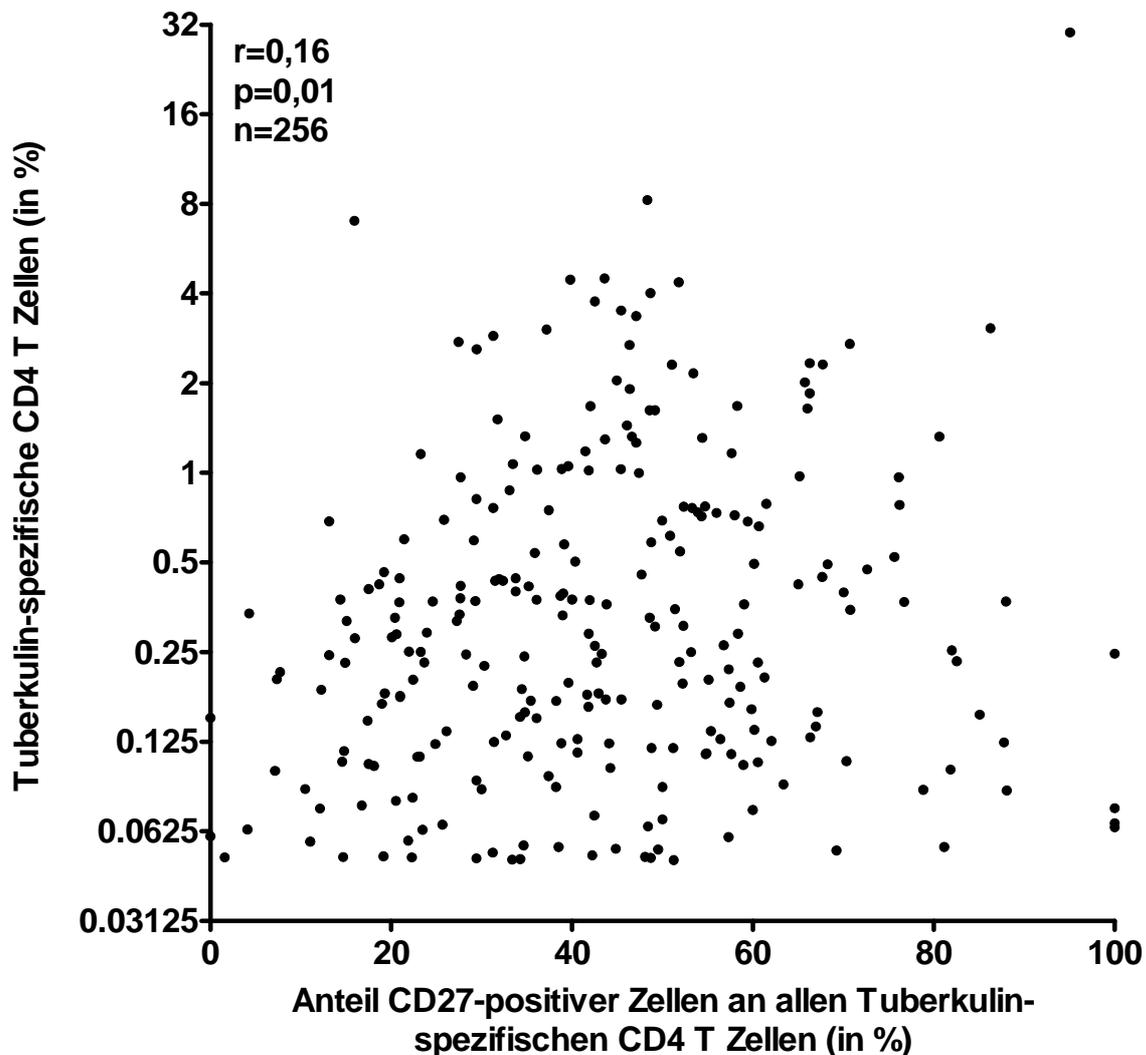
**Abb. 9:** Anteile CD27-positiver Zellen an CD4 T Zellen unterschiedlicher Antigenspezifität in Prozent (Boxplot mit Median, 25- und 75%-Quartilen sowie höchstem und niedrigstem Wert). Die Mehrheit der Gesamtpopulation aller CD4 T Zellen der Probanden sind CD27-positiv (Alle Zellen, n=256, Median: 89,02%; 25-75% Quartile: 79,96-93,86%). Unter *CMV*-spezifische Zellen ist ein wesentlich geringerer Anteil CD27-positiv (*CMV*, n=17, Median: 13,92%; 25-75% Quartile: 5,7-30,03%). Der Anteil an CD27-positiven Zellen an Tuberkulin-spezifischen Zellen (n=256, Median: 42,15%; 25-75% Quartile: 27,84-55,83%) ist mit dem ESAT-6-spezifischer Zellen (n=143, Median: 41,55%; 25-75% Quartile: 18,22-63,88%) nahezu gleich, und ist höher im Vergleich zu *CMV*-spezifischen Zellen. SEB-reaktive Zellen haben einen im Vergleich mit Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischen Zellen noch höheren Anteil CD27-positiver Zellen (SEB, n=31, Median 70,45%; 25-75% Quartile: 55,08-86,08%).

Demgegenüber sind spezifische T Zellen gegen Antigene des *M. tuberculosis* zu einem höheren Anteil CD27-positiv (Tuberkulin-spezifische Zellen: n=256; Median: 42,15%; 25-75% Quartile: 27,84-55,83%; ESAT-6-spezifische Zellen: n=143; Median: 41,55%; 25-75%; Quartile: 18,22-63,88%), wenngleich eine große interindividuelle

Streuung vorliegt. Der Anteil CD27-positiver Zellen unter den *SEB*-reaktiven Zellen liegt höher im Vergleich zu den anderen Antigenen (n=31; Median: 70,45%; 25-75%; Quartile: 55,08-86,08%).

4.5.2 Der Anteil CD27-positiver Zellen unter Tuberkulin-spezifischen T Zellen zeigt eine sehr geringe Korrelation mit deren Frequenz

Es stellt sich die Frage, inwieweit die quantitative Ausprägung der Immunantwort gegen Antigene der *M. tuberculosis* in Zusammenhang mit dem Reifegrad der betreffenden Zellen steht. Hierzu wurden die Frequenzen Tuberkulin-spezifischer T Zellen mit dem jeweiligen Anteil CD27-positiver Zellen verglichen. Die Daten der Messungen Tuberkulin-spezifischer T Zellen aus 4.5.1 (n=256) wurden analysiert und sind in Abb. 10 dargestellt.



**Abb. 10:** Schwache Korrelation zwischen Frequenz Tuberkulin-spezifischer T Zellen und dem Anteil CD27-positiver Zellen an allen Tuberkulin-spezifischen Zellen (n=256; r nach Spearman=0,16; p=0,01).

Es findet sich eine sehr schwache Korrelation ( $n=256$ ,  $r$  nach Spearman= $0,16$ ;  $p=0,01$ ) zwischen der Frequenz Tuberkulin-spezifischer CD4 T Zellen und dem jeweiligen Anteil CD27-positiver Zellen an den Tuberkulin-spezifischen Zellen.

#### 4.5.3 Die Induration im *TST* korreliert nicht mit der Expression von CD27 auf Tuberkulin-spezifischen T Zellen

Mit der Fragestellung, ob die Induration im *TST* mit dem Reifegrad der Tuberkulin-spezifischen Zellen korreliert, wurden die durchflusszytometrischen Messungen von 155 Probanden bezüglich der CD27-Expression ausgewertet und mit der jeweiligen Induration im *TST* verglichen.

Die Induration im *TST* zeigt keine signifikante Korrelation mit dem Anteil CD27-positiver T Zellen unter den Tuberkulin-spezifischen CD4 T Zellen ( $n=155$ ,  $r$  nach Spearman= $-0,007$ ;  $p=0,93$ ; Daten nicht gezeigt).

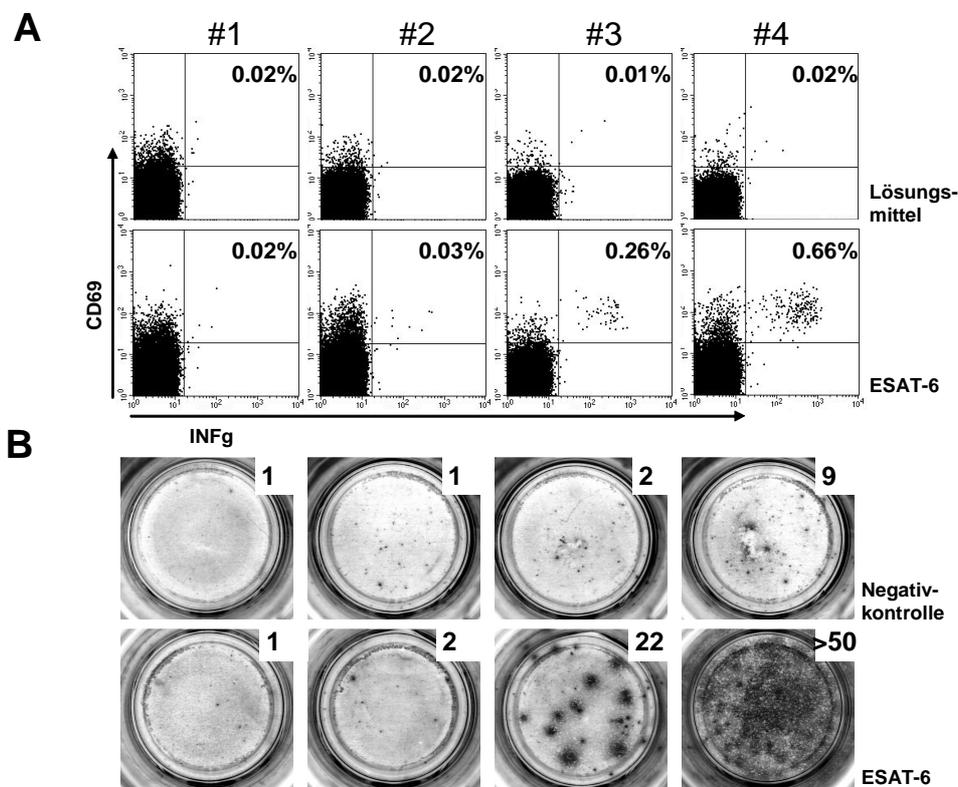
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit CD27 als Marker für die Reife von Lymphozyten eine unterschiedliche phänotypische Zusammensetzung der spezifischen Zellen gegen Antigene von *M. tuberculosis* und *CMV* dargestellt werden kann. Die T-zelluläre Immunantwort gegen Antigene des *M. tuberculosis* besteht zu einem größeren Teil aus kürzlich aktivierten Zellen als die spezifische Immunantwort gegen *CMV*. Diese besteht zu einem größeren Anteil aus differenzierten Effektor-Zellen. Der Reifegrad von Tuberkulin-spezifischen T Zellen zeigt nur eine sehr geringe Korrelation mit der quantitativen Ausprägung der Immunantwort und steht nicht im Zusammenhang mit der Induration im *TST*.

#### 4.6 Durchflusszytometrische Analyse und EliSpot® zeigen vergleichbare Ergebnisse

Mit dem EliSpot® steht ein Assay zum Nachweis von Antigen-spezifischen T Zellen zur Verfügung, der auf einem ähnlichen biologischen Prinzip beruht wie die Durchflusszytometrie. Die Produktion von Zytokinen erfolgt ebenfalls nach Stimulation mit Antigenen *in vitro*, in diesem Fall ESAT-6 und CFP-10. Die Zytokine werden jedoch nicht nach Sekretionsblockade zellgebunden dargestellt, sondern ihre Sekretion erfolgt in ein mit IFN $\gamma$ -spezifischen Antikörpern beschichtetes Well. Nach Auswaschen der Zellen und entsprechender Färbung mit Sekundärantikörpern ist

IFN $\gamma$  als Spot darstellbar, jeder dieser Spots entspricht einer IFN $\gamma$ -sezernierenden Zelle.

In einer Subgruppe von 21 Probanden (medianes Alter 66,3 Jahre) wurden parallel eine Quantifizierung ESAT-6-spezifischer T Zellen mittels Durchflusszytometrie und EliSpot<sup>®</sup> durchgeführt. Die durchflusszytometrische Bestimmung erfolgte wie in den vorangehenden Untersuchungen direkt aus Vollblut, für den EliSpot<sup>®</sup> wurden *PBMC* mittels Ficoll aus der gleichen Blutprobe isoliert und in einer Zellzahl von 200.000 Zellen pro Stimulationsansatz eingesetzt (siehe 3.9). In Abb. 11 sind die Ergebnisse von vier repräsentativen Probanden dargestellt.



**Abb. 11:** Vergleich der ESAT-6-spezifischen T Zellen, analysiert mittels durchflusszytometrischem Assay (A) und EliSpot<sup>®</sup> (B), jeweils mit Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse von vier repräsentativen Probanden (# 1-4). Die Prozentzahlen in (A) repräsentieren die Frequenzen ESAT-6-spezifischer CD4 T Zellen und die Zahlen in (B) die Anzahl der IFN $\gamma$ -positiven Spots eines jeden Wells. Proband #1 und 2 liegen in beiden Assays unterhalb der jeweils etablierten Nachweisgrenzen. Mit zunehmender Reaktivität (#3 und 4) in der Durchflusszytometrie steigt die Anzahl IFN $\gamma$ -positiver Spots im EliSpot<sup>®</sup>.

Zwei Probanden (#1 und 2) mit ESAT-6-spezifischen CD4 T Zellen unterhalb der Nachweisgrenze von 0,05% im durchflusszytometrischen Assay zeigen im EliSpot<sup>®</sup> ebenfalls eine Reaktivität unterhalb der etablierten Nachweisgrenze von 5 Spots pro 200.000 *PBMC*. Proband #3 reagiert mit 0,25% seiner CD4 T Zellen spezifisch



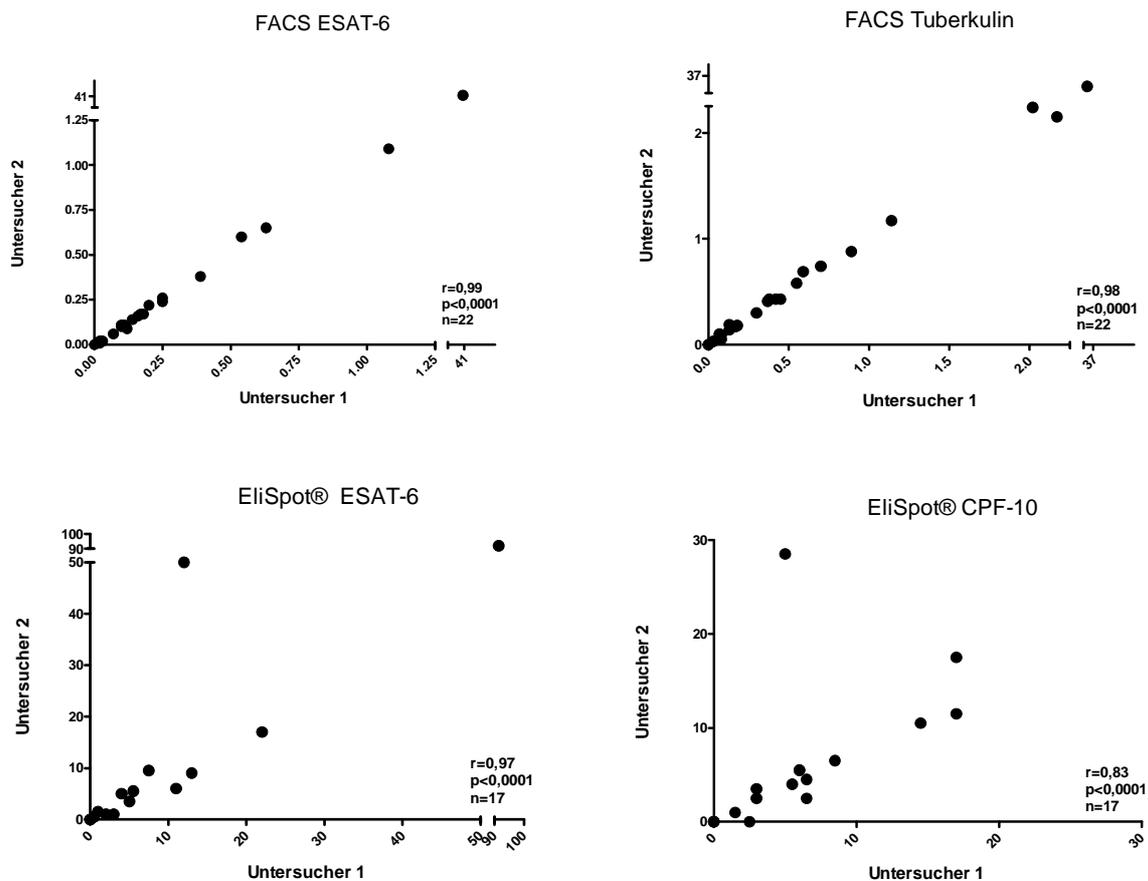
Verfügung. Diese Daten zeigen eine Korrelation mit den durchflusszytometrisch ermittelten Frequenzen ESAT-6-spezifischer Zellen (Abb. 12;  $n=19$ ,  $r$  nach Spearman  $=0,55$ ,  $p=0,01$ ).

Im EliSpot<sup>®</sup> werden wie in 3.9.1 beschrieben zum einen in jedem Well 200.000 *PBMC* nach Isolation eingesetzt, und zum anderen beziehen sich die Ergebnisse auf diese Gesamtzellzahl unabhängig von ihrem Zelltypus, also eine ermittelte Anzahl Zytokin-positiver Spots pro 200.000 *PBMC*. Im durchflusszytometrischen Assay erfolgt die Stimulation mit einer vorgegebenen Menge Vollblut, und die Frequenz Zytokin-positiver Zellen ist auf die Anzahl analysierter CD4 T Lymphozyten einer Probe bezogen. In einer neuerlichen Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde auf alle Lymphozyten gegatet, und damit auch CD4-negative Lymphozyten eingeschlossen und zusätzlich wurde die Frequenz Zytokin-positiver Zellen retrospektiv auf 200.000 Zellen hochgerechnet, um eine vergleichbare Bezugsgröße zwischen beiden Assays zu erhalten. Auch in diesem direkt auf dieselben Zellpopulationen angepassten Vergleich ergibt sich erwartungsgemäß eine Korrelation zwischen EliSpot<sup>®</sup>-Assay und durchflusszytometrischen Daten ( $n=21$ ;  $r$  nach Spearman  $=0,57$ ,  $p<0,01$ ; Daten nicht gezeigt).

#### **4.7 Vergleichbare Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von EliSpot<sup>®</sup> und Durchflusszytometrie nach unabhängiger Auswertung durch verschiedene Untersucher**

Anhand der Subgruppe von 21 Probanden, bei denen ein EliSpot<sup>®</sup> durchgeführt wurde (aus 4.6), sollen die Ergebnisse beider Assays bezüglich der Reproduzierbarkeit ihrer Auswertung untersucht werden. Zusätzlich wurde ein Datensatz durchflusszytometrischer Daten eines Probanden mit sehr hoher Frequenz Antigen-spezifischer T Zellen eingeschlossen, von 21 durchgeführten EliSpot<sup>®</sup> standen 19 lichtmikroskopisch zur Verfügung; zwei Probanden wurden ausgeschlossen, da hier kein CFP-10 analysiert wurde. Wie schon in 4.6 geschehen, wurden 17 EliSpot<sup>®</sup>-Messungen lichtmikroskopisch durch zwei Untersucher ausgewertet. Zwei in der Auswertung von durchflusszytometrischen Daten erfahrene Anwender haben die zugehörigen, durchflusszytometrisch gemessenen Daten unabhängig voneinander mittels der Software CellQuest ausgewertet. Die Daten sind

in Abb. 13 gezeigt. Für die durchflusszytometrischen Messungen zeigen die Ergebnisse der Auswertung zweier Untersucher jeweils eine hochsignifikante Korrelation mit einem  $r=0,99$  für das Antigen ESAT-6 und mit einem  $r=0,98$  für das Antigen Tuberkulin (jeweils  $n=22$ ;  $r$  nach Spearman;  $p<0,001$ ). Die Auszählungen der beiden Untersucher der ESAT-6 Ansätze im EliSpot<sup>®</sup> zeigt ebenfalls eine hochsignifikante Korrelation von  $r$  nach Spearman  $=0,97$ . Eine unwesentlich geringere Korrelation von  $r$  nach Spearman  $=0,83$  erzielten die Auswertungen beider Untersucher für CFP-10 im EliSpot<sup>®</sup> (jeweils  $n=17$ ;  $r$  nach Spearman;  $p<0,0001$ ).

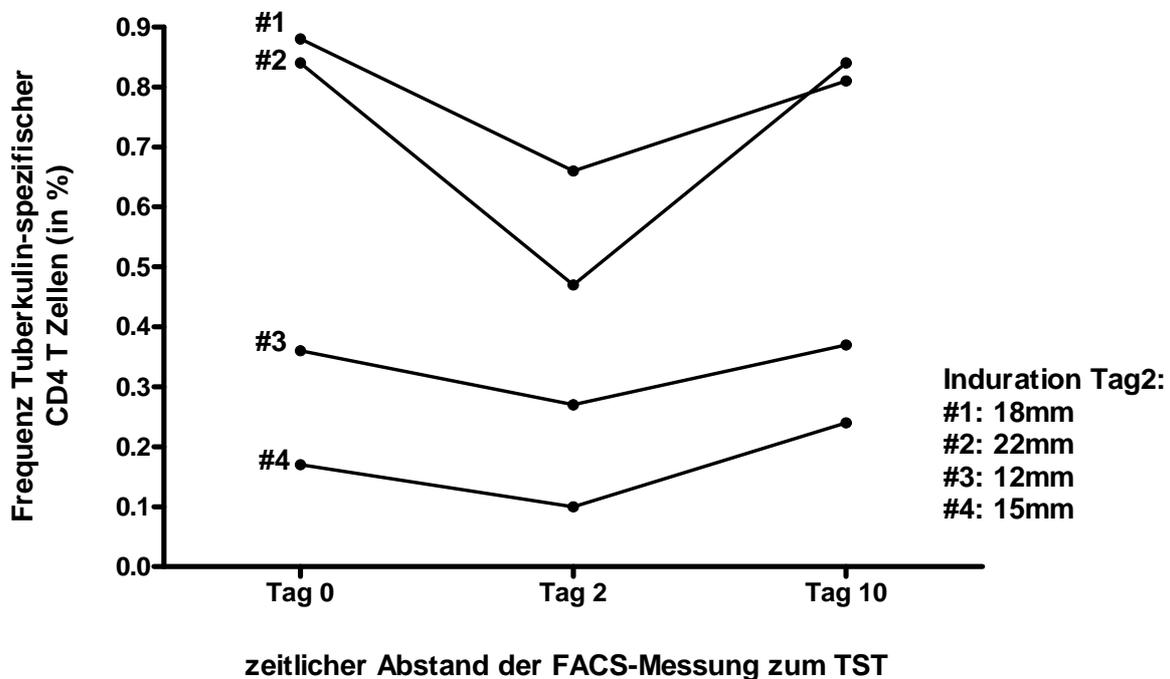


**Abb. 13:** Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei der Auswertung von Durchflusszytometrie und EliSpot<sup>®</sup> durch zwei unabhängige Auswerter. Beide Assays wurden mit 2 verschiedenen Antigenen (Durchflusszytometrie: Tuberkulin und ESAT-6, EliSpot<sup>®</sup>: ESAT-6 und CFP-10) durchgeführt und jeweils von zwei Untersuchern (R.R. und T.H. für FACS, U.S. und T.H. für EliSpot<sup>®</sup>) unabhängig voneinander ausgewertet. Alle Korrelationen waren hochsignifikant;  $n$ ,  $r$  nach Spearman und  $p$ -Werte sind jeweils angegeben.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen mittels CellQuest<sup>®</sup> als auch die lichtmikroskopische Auszählung der EliSpot<sup>®</sup>-Mikrotiterplatten unabhängig vom Experimentator reproduzierbare Ergebnisse zeigen.

#### 4.8 Im Verlauf eines positiven TST ist die Frequenz der zirkulierenden reaktiven T Zellen vermindert

Der TST stellt eine lokale Entzündungsreaktion in der Haut dar, bei der Antigen-spezifische T Zellen in das Gebiet um die Injektion einwandern und eine charakteristische Induration hervorrufen. Bei der durchflusszytometrischen ex-vivo Analyse wird der Anteil der in Zirkulation befindlichen T Zellen gemessen. Es stellt sich die Frage, ob während einer relevanten Induration eine Abwanderung von T Zellen aus der Blutzirkulation in die Haut quantitativ nachweisbar ist. Hierzu wurde die Frequenz Tuberkulin-spezifischer T Zellen von vier Probanden mit hochpositivem TST im zeitlichen Verlauf nach Anlage eines TST durchflusszytometrisch bestimmt.



**Abb. 14:** Verlauf der Frequenzen zirkulierender, Tuberkulin-spezifischer T Zellen vor, während und nach der Induration eines TST. Vier Probanden zeigten am Tag zwei eine Induration zwischen zwölf und 22 Millimeter sowie eine verminderte Frequenz zirkulierender Tuberkulin-spezifischer CD4 T Zellen. An Tag zehn war klinisch keine Induration mehr nachweisbar und die Frequenz zirkulierender Zellen wieder auf das Ausgangsniveau angestiegen.

Da das Maximum der Induration 48 bis 72 Stunden nach Anlage zu erwarten ist, wurde den Probanden sowohl vor als auch zwei und zehn Tage nach Anlage des TST Blut entnommen und durchflusszytometrisch auf die Frequenz Antigen-spezifischer CD4 T Zellen gegen Tuberkulin untersucht. Bei allen vier Probanden war an Tag 10 klinisch keine Induration mehr nachweisbar. In Abb. 14 zeigt sich eine deutliche Abnahme der zirkulierenden Tuberkulin-spezifischen T Zellen zeitgleich mit

der maximalen Induration im *TST*. Nach Abklingen der Reaktion im *TST* an Tag 10 ist wieder ein Anstieg der zirkulierenden T Zellen auf das Ausgangsniveau zu verzeichnen.

Die Abwanderung der zirkulierenden T Zellen in ein Entzündungsgebiet ist somit mittels Durchflusszytometrie quantitativ nachvollziehbar. Diese Tatsache könnte im Umkehrschluss einen Einfluss auf das Ergebnis der durchflusszytometrischen Messung haben, wenn das Blut während der maximalen Induration eines *TST* abgenommen würde.

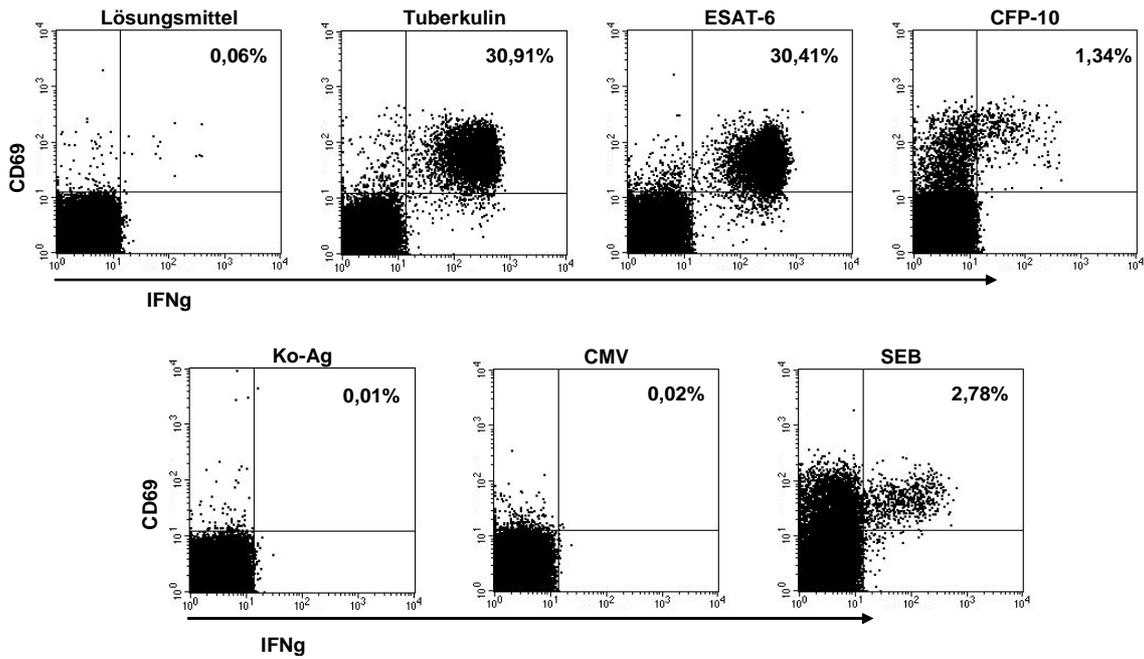
Das folgende Rechenbeispiel beruht auf einigen Annahmen und soll daher keine absoluten Zahlenwerte liefern, es gibt lediglich eine Vorstellung davon, in welcher zahlenmäßigen Dimension Zellen nach Anlage eines *TST* aus der Zirkulation abwandern könnten: Patient #1 wog am Tag 2 der Testreihe 95 Kilogramm. Bei einer angenommenen Blutmenge von 80ml pro Kilogramm Körpergewicht ergibt sich eine absolute Blutmenge von 7,6 Litern. Im Blutbild von Tag 1 wies der Patient 5.100 Leukozyten pro  $\mu\text{l}$  Vollblut auf. Bei 12,26% Lymphozyten im Differentialblutbild von diesem Tag und einem Anteil von 44,7% CD4 Lymphozyten an allen Lymphozyten (die beiden zuletzt genannten Parameter werden bei der durchflusszytometrischen Messungen aus Vollblut zusätzlich bestimmt) ergibt sich eine Gesamtmenge von  $1,7 \times 10^9$  CD4-Lymphozyten. Vor Anlage des *TST* waren 0,88% und zwei Tage nach Anlegen des Tests 0,66% der CD4 T Zellen Tuberkulin-spezifische Zellen in der Blutzirkulation nachweisbar. Dies entspricht bei einer Induration von 18mm einer Differenz von ca. 3,8 Millionen CD4 T Zellen, die vermutlich zur Induration beigetragen haben oder in die drainierenden Lymphknoten dieses Gebiets gewandert sind. Nach Abklingen der Induration an Tag 10 sind wieder 0,81% Tuberkulin-spezifische Zellen in vitro nachweisbar.

## **4.9 Fallbeschreibung**

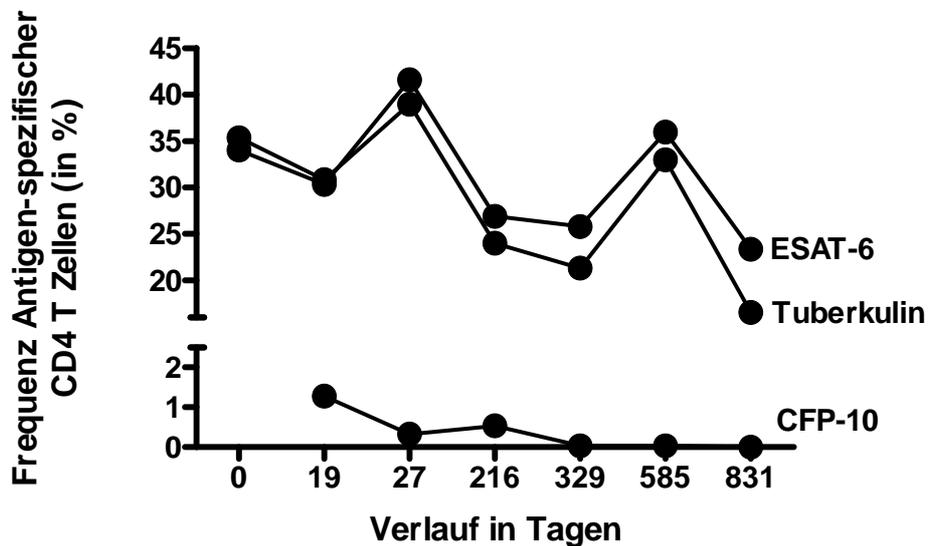
### **4.9.1 Massive Expansion Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischer CD4 T Zellen eines einzelnen Probanden**

Im Verlauf der Studie fiel ein Proband durch eine ausgeprägte Frequenz Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischer CD4 T Zellen auf.

Der 76jährige Proband stellte sich wegen Hämoptysen in der Lungenklinik vor. An relevanten Vorerkrankungen bestand eine koronare Herzkrankheit mit Zustand nach Myokardinfarkt, eine Mitralinsuffizienz sowie eine intermittierende Arrhythmie wegen derer der Patient oral antikoaguliert war. Eine retrospektive Anamnese bezüglich *TBC* sowie Immundefekten oder kompliziert verlaufender Infektionen war leer. Bei der körperlichen Untersuchung und Diagnostik zur Abklärung der Hämoptysen fielen keine Befunde auf, die für eine aktive Infektion mit *M. tuberculosis* gesprochen hätten, Infektparameter sowie Sputum- und Bronchialaspiratkulturen auf Mycobakterien waren negativ. Im durchgeführten *TST* konnte wiederholt keinerlei spezifische Induration nachgewiesen werden. In der ersten durchflusszytometrischen Analyse Antigen-spezifischer T Zellen ergaben sich nach Abzug der Kontrolle Frequenzen von 35,35% Tuberkulin-spezifischer CD4 T Zellen und 34,03% ESAT-6-spezifischer CD4 T Zellen. Diese Frequenz lag weit über den Medianen von 0,2579% Tuberkulin-spezifischer und von 0,1383% ESAT-6-spezifischer CD 4 T Zellen des Kollektivs Tuberkulin- und ESAT-6-positiver Probanden dieser Arbeit (siehe 4.3). Zunächst wurden in einer zweiten Messreihe aus einer erneuten Blutentnahme die erhobenen Befunde bestätigt. Zusätzlich wurden Antigen-spezifische T Zellen gegen Antigene des *CMV* und des Adenovirus bestimmt. In Abb. 15 sind diese Ergebnisse dargestellt (Daten für Adenovirus nicht gezeigt). Die Frequenzen Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischer T Zellen sind reproduzierbar, negative Ergebnisse in der Lösungsmittelkontrolle und in den Stimulationen mit *CMV* und Adenovirus schließen eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems *in vitro* aus. Aufgrund dieser Befunde wurde der Proband über einen Zeitraum von über zwei Jahren nachverfolgt. In Abb. 16 ist der Verlauf der Tuberkulin-, ESAT-6- und CFP-10-spezifischen T Zellen dargestellt. Die Frequenzen zeigten eine abnehmende Tendenz im Verlauf, waren jedoch über den gesamten Zeitraum hoch. An Tag 27 wurde die höchsten Frequenzen mit 38,98% gegen Tuberkulin und 41,57% gegen ESAT-6 gemessen.



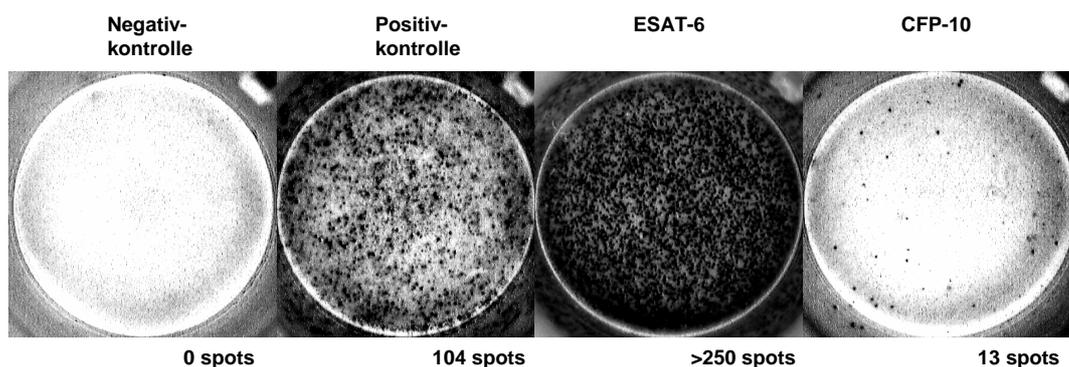
**Abb. 15:** Antigen-spezifische CD4 T Zellen eines Probanden mit massiv erhöhter Reaktivität gegen Antigene des *M. tuberculosis*. Dargestellt ist die zweite Messung, hier wurden CFP-10, CMV, Adenovirus (nicht gezeigt) und SEB zur Kontrolle stimuliert. Der Proband zeigt Frequenzen von 30,85% Tuberkulin-spezifischer und von 30,35% ESAT-6-spezifischer T Zellen nach Abzug der Lösungsmittelkontrolle. Eine Frequenz von 1,29% CFP-10-spezifischer T Zellen ist ebenfalls nachweisbar. Eine Stimulation CMV- und Adenovirus Antigen blieb unterhalb der Nachweisgrenze. Ko-Ag stellt die Negativkontrolle der CMV-Stimulation da. Die Stimulation mit SEB als Positivkontrolle induziert eine Aktivierung von 2,72% aller CD4 T Zellen.



**Abb. 16:** Zeitlicher Verlauf der Frequenzen Antigen-spezifischer CD4 T Zellen über einen Zeitraum von über zwei Jahren aus sieben Messungen. Es zeigte sich eine hohe Frequenz Antigen-spezifischer T Zellen gegen *M. tuberculosis*-spezifische Antigene mit abfallender Tendenz.

#### 4.9.2 Massive Antigen-spezifische Reaktivität ist in weiteren immunologischen Assays reproduzierbar

Der Nachweis dieser massiven Reaktivität wirft die Frage auf, ob diese Ergebnisse mit anderen T Zell Assays reproduzierbar sind. Hierzu wurde zunächst parallel zur durchflusszytometrischen Messung an Tag 19 aus der gleichen Blutprobe ein ELISPOT<sup>®</sup> (Oxfordimmunotech, Oxford, Großbritannien) entsprechend der Anweisung der Herstellers durchgeführt. Da der ELISPOT<sup>®</sup> zu diesem Zeitpunkt in der Arbeitsgruppe noch nicht etabliert war, wurde dieser Versuch freundlicherweise durch das Labor Enders (Prof. Dr. G. Enders und Partner, Stuttgart) durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie waren im ELISPOT<sup>®</sup> nach Stimulation mit ESAT-6- mehr als 250 Spots pro 250.000 *PBMC* in subkonfluenter Anordnung detektierbar, diese Reaktion war deutlicher als die Positivkontrolle mittels Phytohemagglutinin. 13 Zytokin-positive Spots wurden nach Stimulation mit CFP-10 detektiert (Abb. 17).

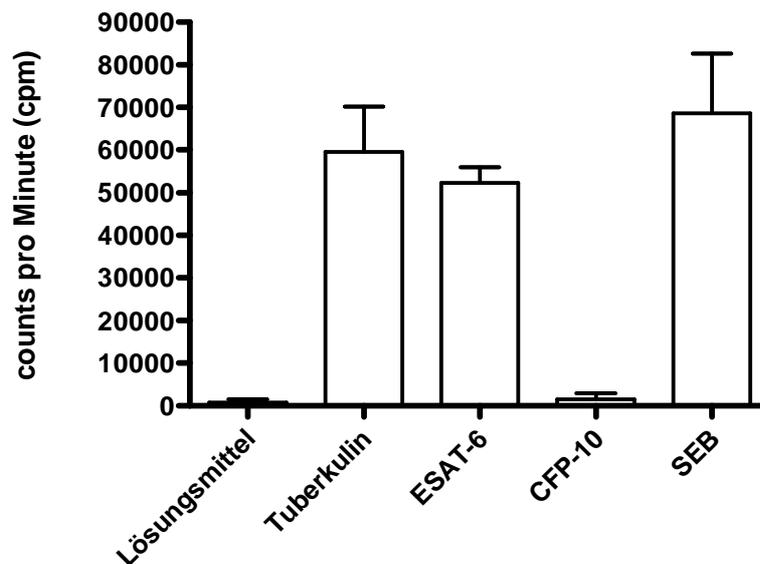


**Abb. 17:** ELISPOT<sup>®</sup>-Ergebnisse des beschriebenen Probanden. Dargestellt sind die Negativkontrolle (0 Spots, mock), die Positivkontrolle (104 Spots, Phytohemagglutinin), ein ESAT-6-Well (>250 Spots, subkonfluent) und das CFP-10-Well (13 Spots). Im ESAT-6-Well ist eine subkonfluente Anordnung der Spots zu sehen, sodass von deutlich mehr Zytokin-positiven Zellen auszugehen ist.

Weitere Methoden zum Nachweis Antigen-spezifischer T Zellen beruhen auf der Darstellung einer durch Antigene induzierten Proliferation spezifischer Zellen. Zum einen kann die Proliferation durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA sich teilender Zellen nachgewiesen werden. Aus der Blutprobe des Probanden von Tag 216 wurden *PBMC* isoliert (siehe 3.7.2) und in dreifachem Ansatz mit den Antigenen Tuberkulin, ESAT-6 und CFP-10 sowie Lösungsmittel als Negativ- und *SEB* als Positivkontrolle stimuliert. Nach 96 Stunden Inkubationszeit

wurde die Antigen-induzierte Proliferation mittels Szintillationszähler ausgewertet und in Form eines Stimulationsindex (SI) ausgedrückt (siehe 3.11).

In den Ansätzen mit Tuberkulin wurden im Mittel 59.492cpm gemessen (SI=77), in den Ansätzen mit ESAT-6 im Mittel 52.342cpm (SI=68). Wie schon nach Durchflusszytometrie und ELISPOT<sup>®</sup> zu erwarten, wurde durch CFP-10 eine wesentlich geringere Proliferation induziert (im Mittel 2.301cpm; SI=3), *SEB* induzierte hingegen eine deutliche Proliferation (im Mittel 68.592cpm; SI=89), die Daten sind in Abb. 18 dargestellt.

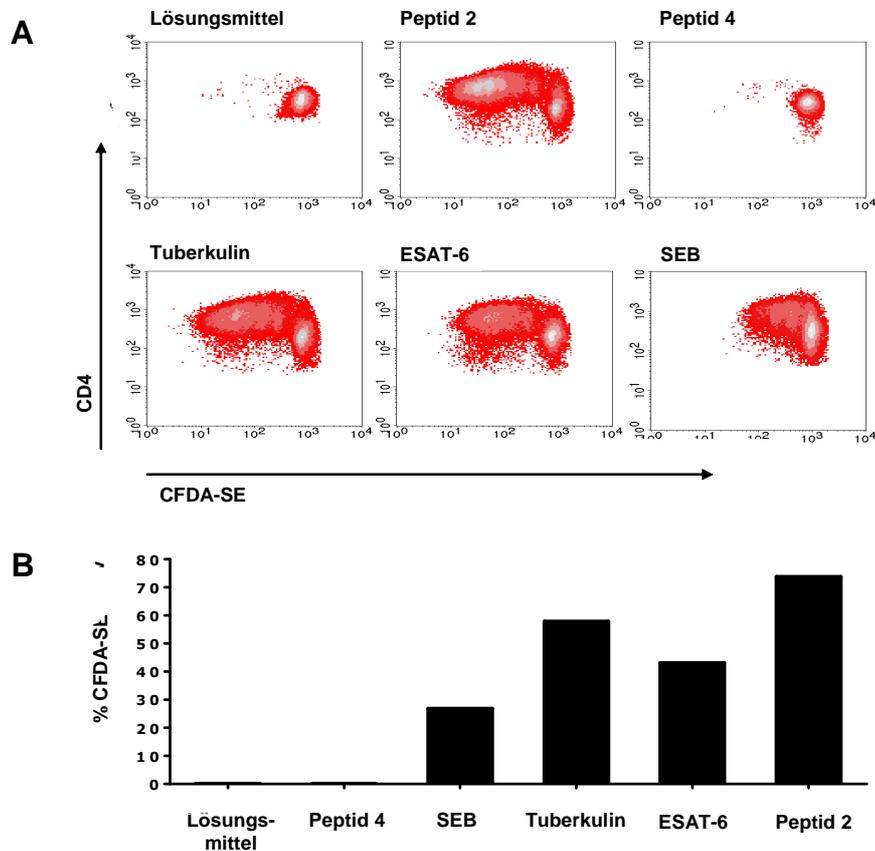


**Abb. 18:** Antigen-induzierte Proliferation, nachgewiesen durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA proliferierender Zellen (counts pro Minute im BetaCounter<sup>®</sup>). Im Lösungsmittel ist keine relevante Proliferation induziert worden, in den Stimulationen mit Tuberkulin waren im Mittel 59.492cpm, mit ESAT-6 52.342cpm und damit eine massive Proliferation nachweisbar. Wie nach den durchflusszytometrischen Daten zu erwarten hat CFP-10 nur eine geringe Proliferation induziert (2301cpm). *SEB* als Positivkontrolle induziert eine massive Proliferation (68.592cpm). Angegeben sind Mittelwert aus drei Messungen sowie eine Standardabweichung.

Es konnte gezeigt werden, dass *M. tuberculosis*-spezifische Antigene eine Proliferation von *PBMC* des Probanden induzieren. Es stellt sich nun die Frage, ob es sich bei diesen proliferierenden Zellen um CD4 T Zellen handelt, die eine Zytokinproduktion im durchflusszytometrischen Assay induziert haben. Hierzu wurde der *CFDA-SE* Proliferationsassay durchgeführt, der neben der Quantifizierung einer Antigen-induzierten Proliferation zusätzlich eine durchflusszytometrische Charakterisierung der proliferierenden Zellen erlaubt.

An Tag 216 wurde eine Stimulation mit den Antigenen Tuberkulin, ESAT-6 und den ESAT-6-Einzelpeptiden 2 und 4, sowie Lösungsmittel als Negativkontrolle und *SEB* als Positivkontrolle, entsprechend der Beschreibung in 3.10, durchgeführt. Nach fünf

Tagen Inkubation wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 sowie auf ihren Gehalt an *CFDA-SE* analysiert. Ein abnehmender Gehalt von *CFDA-SE* in jeder Zellgeneration ist Ausdruck einer stattgehabten Proliferation (Abb. 19).



**Abb. 19:** Proliferation von Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischen Zellen. Nachgewiesen wird die Proliferation durch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität von *CFDA-SE* mit jeder Zellgeneration (A). Sowohl Tuberkulin als auch ESAT-6 induziert nach fünf Tagen eine Proliferation, es lassen sich 6 Generationen von Zellen nachweisen. Die Lösungsmittelkontrolle induziert keine relevante Proliferation, die Positivkontrolle SEB hingegen eine deutliche Proliferation. ESAT-6 Peptid 2 zeigt im Gegensatz zu ESAT-6 Peptid 4 ein ähnliches Proliferationsverhalten wie das Gesamtprotein. In Teil B der Abbildung ist der prozentuale Anteil der CD4 T Zellen an der Gesamtzahl aller gemessenen Zellen gezeigt, die einen verminderten Gehalt von *CFDA-SE* aufweisen. Lösungsmittel und Peptid 4 haben keine Proliferation induziert, weniger als 1% der Zellen dieser Messungen haben einen erniedrigten Gehalt von *CFDA-SE*, wohin gegen Tuberkulin, ESAT-6 und ESAT-6-Peptid 2 eine deutliche Proliferation induzieren und damit einen Anteil von 60% für Tuberkulin, 45% für ESAT-6 und über 70% für Peptid 2 Zellen mit vermindertem Gehalt von *CFDA-SE* aufweisen.

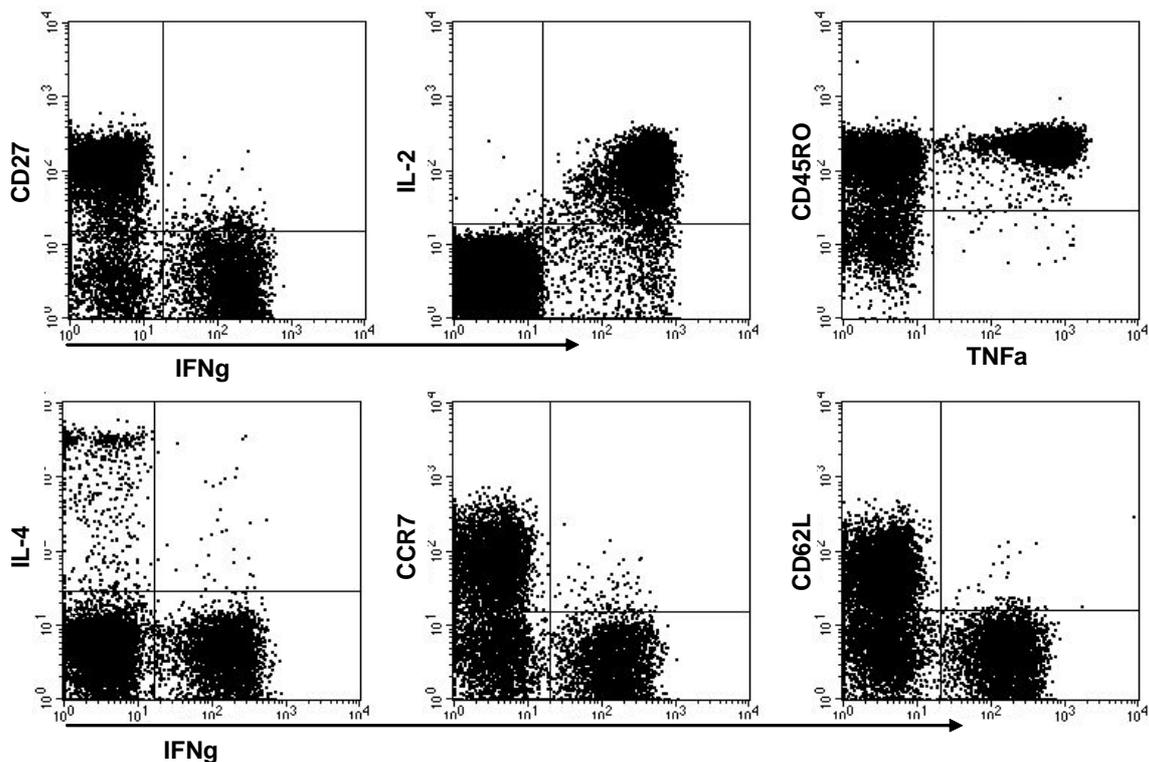
Die Antigene Tuberkulin und ESAT-6 induzieren eine deutliche Proliferation von CD4 T Zellen, insgesamt sind sechs Zellgenerationen nachweisbar. Die Stimulation mit Lösungsmittel induziert keine spezifische Proliferation. In 4.9.4 wird auf Versuche mit Einzelpeptiden des ESAT-6-Proteins eingegangen. Vorweggenommen sei an dieser Stelle, dass ESAT-6 Peptid 2 im *CFDA-SE* Assay eine Proliferation gleichen Ausmaßes wie das Gesamtprotein induziert, ESAT-6 Peptid 4 hingegen jedoch nicht.

In CD8 T Zellen konnte keine spezifische Proliferation gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

#### 4.9.3 Tuberkulin- und ESAT-6-spezifische Zellen besitzen den gleichen Phänotyp

Nach wiederholtem Nachweis dieser ausgeprägten Immunantwort mittels verschiedener immunologischer Nachweismethoden wurde nun der Frage nach dem Phänotyp sowie der Funktionalität der betreffenden Zellen nachgegangen. An Tag 27 wurden Stimulationen mit Tuberkulin (siehe 3.8) durchgeführt, um verschiedene Oberflächenproteine und Zytokine der betreffenden Zellen darzustellen. Abb. 20 gibt eine Übersicht über den Phänotyp und die Funktionalität der Tuberkulin-spezifischen Zellen.

##### Tuberkulin:



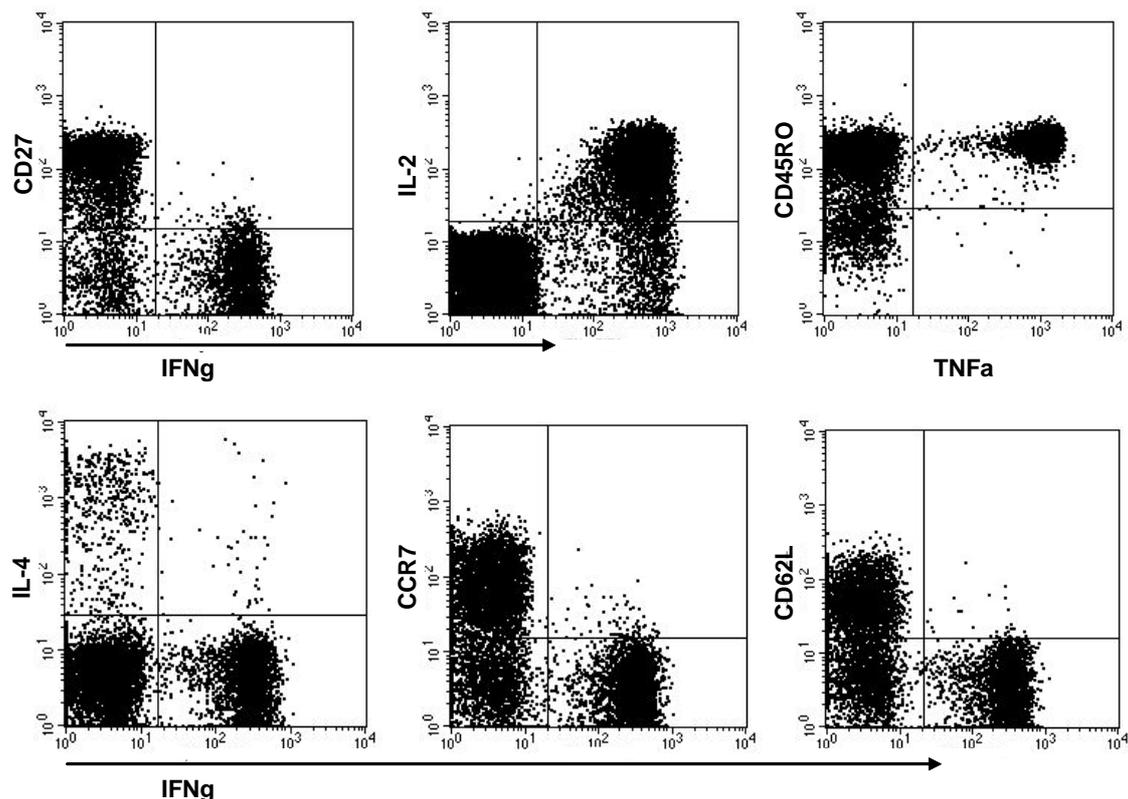
**Abb. 20:** Phänotypische Charakterisierung Tuberkulin-spezifischer CD4 T Zellen des Probanden. Zu 98% produzieren diese Zellen neben IFN $\gamma$  auch TNF $\alpha$  und zu 85% auch IL-2. Eine spezifische IL-4 Produktion konnte nicht nachgewiesen werden, da in der Lösungsmittelkontrolle der gleiche Anteil IL-4-positiver T Zellen detektierbar war, wie in der Antigenstimulation (Daten nicht gezeigt). Die Zellen sind positiv für CD45RO und negativ für CD27, CCR7 und CD62L.

Tuberkulin-spezifische Zellen produzieren neben IFN $\gamma$  zu 98% TNF $\alpha$  und zu 85% IL-2. Eine relevante Produktion von IL-4 konnte nicht nachgewiesen werden. Im linken, unteren Dotplot der Abb. 20 zeigt sich eine Population IFN $\gamma$ -negativer, IL-4-positiver

Zellen, welche in der Lösungsmittelkontrolle in gleichem Umfang nachzuweisen waren (Daten nicht gezeigt), sodass hier von einer unspezifischen IL-4-Produktion in vitro ausgegangen werden kann.

Die gleichen Oberflächenproteine und Zytokine wurden nach Stimulation mit ESAT-6 analysiert. Betrachtet man nun den Phänotyp der ESAT-6-spezifischen T Zellen (Abb. 21), so findet sich ein identisches Verteilungsmuster der Oberflächenproteine sowie eine identische Zytokinproduktion.

### ESAT-6:



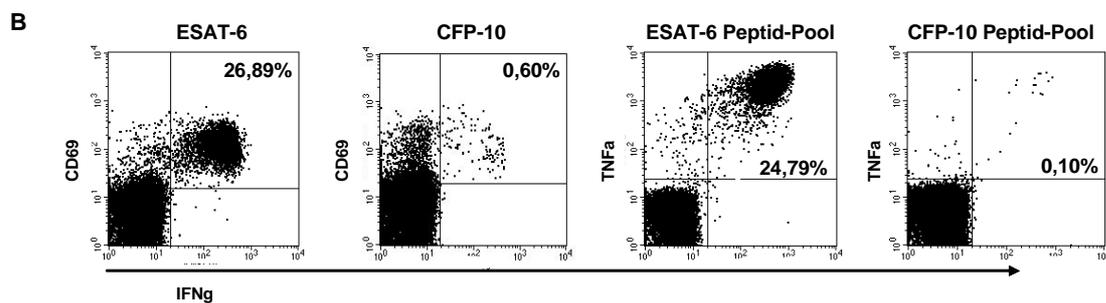
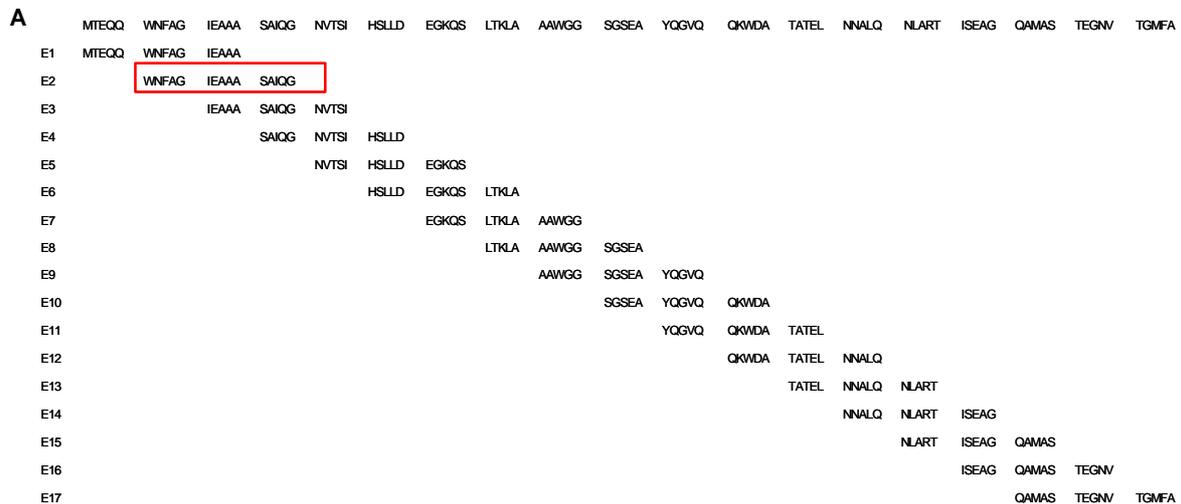
**Abb. 21:** Phänotypische Charakterisierung ESAT-6-spezifischer Zellen. Im Vergleich zu den Tuberkulin-spezifischen Zellen zeigt sich die gleiche Konstellation phänotypischer Marker. Dieser Befund legt nahe, dass es sich in beiden Fällen um die gleichen Zellen handeln könnte.

Die Analyse des Phänotyps der Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischen CD4 T Zellen zeigte, dass es sich um Memory-Zellen handelt, von denen weit über 90% einen aktivierten Memory-Phänotyp (CD4<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup>) aufweisen. Ein weiterer Hinweis auf einen ausgeprägten Differenzierungsgrad bietet die Tatsache, dass die Zellen die Marker CCR7 und CD62L nicht mehr aufweisen. Diese beiden Proteine vermitteln eine Migration von naiven T Lymphozyten in den Lymphknoten, diese Fähigkeit geht bei terminal differenzierten T Zellen verloren. Fast alle Zellen sind CD27-negativ, was ebenfalls für einen reifen Differenzierungsgrad der Zellen spricht. Die Tatsachen,

dass Tuberkulin- und ESAT-6-spezifische Zellen in vergleichbar hoher Frequenz vorliegen und dass es sich um Zellen des gleichen Phänotyps mit gleicher Zytokinproduktion handelt, legen den Verdacht nahe, dass durch beide Antigene identische Zellen aktiviert werden könnten.

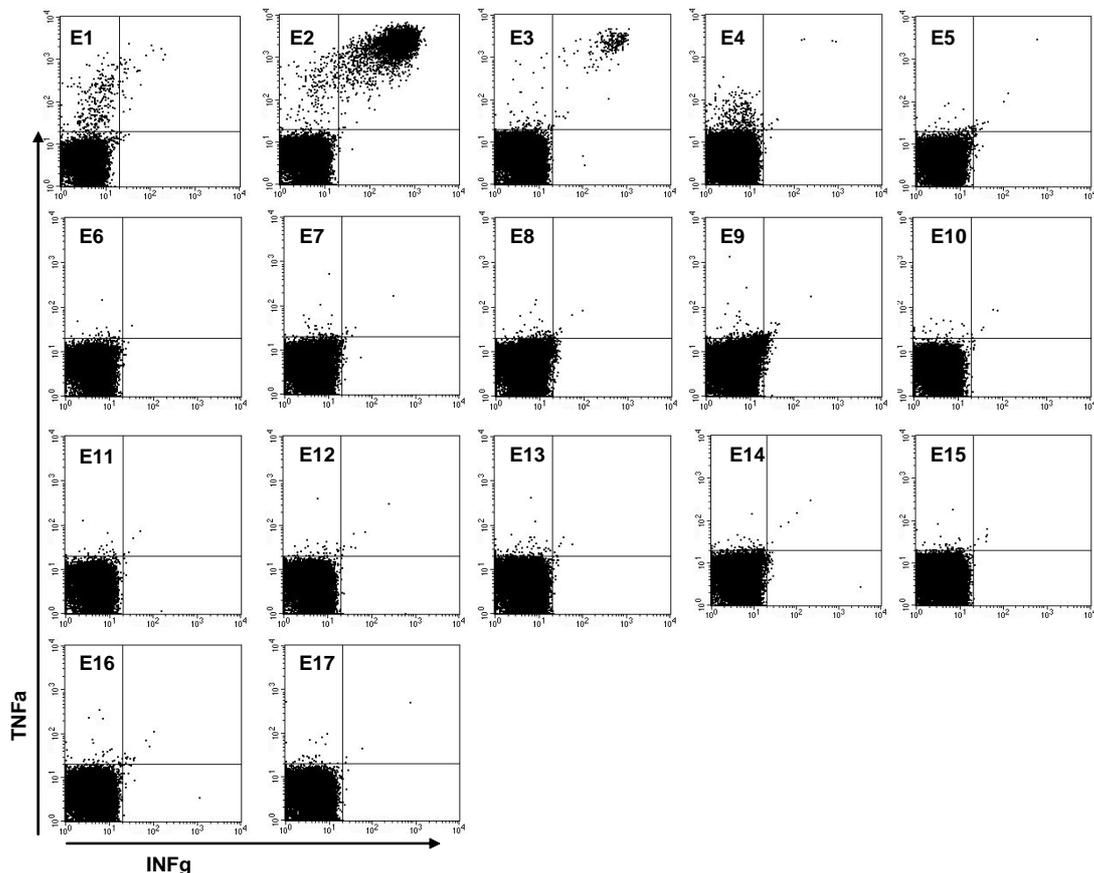
#### 4.9.4 Die Antigen-spezifische Reaktivität ist gegen ein einzelnes Peptid des ESAT-6-Proteins gerichtet

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob es möglich ist, das antigene Epitop, welches zu einer Aktivierung dieser Zellen führt, näher einzugrenzen. Hierzu standen 17 Einzelpeptide des ESAT-6-Proteins sowie 16 Einzelpeptide des CFP-10-Proteins zur Verfügung, zur Veranschaulichung sind die Peptidsequenzen des ESAT-6 Proteins in Abb. 22A dargestellt.



**Abb. 22:** Stimulationen mit Einzelpeptiden des ESAT-6- und des CFP-10-Proteins. Teil A zeigt die Aminosäuresequenzen von 17 Einzelpeptiden des ESAT-6. Teil B zeigt die Frequenzen spezifischer CD4 T Zellen gegen die Kompletantigene (ESAT-6: 26,89%; CFP-10: 0,6%, jeweils positiv für IFN $\gamma$ ), sowie die Frequenzen spezifischer CD4 T Zellen gegen die Pools aller Einzelpeptide für ESAT-6 (24,79%) und CFP-10 (0,1%), jeweils doppelpositiv für IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Die Stimulationen wurden an Tag 216 nach Erstmessung durchgeführt (siehe Verlauf in Abb. 16).

Alle Einzelpeptide sind 15 Aminosäuren lang und überlappen sich jeweils um fünf Aminosäuren an beiden Enden. Die Stimulationen (siehe 3.8) wurden mit den Komplettantigenen ESAT-6 und CFP-10, mit den Einzelpeptiden von ESAT-6 und CFP-10 sowie je eine Stimulation mit dem Pool aller Einzelpeptide von ESAT-6 und CFP-10 durchgeführt. Abb. 22B zeigt zunächst die Messungen der beiden Komplettantigene sowie die der Pools der Einzelpeptide von ESAT-6 und CFP-10. Die Stimulationen mit ESAT-6-Komplett-Antigen und mit dem Pool aller Einzelpeptide von ESAT-6 zeigen ähnliche Frequenzen spezifischer CD4 T Zellen. Für CFP-10 liegt die Frequenz der Stimulation mit dem Pool mit 0,1% unter der Frequenz einer Stimulation mit dem Komplettantigen von 0,6%. Betrachtet man nun die 17 Stimulationen der Einzelpeptide des ESAT-6, so induziert ESAT-6-Peptid 2 als einziges Peptid eine spezifische Reaktivität von 27,31% aller CD4 T Zellen (Abb. 23).



**Abb. 23:** Stimulationen mit 17 Einzelpeptiden des ESAT-6-Proteins, ausgewertet nach Produktion von INF $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Es zeigt sich eine Induktion beider Zytokine durch Stimulation mit Peptid E2 bei 27,32% aller CD4 T Zellen. Im nachfolgenden Peptid E3 ist eine wesentlich geringere Induktion der beiden Zytokine nachweisbar. Alle anderen Peptide (E1, E3-E17) erzielten keine signifikante Zytokininduktion.

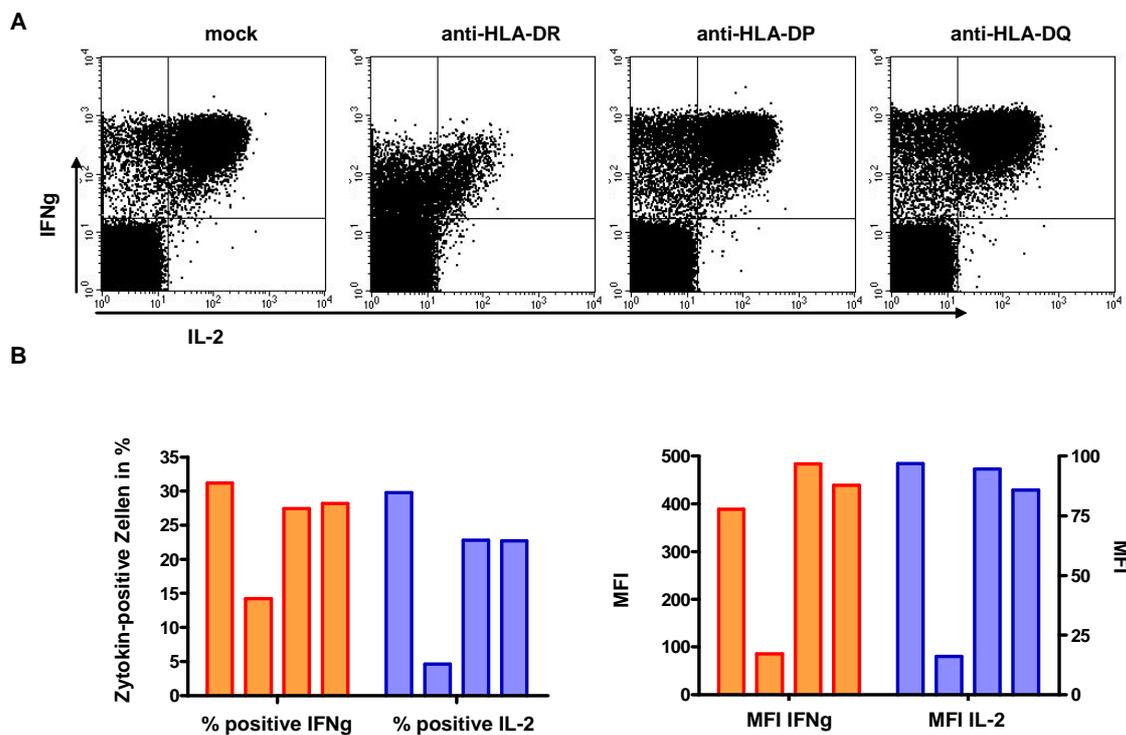
Diese ist vergleichbar mit der Reaktivität gegen das Komplettantigen ESAT-6 oder mit dem Peptidpool (siehe. Abb. 22). In der Stimulation mit ESAT-6-Peptid 3 war eine wesentlich geringere Zytokinproduktion, bei allen weiteren ESAT-6 Peptiden (E1, E4-E17) keinerlei spezifische Zytokinproduktion feststellbar. In der Durchflusszytometrie ist es in seltenen Fällen möglich, dass Zellen aus einer Messung in die nachfolgende Messung verschleppt werden, sollten die Probenröhrchen zu schnell gewechselt werden. Da es sich vom Aspekt her um identische Populationen in E2 und E3 handelte, liegt der Verdacht einer solchen Verschleppung nahe und der Versuch mit den ESAT-6-Peptiden 1 bis 4 wurde wiederholt, wobei diesmal auf eine ausreichend lange Pause zwischen den jeweiligen Messungen geachtet wurde. In der Stimulation mit ESAT-6-Peptid 3 zeigten sich hierbei keine spezifischen Zellen (Daten nicht gezeigt), sodass von einer Verschleppung von Zellen aus Peptid 2 nach Peptid 3 im ersten Versuch ausgegangen werden kann.

Für die Versuchsreihe mit den Peptiden des CFP-10 konnte kein einzelnes Peptid ermittelt werden, bei dem es zu einer herausragenden Aktivierung von Zellen kam (Daten nicht gezeigt). Damit konnte gezeigt werden, dass die ESAT-6-spezifischen CD4 T Zellen des Probanden gegen ein einzelnes, 15 Aminosäuren langes Epitop des ESAT-6-Proteins gerichtet sind.

#### 4.9.5 Das relevante Epitop wird im Kontext von *HLA-DR* präsentiert

In den vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass die Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischen Zellen des Probanden exakt den gleichen Phänotyp und die gleiche Zytokinproduktion aufweisen und außerdem von einem einzelnen Peptid des ESAT-6-Proteins aktiviert werden können. Es ist vorstellbar, dass es sich bei den betreffenden Zellen um Zellen monoklonalen Ursprungs handeln könnte. Zur Antigen-spezifischen Aktivierung von T Zellen ist eine Präsentation des antigenen Epitops in *HLA*-Molekülen auf der Oberfläche von *apc* notwendig, von denen im menschlichen Organismus drei Subtypen, *HLA-DR*, *-DP* und *-DQ* existieren. Würden alle spezifischen Zellen des Probanden durch Präsentation von antigenen Epitopen im gleichen *HLA*-Subtyp aktiviert, wäre dies ein weiterer Hinweis auf eine Monoklonalität der betreffenden Zellen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden vier Stimulationsansätzen (siehe 3.8) mit Tuberkulin angesetzt und jeweils spezifische, nicht fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen *HLA-DR*, *-DP* und *DQ* in

Hemmkonzentration während der Stimulationsphase zugegeben (siehe 3.8.6). Ein Stimulationsansatz diente als Negativkontrolle (mock) und enthielt keinerlei Antikörper gegen *HLA*. Gemessen wurden die Frequenzen Zytokin-positiver CD4 T Zellen und die Expressionsdichte dieser Zytokine (mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) in An- und Abwesenheit blockierender Antikörper gegen drei *HLA*-Subtypen (Abb. 24).



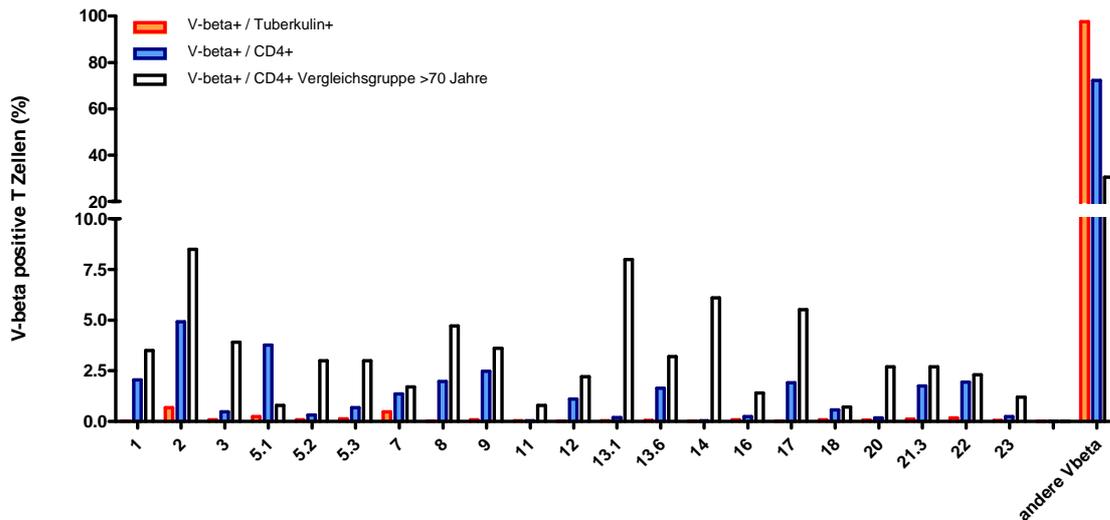
**Abb. 24:** Abnahme der Frequenzen sowie der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) nach Blockade des *HLA*-DR. (A) zeigt Dotplots der Antigen-spezifischen CD4 T Zellen gegen Tuberkulin ohne Blockade (mock) und nach Blockade der *HLA*-II-Moleküle DR, DP und DQ. Eine Blockade des *HLA*-DR-Moleküls bewirkt eine deutliche Abnahme der Frequenz Tuberkulin-spezifischer T Zellen. (B) zeigt die quantitative Analyse der Frequenzen IFN $\gamma$ - bzw. IL-2-positiver Zellen sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der IFN $\gamma$ - und IL-2-positiven Zellen nach Blockade der *HLA* Moleküle (jeweils vier Balken von links nach rechts: mock; *HLA*-DR; -DP; -DQ). Hier wird die Abnahme der zellulären Reaktivität nach *HLA*-DR-Blockade besonders deutlich sichtbar.

In der Stimulation ohne Hemmung von *HLA*-Molekülen (mock) produzieren 31,16% der CD4 T Zellen IFN $\gamma$  und 29,78% der Zellen IL-2. Nach Blockade von *HLA*-DR produzieren nur noch 14,22% der Zellen IFN $\gamma$  und 4,58% der Zellen IL-2. Nach Blockade der *HLA*-DP und -DQ Moleküle produzieren 27,42% bzw. 28,17% der Zellen IFN $\gamma$  und 22,78% bzw. 22,69% der Zellen IL-2. Nach Hemmung der Antigenpräsentation durch Antikörper gegen das *HLA*-DR-Molekül zeigt sich eine deutliche Reduktion sowohl der absoluten Anzahl reaktiver Zellen als auch der mittleren Fluoreszenzintensität der produzierten Zytokine IFN $\gamma$  und IL-2 gegenüber

den übrigen Stimulationen. Diese Daten zeigen, dass das relevante Protein im Kontext von *HLA-DR* auf *apc* präsentiert wird, und erhärten den Verdacht, dass es sich um monoklonale Zellen handeln könnte.

#### 4.9.6 Gleiche V-beta Untereinheiten des T Zell-Rezeptors auf allen Antigen-spezifischen Zellen können nicht nachgewiesen werden

Im Kontext von *HLA*-Molekülen präsentierte antigene Epitope werden von spezifischen T Zellen mittels ihres T Zell-Rezeptor erkannt. Dieser führt nach Bindung an einen spezifischen Liganden (Komplex aus *HLA* und antigenem Epitop auf *apc*) zu einem downstream-Signal in den Zellkern und damit zu einer Aktivierung der Zelle und Produktion von Zytokinen. Der T Zell-Rezeptor besteht aus verschiedenen Untereinheiten, unter anderem aus V- $\beta$  Untereinheiten, von denen im menschlichen Organismus zahlreiche Subtypen existieren. Ein weiterer Hinweis für Monoklonalität der *M. tuberculosis*-spezifischen Zellen des Probanden wäre, wenn alle reaktiven Zellen die gleiche V- $\beta$  Untereinheiten des T-Zell-Rezeptors exprimieren würde. Daher wurde versucht, die Verteilung der V- $\beta$  Untereinheiten auf den Antigen-spezifischen Zellen des Probanden darzustellen. Nach Stimulation der Zellen mit Tuberkulin am Tag 216 (siehe 3.8) wurden diese Proben mit Antikörpern gegen 21 verschiedene V- $\beta$  Untereinheiten des T-Zell-Rezeptors gefärbt. In Abb. 25 ist die Verteilung der V- $\beta$  Untereinheiten aller CD4 T Zellen des Probanden (blaue Balken), der Tuberkulin-reaktiven Zellen des Probanden (rote Balken) sowie die einer altersgleichen Kontrollgruppe (weiße Balken) dargestellt. Die Verteilung der V- $\beta$  Untereinheiten auf allen CD4 T Zellen des Probanden (blaue Balken) unterscheidet sich von der einer altersgleichen Vergleichsgruppe (weiße Balken aus: (VAN DEN BEEMD et al., 2000)). In dem getesteten Panel von 21 V- $\beta$  Untereinheiten befand sich keine, die von einem größeren Anteil der Tuberkulin-spezifischen CD4 T Zellen des Probanden exprimiert wurde (rote Balken alle <1%). 97,5% Tuberkulin-spezifischen Zellen des Probanden exprimieren V- $\beta$  Untereinheiten, die nicht im getesteten Panel enthalten waren (andere V- $\beta$ ). Damit konnte keine Aussage bezüglich der V- $\beta$  Untereinheiten des T Zell-Rezeptors auf den Tuberkulin-spezifischen Zellen des Probanden getroffen werden und der Nachweis einer Monoklonalität der Tuberkulin-spezifischen Zellen mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern nicht erbracht werden.



**Abb. 25:** Verteilung der V-beta Untereinheiten des T-Zell-Rezeptors auf CD4 T Zellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD4 T Zellen, die eine V-beta Untereinheit des T Zell-Rezeptors exprimieren. Getestet wurden ein Panel von 21 verschiedenen V- $\beta$  Untereinheiten (rot: Tuberkulin-spezifische-, blau: alle CD4 T Zellen des Probanden, weiß: alle CD4 T Zellen der Vergleichsgruppe).

Nach Isolation der Tuberkulin-spezifischen Zellen mit Hilfe eines *MACS* (magnetic affinity cell sorting) -basierten Zytokin-Assays wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. Paul Fisch in Freiburg eine RNA-Sequenzierung der variablen Region des *TCR*  $\beta$ -Kette durchgeführt. Es zeigte sich einen peak in der V- $\beta$  13 Untereinheit des *TCR*; damit war abschließend sowohl auf *PCR*- als auch auf Sequenzierungsebene gezeigt, dass es sich um eine monoklonale Expansion von T Zellen handelt (Daten nicht gezeigt).

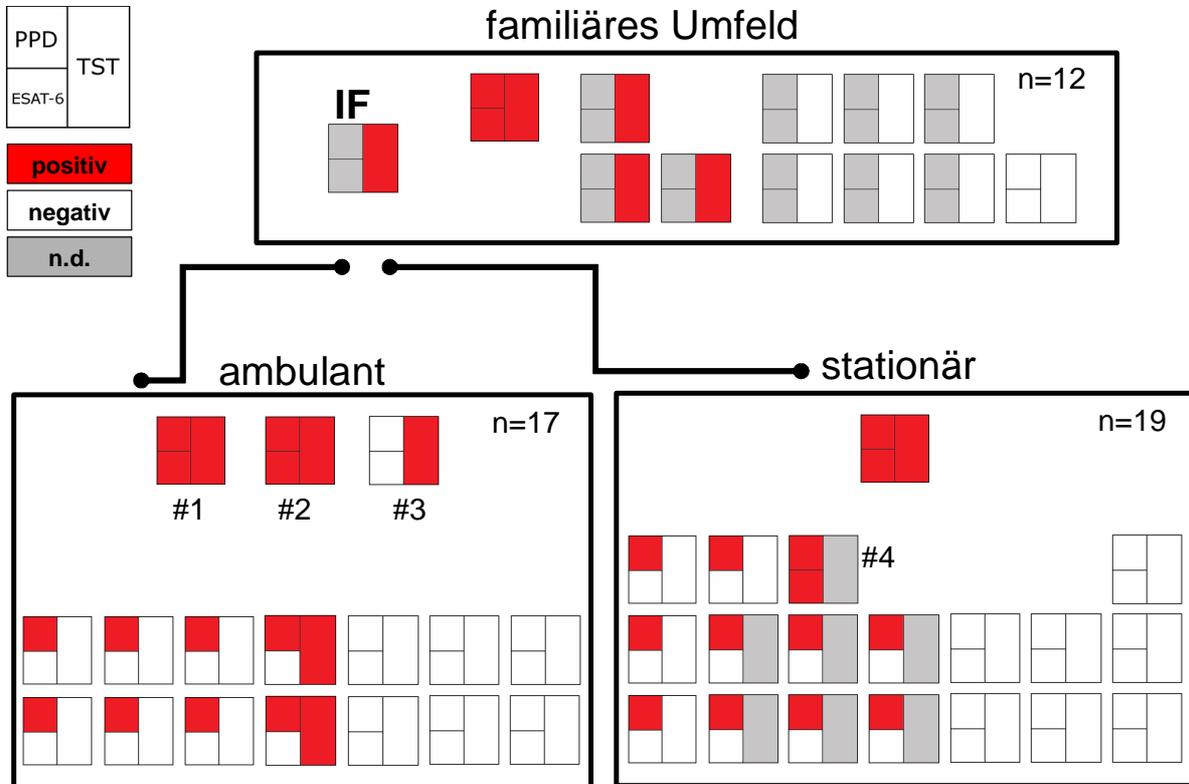
#### 4.10 Verwendung des durchflusszytometrischen Assays im Rahmen einer Umfelduntersuchung zu einem Indexfall mit kulturell gesicherter Infektion

Im Rahmen einer Umfelduntersuchung in Zusammenarbeit mit der Praxis Dr. med. Wahlen in Homburg wurden insgesamt 47 Kontaktpersonen zu einem Indexfall mit mikrobiologisch gesicherter *TBC* untersucht. Bei dem Indexfall handelte es sich um einen elf Monate alten, männlichen Säugling, der wegen Nahrungsverweigerung und mehrerer zervikaler Lymphknoten stationär aufgenommen wurde. Seit einem halben Jahr seien rezidivierend bronchitische Infekte aufgetreten. Aktuell leide das Kind an einer Gedeihstörung, zeigte jedoch keine B-Symptomatik. In der körperlichen Untersuchung zeigte sich ein elf Monate alter Säugling mit 7.500 Gramm Körpergewicht (Perzentile 3), 67 Zentimeter Körpergröße (Perzentile 3) und 45

Zentimeter Kopfumfang (Perzentile 25-50). Auffällig waren mehrere zervikale Lymphknoten, ein abgeschwächtes Atemgeräusch links und grob- bis mittelblasige Rasselgeräusche über beiden Lungen. Im Röntgen-Thorax kamen mediastinal mehrere verkalkte Lymphknoten, in der Computertomographie des Thorax eine subtotale Stenosierung des linken Hauptbronchus zur Darstellung. Ein *TST* mit fünf IE Tuberkulin (BiocineTest PPD<sup>®</sup>) ergab mit einer Induration von zehn Millimetern Durchmesser ein positives Ergebnis. Aus dem Magennüchternsekret wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion *M. tuberculosis* nachgewiesen.

Drei Monate nach dem stationären Aufenthalt wurde vom Gesundheitsamt in Homburg in Zusammenarbeit mit dem betriebsärztlichen Dienst des Universitätsklinikums des Saarlandes sowie unserem Labor eine Umfelduntersuchung aller ermittelten Kontaktpersonen durchgeführt. Es wurden insgesamt elf Kontaktpersonen des familiären Umfeldes, 17 ambulante Kontaktpersonen aus der Praxis des betreuenden Kinderarztes sowie 19 stationäre Kontaktpersonen aus dem Klinikum untersucht. Durchgeführt wurde bei diesen Personen ein *TST*, bei Bedarf eine Thorax-Röntgenaufnahme und, soweit die Personen ihr Einverständnis erklärten, eine durchflusszytometrische Analyse Antigen-spezifischer T Zellen aus dem Vollblut. In Abb. 26 sind die Personen der Umfelduntersuchung mit den zugehörigen Ergebnissen im *TST* und durchflusszytometrischen Assay dargestellt. Der Indexfall stand leider nicht zur durchflusszytometrischen Analyse zur Verfügung. Innerhalb der Familie waren bei einer Person sowohl ein positiver *TST* als auch Antigen-spezifische T Zellen gegen die getesteten Antigene nachweisbar. Initial erhielt diese Person eine Prophylaxe mit INH (Isoniazid), nach einem auffälligen Röntgenbild des Thorax wurde auf eine dreifache tuberkulostatische Therapie umgestellt. Drei weitere Personen aus dieser Gruppe erhielten nach grenzwertig positivem *TST* und sonst negativen Befunden eine Prophylaxe mittels Isoniazid. In der ambulanten Gruppe fanden sich 14 Kontakte mit negativer durchflusszytometrischen Analyse für ESAT-6-spezifische T Zellen. Zwei Personen davon hatten einen bekannt positiven *TST*. In Verbindung mit einem negativen Ergebnis in der ESAT-6-Stimulation ist hier eine Infektion mit *M. tuberculosis* auszuschließen. Sechs Personen wiesen eine geringe Reaktivität in der Stimulation mit Tuberkulin auf. Zusammen mit dem Befund einer negativen ESAT-6-Stimulation kann hier von einer *BCG*-Impfreaktion ausgegangen werden. Eine schwangere Kontaktperson aus dem ambulanten Umfeld zeigte eine Konversion im

TST nach dem Kontakt mit dem Indexfall. Eine erste durchflusszytometrische Analyse war negativ, in Messungen nach zwei und vier Wochen zeigten sich zunehmende Reaktivitäten gegen Tuberkulin und ESAT-6. Daher erhielt die Person eine Prophylaxe mit INH.



**Abb. 26:** Kontaktpersonen zu einem Indexfall. Für jede Person ist das dichotome Ergebnis der FACS-Messung für Tuberkulin und ESAT-6 sowie des TST angegeben. Die rechte Hälfte des Quadrats stellt den TST dar, die linke Hälfte die Ergebnisse aus der FACS-Analyse (oben Tuberkulin (PPD), unten ESAT-6). Getestet wurden elf Personen aus dem familiären Umfeld, 17 Personen aus dem ambulanten und 19 Personen aus dem stationären Bereich (n.d. = nicht determiniert; IF = Indexfall).

Eine Person war sowohl im TST als auch in beiden durchflusszytometrischen Analysen positiv, da aber die Konversion im TST schon Jahre zurücklag, wurde auf eine Therapie verzichtet. Eine weitere Person erhielt nach Konversion des TST und Kulturnachweis von *M. tuberculosis* eine dreifache tuberkulostatische Therapie. Antigen-spezifische T Zellen waren nicht nachweisbar. Ein DNA-Fingerprinting der Erreger von Indexfall und dieser Kontaktperson stimmten nicht überein, folglich war die Infektion bei einem anderen Indexfall geschehen. Im stationären Bereich waren 17 Personen mit unauffälligen Testergebnissen. Eine isolierte Reaktivität gegen Tuberkulin wurde als Impfreaktion interpretiert. Eine Person der stationären Gruppe hatte eine Konversion im TST und eine Immunität gegen Tuberkulin und ESAT-6 in der durchflusszytometrischen Analyse, sie erhielt eine Prophylaxe mit Isoniazid.

## 5. Diskussion

In den letzten beiden Jahrzehnten wurden erhebliche Fortschritte im Bereich der Diagnostik der *TBC* und vor allem der latenten *TBC* erreicht. Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit einer parallelen Analyse von funktionellen und phänotypischen Marker von Zellen und hat damit in den letzten Jahren maßgeblich zum Verständnis der Immunologie gegen *M. tuberculosis* beigetragen (FUHRMANN et al., 2008), da diese wesentlich vom zellulären Anteil des adaptiven Immunsystems abhängt. Neben der grundlegenden Erforschung der Immunologie sind auch durchflusszytometrische Assays entwickelt worden, die in der Diagnostik der *TBC* eine Rolle spielen könnten (JANOSSY et al., 2008). Tuberkulin-spezifische CD4 Zellen konnten aus der bronchiolo-alveolären Lavage von 22 Patienten mit kulturell gesicherter, manifester *TBC* nachgewiesen werden (BARRY et al., 2003). Neben Tuberkulin-spezifischen Zellen wurden bei 87% von 15 Patienten mit manifester *TBC* mittels eines durchflusszytometrischen Assays ESAT-6-spezifische CD4 T Zellen aus dem peripheren Blut nachgewiesen (TESFA et al., 2004). In einer Studie an 16 Patienten und 15 Kontrollen erzielte die Verwendung von ESAT-6 zur Stimulation von Antigen-spezifischen CD4 T Zellen aus dem Blut eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 88% für den Nachweis einer manifesten *TBC* (HUGHES et al., 2005). In einer Studie an 17 *TBC*-Patienten und zwölf gesunden Kontrollen konnte neben dem QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold ein durchflusszytometrischer Vollblut-Assay, der methodisch dem vorgestellten Assay sehr ähnlich ist, erfolgreich eingesetzt werden (LEUNG et al., 2009).

Die erwähnten Arbeiten verwendeten durchflusszytometrische Assays zum Nachweis *M. tuberculosis*-spezifischer Zellen bei Patienten mit einer aktiven *TBC*. Zur Diagnostik einer aktiven *TBC* mittels moderner immunologischer Verfahren wurden kürzlich zwei Übersichtsarbeiten publiziert. Die Überlegenheit von T-Spot<sup>®</sup>.TB und QuantiFERON<sup>®</sup>-TB gegenüber dem *TST* in der Diagnostik der aktiven *TBC* in Bezug auf Sensitivität und Spezifität konnte in einer Meta-Analyse von insgesamt 124 Studien gezeigt werden (DIEL et al., 2010). Eine weitere Meta-Analyse von 27 Studien zur Sensitivität und Spezifität der beiden Assays in der Diagnostik der aktiven *TBC* fanden ebenfalls eine Überlegenheit gegenüber dem *TST*, jedoch folgerten die Autoren, dass deren Sensitivität nicht ausreichend ist, um als

Ausschlusstest für eine aktive *TBC* zu dienen (SESTER et al., 2011a). Eine vergleichbare Übersicht über Arbeiten mit durchflusszytometrischen Assays liegt zum aktuellen Zeitpunkt nicht vor. Dies mag zum einen am geringen Umfang eingeschlossener Patienten liegen, vor allem jedoch an dem sehr uneinheitlichen Design der durchflusszytometrischen Assays, die sich bezüglich der Verwendung von Vollblut oder *PBMC*, Inkubationszeiten sowie der Verwendung unterschiedlicher Read-out-Parameter mitunter erheblich unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Tuberkulin- und ESAT-6-spezifische T Zellen von immungesunden Probanden ohne klinischen Anhalt für eine manifeste *TBC* analysiert. Nach sechsständiger Inkubation von Vollblut lassen sich die Zellen ohne vorherige Isolation oder Kultivierung direkt durchflusszytometrisch nachweisen. Es handelt sich um frisch aktivierte, CD69-positive CD4 T Zellen vom Effektor-Memory-Phänotyp (RUTELLA et al., 1999). Die Expression der Th1 Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  wurde als spezifische Aktivierung der Zellen betrachtet. Für insgesamt 199 Messungen konnte eine hochsignifikante Korrelation beider Zytokine gefunden werden. Diese Daten immungesunder Probanden decken sich mit denen einer Studie an Hämodialyse-Patienten, sowie mit denen einer Studie an immunsupprimierten Nierentransplantierten, bei denen mittels des gleichen Assays jeweils sehr gute Korrelationen zwischen der Expression von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  aus Tuberkulin-spezifischen CD4 T-Zellen von 134 beziehungsweise 93 Messungen gefunden werden konnten (SESTER et al., 2004; SESTER et al., 2006). Die Expression von TNF $\alpha$  überstieg die von IFN $\gamma$  um das 1,65fache, und die Betrachtung der Negativkontrollen zeigte eine signifikant höhere Hintergrundaktivität in den Messungen mit TNF $\alpha$ . Diese Tatsache wurde als Hinweis auf eine höhere Spezifität von IFN $\gamma$  für die Antigen-spezifische Aktivierung der Zellen interpretiert. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auf eine parallele Bestimmung beider Zytokine verzichtet. In der bereits erwähnten Arbeit von Hughes et al. wurden die Interleukine 2, 4, 10 und IFN $\gamma$  sowie CD40L als Aktivierungsmarker für ESAT-6-spezifische CD4 T Zellen verwendet, und von 16 Patienten mit aktiver *TBC* zeigten alle positive Testergebnisse in mindestens einem der verwendeten Zytokine. Wurden nur IFN $\gamma$  und CD40L berücksichtigt, erreichte der vorgestellte Assay eine Spezifität von 100% allerdings mit einem entsprechenden Verlust an Sensitivität (HUGHES et al., 2005). Weitere durchflusszytometrische Assays, die verschiedene Zytokine parallel verwenden, zeigen ebenfalls viel versprechende Ergebnisse. Mittels

Durchflusszytometrie gelang es erstmals zu zeigen, dass unbehandelte Patienten mit aktiver *TBC* hauptsächlich ESAT-6- und CFP-10-spezifische Zellen aufweisen, die IFN $\gamma$  alleine oder IFN $\gamma$  und IL-2 parallel sezernieren, während nach erfolgreicher Therapie die Population von Zellen, die beide Zytokine sezerniert zunimmt, und eine neue Population auftritt, die IL-2 alleine sezerniert (MILLINGTON et al., 2007). In einer weiteren Studie wurden mit einem 72-Stunden Assay bei Patienten mit latenter Infektion mit *M. tuberculosis* signifikant höhere Frequenzen von IL-2-positiver CD4 T Zellen nach Stimulation mit Tuberkulin gefunden, als bei Patienten mit aktiver *TBC* (SARGENTINI et al., 2009). Zwei aktuelle Arbeiten konnten in durchflusszytometrischen Assays mit Stimulationen von Vollblut oder *PBMC* durch die Bestimmung von *M. tuberculosis*-spezifischen CD4 T Zellen, die dreifach-positiv für die Zytokine IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-2 sind, signifikant zwischen aktiver und latenter Infektion unterscheiden (SUTHERLAND et al., 2009; CACCAMO et al., 2010). Mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vollblut-Assay konnte unsere Arbeitsgruppe nach Stimulation mit Tuberkulin vergleichbare Ergebnisse zeigen. Betrachtet wurde der prozentuale Anteil IFN $\gamma$ /IL-2-doppelt-positiver Zellen an allen Antigen-spezifischen Zellen. Eine Frequenz doppelt-positiver Zellen unter 56% war mit einer Sensitivität von 70% und einer Spezifität von 100% ein starker Indikator für eine aktive *TBC*, und konnte zwischen aktiver *TBC* und inaktiver Zustände wie latenter Infektion, erfolgreich behandelter *TBC* oder *BCG*-Impfung unterscheiden (SESTER et al., 2011b). Ähnlich hierzu konnte mit einem durchflusszytometrischen Assay nach Stimulation von *PBMC* mit Tuberkulin, ESAT-6 und CFP-10 über Nacht eine Unterscheidung zwischen aktiver Erkrankung und latenter Infektion erzielt werden. Der prozentuale Anteil alleinig TNF $\alpha$ -positiver CD4 T Zellen war das stärkste Unterscheidungsmerkmal, und mit einem Grenzwert von 37,4% alleinig TNF $\alpha$ -positiver CD4 T Zellen konnte zwischen aktiver und latenter *TBC* signifikant unterschieden werden (HARARI et al., 2011). Die erwähnten Arbeiten haben zum Ziel zwischen aktiver *TBC* und inaktiven Stadien der Erkrankung zu diskriminieren. Hierfür werden qualitative Änderungen der Funktionalität von *M. tuberculosis*-spezifischen CD4 T Zellen genutzt, die in Anhängigkeit vom Erkrankungsstadium aufzutreten scheinen. In der vorliegenden Arbeit wurden gesunde, asymptomatische Probanden untersucht und deren quantitative Ausprägung der Immunantwort in Form von Frequenzen Antigen-spezifischer T Zellen, zur Diagnostik der latenten *TBC*, dargestellt. Streit et al. konnten zeigen, dass die Produktion von IFN $\gamma$  durch

Tuberkulin-spezifischen CD4 T Zellen den dominierenden Anteil der Immunantwort latent infizierter Probanden darstellt, während in der aktiven *TBC* eher die Expression von TNF $\alpha$  und CD154 eine dominante Rolle spielt (STREITZ et al., 2011). *IGRAs* wie T-Spot<sup>®</sup>.TB und QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold verwenden ebenfalls sehr erfolgreich IFN $\gamma$  als alleinigen Read-out-Parameter zur quantitativen Diagnostik einer latenten Infektion (LALVANI, 2007). IFN $\gamma$  scheint als Aktivierungsmarker von Antigen-spezifischen CD4 T Zellen im vorgestellten durchflusszytometrischen Assay zum Nachweis spezifischer Zellen geeignet zu sein und der Verzicht auf die Messung von TNF $\alpha$  den Vorteil einer höheren Kosteneffektivität in einem mehr und mehr unter wirtschaftliche Zwänge geratenden Gesundheitssystem zu bieten. Der mögliche Nachteil dieses Vorgehens könnte jedoch ein Verlust an Sensitivität in einem per se hochsensitiven Assay sein.

Die Antigene Tuberkulin und ESAT-6 wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet um CD4 T Zellen zu stimulieren. In 587 Messungen von insgesamt 528 immungesunden Probanden zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen den beiden Antigenen bezüglich ihrer Stimulation von jeweils spezifischen CD4 T Zellen. Ein guter und hochsignifikanter Zusammenhang zwischen Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischen Zellen wurde für Hämodialyse-Patienten mittels des gleichen Assays gefunden (SESTER et al., 2004). Andere Autoren finden einen etwas geringeren Zusammenhang durchflusszytometrisch nachgewiesener Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischer Zellen bei 26 dermatologischen Patienten (NEMETH et al., 2010), der nicht unbedingt methodisch erklärbar ist. Im Kollektiv immungesunder Probanden der vorliegenden Arbeit wurden bei 57,2% der Probanden Tuberkulin-spezifische T Zellen oberhalb der Nachweisgrenze gefunden. In den vorgenannten Arbeiten wurden bei 48,6% der 107 immungesunden Krankenhausmitarbeiter, bei 53,5% der 127 Hämodialyse-Patienten, und bei 52,14% der 117 immunsupprimierten Nierentransplantierten Tuberkulin-spezifische CD4 T Zellen nachgewiesen. Der Median Tuberkulin-spezifischer T Zellen des Kollektivs immungesunder Patienten lag mit 0,26% etwas höher als der von Krankenhausmitarbeitern mit 0,17%, unterschied sich jedoch nicht wesentlich von denen der Hämodialyse-Patienten (0,26%) und der Nierentransplantierten (0,22%) (SESTER et al., 2004; SESTER et al., 2006). Zur Unterscheidung zwischen einer tatsächlichen Infektion und einer *BCG*-Impfung als Ursache der Tuberkulin-Reaktivität wurden die Zellen mit ESAT-6 stimuliert. Von den Tuberkulin-positiven Probanden dieser Arbeit hatten 35,43% ESAT-6-spezifische

Zellen oberhalb der Nachweisgrenze. Bei einer ähnliche Rate Tuberkulin-positiver T Zellen unter den Hämodialyse-Patienten (53,5%) wurden interessanterweise hier jedoch bei 50% aller Patienten mit positiver Tuberkulin-Reaktivität in vitro ESAT-6-spezifische Zellen gefunden (SESTER et al., 2004). Unter den nierentransplantierten Patienten zeigten 52,9% der Tuberkulin-positiven Patienten ESAT-6-spezifische Zellen oberhalb der Nachweisgrenze und unter den Krankenhausmitarbeitern wiederum nur 40,5% (SESTER et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten einer universitären Lungenfachklinik untersucht. Hierbei handelt es sich häufig um Patienten, die einmalig stationär aufgenommen wurden, und deren Risiko einer Exposition gegenüber *M. tuberculosis* damit dem der Normalbevölkerung entsprechen sollte. Demgegenüber geht eine terminale Niereninsuffizienz häufig mit längeren Krankenhausaufenthalten sowie jahrelang mehrmals wöchentlicher Dialysebehandlungen einher, was möglicherweise ein erhöhtes Risiko einer Exposition gegenüber *M. tuberculosis* darstellt und die höhere Rate an ESAT-6-positiven Probanden im Vergleich zu dem Kollektiv der vorliegenden Arbeit erklären kann. Einschränkend bleibt anzumerken, dass die Probanden außer bezüglich einer Immunschwäche und Hinweisen auf eine aktive *TBC* nicht bezüglich anderweitiger Vorerkrankungen evaluiert wurden. Unbekannt ist der Anteil Probanden, die aufgrund von chronischen Erkrankungen regelmäßig in der Lungenklinik stationär aufgenommen waren und damit ebenfalls ein höheres Expositionsrisiko gegenüber *M. tuberculosis* hätten haben können.

Sester et al. zeigten bereits den Zusammenhang der Induration im *TST* mit den Frequenzen Tuberkulin-spezifischen T Zellen in der Untersuchung an 63 Dialyse-Patienten und 56 gesunden Kontrollen (SESTER et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Zusammenhang in einem großen Kollektiv immungesunder Probanden bestätigt werden und darüber hinaus ein, wie zu erwarten, geringfügig schlechterer Zusammenhang zwischen der Induration und der durchflusszytometrischen Frequenz ESAT-6-spezifischer T Zellen gezeigt werden. In einem technisch vergleichbaren Assay wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Induration im *TST* und den Tuberkulin-spezifischen ( $r=0,58$ ) und ESAT-6-spezifischen ( $r=0,4$ ) CD4 T Zellen in einem kleineren Kollektiv von 54 Probanden gefunden, die hierfür nicht getrennt nach aktiver *TBC*, latenter *TBC* oder Kontrollen betrachtet wurden. Die Daten wurden für TNF $\alpha$ -positive CD4 T Zellen beschrieben, Daten für IFN $\gamma$  werden von den Autoren nicht explizit angegeben, aber als ähnlich

bezeichnet (COSMI et al., 2007), und sind aufgrund der sehr guten Korrelation von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  in der vorliegenden Arbeit als vergleichbar anzunehmen. In der bereits erwähnte Arbeit von Patienten mit dermatologischen Erkrankungen wurde ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen Induration im *TST* und Frequenz ESAT-6-spezifischer *PBMC* gefunden, interessanterweise zeigten an diesem kleinen Kollektiv von 26 Patienten ESAT-6-spezifische-, IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -doppelt-positive Zellen die beste Übereinstimmung mit dem *TST* (NEMETH et al., 2010). In wieweit eine mögliche Immunsuppression der Probanden die Ergebnisse dieser Arbeit beeinflusste, kann nicht nachvollzogen werden, da immunsupprimierende Medikamente mitunter bis zwei Wochen vor Anlage des *TST* verabreicht wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine bessere Korrelation der Tuberkulin-spezifischen CD4 T Zellen mit dem *TST* im Vergleich zu den ESAT-6-spezifischen Zellen gefunden. Dies konnte aufgrund der Verwendung des exakt gleichen Antigens Tuberkulin in beiden Assays erwartet werden. Des Weiteren ist eine reine Impfreaktion eines Probanden mit einem positiven *TST* (TISSOT et al., 2005), nicht jedoch mit einem Nachweis einer Immunität gegen ESAT-6 vergesellschaftet (MAHAIRAS et al., 1996). Ein Nachteil der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass der Impfstatus der untersuchten Probanden nicht konsequent und sicher erhoben werden konnte, sodass hier keine Aussage bezüglich des Einflusses von *BCG*-Impfungen auf die Ergebnisse des vorgestellten Assays möglich ist.

Von 315 Probanden stimmten bei 235 (74,6%) die Ergebnisse von *TST* und durchflusszytometrischem Nachweis Tuberkulin-spezifischer Zellen überein. Von 178 Probanden mit negativem *TST* haben 69 Probanden (38,76%; 21,9% aller Probanden) durchflusszytometrisch nachweisbare Tuberkulin-spezifische T Zellen. Eine unspezifische Aktivierung von CD4 T Zellen *in vitro* wurde regelhaft durch die Subtraktion der Zytokin-positiven Zellen aus den Negativkontrollen ausgeschlossen. Nachdem bereits eine höhere Sensitivität des Assays im Vergleich zum *TST* für Hämodialyse-Patienten (SESTER et al., 2004) und immunsupprimierte Patienten (SESTER et al., 2006) gezeigt wurde, legen die Daten der vorliegenden Arbeit nahe, dass auch bei immungesunden Probanden die Sensitivität dieses Assays für den Nachweis einer Immunität gegen Tuberkulin höher ist als die des *TST*. Unklar bleiben allerdings elf von 315 Fällen (3,49%), bei denen trotz eines positiven *TST* die Tuberkulin-spezifische Reaktivität unterhalb des etablierten Grenzwertes blieb. Fünf

dieser Probanden waren grenzwertig positiv im Hauttest, drei jedoch mit einer hoch-positiven Induration von 22, 25 und 27 Millimetern. Ein technisches Versagen der in-vitro-Stimulation stellt eine mögliche Erklärung hierfür dar, zumal Positiv-Kontrollen nicht regelhaft durchgeführt wurden. Unsere Arbeitsgruppe verfügt über sehr umfangreiche Erfahrung mit diesem Assay (SESTER et al., 2000; SESTER et al., 2001; SESTER et al., 2002a; SESTER et al., 2002b; SESTER et al., 2003; SESTER et al., 2004; SESTER et al., 2005; SESTER et al., 2006; WIDMANN et al., 2008; SESTER et al., 2009; SESTER et al., 2011b), sodass diese Möglichkeit sehr unwahrscheinlich ist, jedoch nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann. In einer Studie an 785 nicht *BCG*-geimpften Kunden, die mit einem Angestellten eines Supermarktes mit kulturell nachgewiesener *TBC* in Kontakt waren, führten Arend et al. eine große Umfelduntersuchung zum Vergleich des *TST* mit den beiden *IGRAs* QuantiFERON<sup>®</sup>-TB GOLD und T-Spot<sup>®</sup>.TB durch. Sie beschrieben für Probanden mit einer Reaktivität größer 15mm im *TST* verminderte Sensitivitäten von QuantiFERON<sup>®</sup>-TB GOLD und den T-Spot<sup>®</sup>.TB in der Diagnostik der latenten *TBC* (AREND et al., 2007). Eine mögliche Erklärung der Autoren war die unterschiedliche Inkubationszeit von bis zu 72 Stunden im *TST* und von 16 bis 24 Stunden in den *IGRAs*. Nach Eradikation des Erregers werden T Zellen in den kurzen Stimulationszeiten der in-vitro-Assays nicht mehr aktiviert, Memory-Zellen hingegen könnten in der vergleichsweise langen Inkubationszeit des *TST* jedoch weiterhin aktiviert werden. Denkbar ist dieser Erklärungsansatz auch für den durchflusszytometrischen Assay, gerade vor dem Hintergrund einer noch kürzeren Inkubationszeit von nur sechs Stunden. Der in dieser Arbeit verwendete Grenzwert von 0,05% zytokin-positiver Zellen wurde aus vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe mit diesem Assay übernommen, während andere Autoren niedrigere Grenzwerte von 0,01% zytokin-positiver Zellen (TESFA et al., 2004; STREITZ et al., 2011) oder 0,02% (NEMETH et al., 2010) für ein positives Testergebnis zu Grunde legten. Mit diesen Grenzwerten wären alle Probanden mit hoch-positiven *TST* und drei der Probanden mit grenzwertig positiven *TST* ebenfalls durchflusszytometrisch erfasst worden. Letztlich bleibt diese Beobachtung jedoch unklar, und sollte Anlass für weitere Untersuchungen in diesem Bereich sein, wie auch von Arend et al. in ihrer genannten Untersuchung dargelegt wurde.

Bei 290 Probanden wurden ESAT-6-spezifische T Zellen analysiert und parallel dazu ein *TST* durchgeführt. Von den 124 Probanden mit positiven *TST* wiesen 63

(50,81%; 21,72% aller Probanden) keine ESAT-6-spezifische Zellen auf. Diese Daten spiegeln die Spezifität des ESAT-6 Proteins für *M. tuberculosis* wider. Daher kann von diesen Daten gemäß der Literatur auf eine höhere Spezifität des durchflusszytometrischen Assays im Nachweis einer latenten *TBC* geschlossen werden. Bei 16 von 166 Probanden (9,64%; 5,52% aller Probanden) mit negativem *TST* konnten ESAT-6-spezifische Zellen nachgewiesen werden. Diese Daten sprechen möglicherweise auch bei Immungesunden für eine höhere Sensitivität der Durchflusszytometrie im Vergleich zum *TST* für den Nachweis einer Immunität gegen ESAT-6, und damit auch für den Nachweis einer latenten Infektion mit *M. tuberculosis*. Für *IGRAs* konnte konsistent gezeigt werden, dass sie dem *TST* in der Diagnostik einer latenten *TBC* in Bezug auf die Spezifität überlegen sind. Bezüglich der Sensitivität sind *EliSpot*<sup>®</sup>-basierte Assays dem *TST* überlegen und von *ELISA*-basierten Assays wird angenommen, dass sie mit dem *TST* in Bezug auf die Sensitivität vergleichbar sind (PAI et al., 2008; LALVANI, PAREEK, 2010; SCHLUGER, BURZYNSKI, 2010). In diesem Zusammenhang bleibt noch nachteilig zu erwähnen, dass für die Diagnostik der latenten *TBC* bislang kein valider Goldstandard zur Verfügung steht und dass aus diesem Grund auch in der vorliegenden Arbeit mangels Alternativen lediglich auf den *TST* als Referenz zurückgegriffen werden konnte. Alle Angaben zu Sensitivität und Spezifität in dieser Arbeit beziehen sich daher auf den Vergleich mit dem *TST*. Für die Evaluation der *IGRAs* wurden in sehr aufwendigen Arbeiten exakt definierte Grade der Exposition von Individuen zu Indexfällen verwendet, und diese mit den Ergebnissen des *ELISpot* verglichen. Lalvani et al. haben die Ergebnisse ihres *ELISpot* mit gut definierten, in vier Stufen unterteilten, Graden der Exposition gegenüber einem Indexfall mit *M. tuberculosis* verglichen, und fanden eine wesentlich bessere Korrelation des Grades der Exposition mit den Ergebnissen des *ELISpot* als mit denen von simultan durchgeführten Hauttests (Heaf-Test) (LALVANI et al., 2001a). Ewer et al. führte eine große Studie mit 535 Kontakten zu einem Indexfall an einer Schule durch und definierte die Intensität der Exposition anhand der Klassenzugehörigkeit und der Stundenpläne. Die *ELISpot*-Ergebnisse korrelierten signifikant besser mit der Intensität und Dauer der Exposition gegenüber dem Indexfall als die Hauttest-Ergebnisse (Heaf-Test) (EWER et al., 2003). Leider konnten in der beschriebenen Umfelduntersuchung der vorliegenden Arbeit weder für alle Kontakte einheitlich alle Befunde erhoben werden, noch konnte der Grad der

Exposition eines jeden Kontaktes mit dem Indexfall in einem mit den genannten Arbeiten vergleichbaren Umfang ermittelt werden.

Für *IGRAs* liegen Langzeitbeobachtungen von Probanden mit positiven und negativen Ergebnissen vor, die deren Risiko an einer manifesten *TBC* zu erkranken formulieren und viel versprechende Ergebnisse zeigen. 2008 legten Diel et al. eine longitudinale Studie über zwei Jahre an 601 *TBC*-Kontakten vor und konnten mit dem QuantiFERON®-TB Gold in-tube assay einen hohen prädiktiven Wert für die Entwicklung einer aktiven *TBC* erzielen. 15% der Probanden mit positivem QuantiFERON®-TB Gold in-tube entwickelten im Beobachtungszeitraum eine *TBC*, während dies nur für 2,3% der Probanden mit positivem *TST* der Fall war (DIEL et al., 2008). Drei Jahre später folgte nun eine erneute Publikation mit insgesamt 1.033 Kontaktpersonen, von denen mit positivem QuantiFERON®-TB entwickelten 12,9% im Beobachtungszeitraum eine aktive *TBC*, während dies nur für 3,1% der Probanden mit einer Induration größer 5mm und 4,8% der Probanden mit einer Induration größer 10mm im *TST* der Fall war. Darüber hinaus konnte diese Arbeit erstmalig einen guten, negativen prädiktiven Wert des QuantiFERON®-TB zeigen, da keiner der 413 Probanden mit positivem *TST* und negativem QuantiFERON®-TB im Beobachtungszeitraum eine aktive *TBC* entwickelte (DIEL et al., 2011). Für den T-Spot®.TB konnte in einer Gruppe von Patienten mit Silikose eine Überlegenheit des T-Spot®.TB gegenüber dem *TST* in der Prädiktion einer aktiven *TBC* gefunden werden. Eine aktive *TBC* entwickelten 7,4% der Probanden mit positivem T-Spot®.TB, interessanterweise war hier nur der Nachweis von CFP-10- und nicht ESAT-6-spezifischen Zellen signifikant mit der Entwicklung einer *TBC* vergesellschaftet (LEUNG et al., 2010).

Der nächste logische Schritt in der Evaluation des durchflusszytometrischen Assays sollte nun, analog zum Vorgehen bei den *IGRAs*, der Nachweis einer Assoziation eines positiven Testergebnissen mit der Entwicklung der aktiven Erkrankung sein, und damit der Frage nach einer möglichen Überlegenheit des durchflusszytometrischen Assays gegenüber dem *TST* in der Prädiktion einer aktiven *TBC*.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Domäne der Durchflusszytometrie genutzt, um den vorgestellten Assay weitergehend zu evaluieren. Die Sekretion von Zytokinen aus aktivierten Zellen wurde blockiert, um diese der einzelnen Zelle zuordnen zu können. Für eine quantitative Diagnostik in der klinischen Routine mag dies von

untergeordneter Relevanz sein, bietet aber die Möglichkeit einer immunologischen Charakterisierung der betreffenden Zelle im Rahmen wissenschaftlich orientierter Fragestellungen. Die Zellen wurden bezüglich ihrer Expression des Differenzierungsmarkers CD27 untersucht, der mit zunehmender Differenzierung einer CD4 T Zelle in Richtung Effektor-Zelle verloren geht (APPAY et al., 2008). 82% aller CD45RO positiven CD4 Memory-Zellen eines Probanden sind CD27-positiv, nach erneuter oder chronischer Antigenstimulation erfolgt eine funktionelle Differenzierung und CD27 geht verloren (DE JONG et al., 1992). Im Median waren 89,02% aller CD4 T Zellen der Probanden dieses Kollektivs CD27-positiv. Im Vergleich der CD4 T Zellen mit Spezifität gegen *CMV* und Antigene des *M. tuberculosis* zeigte sich, dass sich spezifische Zellpopulationen in ihrer phänotypischen Zusammensetzung unterscheiden können. Während *CMV*-spezifischen Zellen, als Ausdruck einer chronischen Antigenstimulation im Rahmen der persistierenden Infektion mit *CMV*, einen geringeren Anteil CD27-positiver Zellen aufweisen, haben *M. tuberculosis*-spezifische CD4 T Zellen einen höheren Anteil CD27-positiver Zellen. Tuberkulin-spezifische Zellen können aus einer *BCG*-Impfung oder aber aus einer latenten Infektion resultieren. Im Falle der *BCG*-Impfung findet in vivo keinerlei chronische Antigenexposition statt. Im Falle einer latenten Infektion, gleiches gilt für ESAT-6-spezifische Zellen, findet eine im Vergleich zur *CMV*-Infektion wesentlich geringere Antigenexposition statt, was sich in einem höheren Anteil CD27-positiver, unreiferer Zellen widerspiegelt. Mittels Stimulation von *PBMC* über neun Tage konnte gezeigt werden, dass es sich bei circa 80% der ESAT-6- und CFP-10-spezifischen Zellen von Patienten mit aktiver *TBC* um CD27-negative Effektor-Memory-Zellen handelt, die circa 80% der spezifischen Zellpopulationen ausmachen, während bei Kontrollprobanden mit positivem *TST* hauptsächlich CD27-positiv Zellen aktiviert werden (GOLETTI et al., 2006). Zwischenzeitlich konnte sogar gezeigt werden, dass mittels der Bestimmung von CD27 auf Tuberkulin-spezifischen Zellen eine signifikante Diskriminierung zwischen Patienten mit aktiver *TBC* (hoher Anteil CD27-negativer Zellen) und gesunden Kontrollen (geringer Anteil CD27-negativer Zellen) erreicht wird (STREITZ et al., 2007). Der Anteil CD27-negativer Zellen von als latent infiziert eingestuften Probanden lagen in einem Bereich von ungefähr 50% aller reaktiven Zellen (genaue Daten sind in der Arbeit nicht verfügbar). Interessanterweise wurde eine signifikante Korrelation der Anteile CD27-negativer Zellen an Tuberkulin- und ESAT-6-reaktiven Zellen gefunden. Eine ähnliche mediane

Expression von Tuberkulin- und ESAT-6-spezifischen Zellen konnte auch in der vorliegenden Arbeit gefunden werden. Jiang et al. verwendeten *BCG* als Stimulus und die Expression von CD154 als Marker einer Antigen-spezifischen Aktivierung von CD4 T Zellen. Sie fanden ebenfalls eine signifikant verringerte Expression von CD27 auf spezifischen Zellen von Patienten mit kulturell nachgewiesener aktiver *TBC* im Vergleich zu gesunden Kontrollen, und einen noch stärkeren Verlust von CD27 auf Zellen von Probanden mit persistierend aktiver *TBC* (JIANG et al., 2010). Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie an 26 Patienten mit aktiver *TBC* und jeweils 30 gesunden Kontrollen und als latent infiziert eingestuft, gesunden Kontakten kein Unterschied in der Expression von CD27 auf Tuberkulin-, ESAT-6-, und CFP-10-spezifischen CD4 T Zellen gefunden werden (RUEDA et al., 2010). Zu berücksichtigen ist bei dieser Arbeit die vergleichsweise sehr lange Inkubationszeit von bis zu 144 Stunden, die möglicherweise zu einer verstärkten Aktivierung von undifferenzierteren Zellen und weniger von hoch differenzierten Effektor-Memory-Zellen führen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden gesunde, asymptomatische Probanden untersucht. Deren rein quantitative Ausprägung der Immunantwort, als Frequenz Antigen-spezifischer T Zellen ausgedrückt, zeigte nur einen sehr geringen Zusammenhang mit dem Reifegrad der reaktiven Zellen in Form von der CD27-Expression auf Tuberkulin-reaktiven Zellen. In der erwähnten Arbeit von Streit et al. wurde keinerlei Korrelation zwischen der Expression von CD27 auf den reaktiven T Zellen mit der quantitativen Reaktivität gegen Tuberkulin, weder in Form von Frequenzen spezifischer Zellen noch von IFN $\gamma$ -Konzentrationen aus dem Überstand nach Stimulation von *PBMC*, gefunden (STREITZ et al., 2007). Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang zwischen der Induration im *TST* und der Expression von CD27 auf Tuberkulin-spezifischen T Zellen gefunden werden. Wie schon eingangs diskutiert, ist mittels verschiedener qualitativer Analysen der Immunantwort eine Diskriminierung zwischen den verschiedenen Stadien der *TBC* möglich. Die vorliegende Arbeit wählte einen quantitativen Ansatz im Nachweis einer Immunantwort bei asymptomatischen Probanden, und die Analyse des Differenzierungsgrades von *M. tuberculosis*-spezifischen Zellen scheint in keinem Zusammenhang mit der quantitativen Ausprägung zu stehen und ist daher in diesem Ansatz von keinem weiteren Nutzen.

Die *IGRAs* stellen eine Alternative in der Diagnostik der latenten *TBC* dar, daher wurden in einer Subgruppe von 21 Probanden der *EliSpot*<sup>®</sup> parallel zur

Durchflusszytometrie durchgeführt. Es fand sich eine signifikante Korrelation beider Tests, und eine Hochrechnung der durchflusszytometrisch ermittelten Daten auf eine vergleichbare Bezugsgrundlage von 200.000 *PBMC* erzielte keine Verbesserung der Ergebnisse. Arbeiten die durchflusszytometrische Assays mit einem *IGRA* vergleichen sind bisher nur in sehr geringem Umfang publiziert worden. Leung et al. haben in ihrer bereits erwähnten Studie eine vergleichbare Korrelation der IFN $\gamma$ -Produktion, gemessen mittels QuantiFERON<sup>®</sup>-TB, mit den Antigen-spezifischen CD4 T Zellen an 17 *TBC*-Patienten gefunden. Sie konnten darüber hinaus einen Vorteil ihres durchflusszytometrischen Assays im Vergleich zum QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold in Bezug auf Sensitivität (94,1% versus 88,2%) sowie auf Spezifität (36,4% versus 18%) im Nachweis einer aktiven *TBC* herausarbeiten (LEUNG et al., 2009). Eine höhere Sensitivität eines weiteren durchflusszytometrischen Assays zur Detektion von *M. tuberculosis*-spezifischen CD4 T Zellen im Vergleich zum QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold konnte kürzlich bestätigt werden (WON, PARK, 2010). Der Vergleich durchflusszytometrischer Assays mit den gängigen *IGRAs* ist bisher insgesamt als schwierig zu werten, da mit T-Spot<sup>®</sup>.TB und QuantiFERON<sup>®</sup>-TB zwei hoch standardisierte *IGRAs* kommerziell angeboten werden, die Durchflusszytometrie jedoch bisher wenig standardisiert ist und verschiedene Autoren eigene Assays mit sehr unterschiedlichem Design verwenden. Eine Subgruppe mit 21 Probanden ist sicherlich zu klein, um valide Aussagen bezüglich Sensitivität und Spezifität des durchflusszytometrischen Assays im Vergleich zum EliSpot<sup>®</sup> treffen zu können. Größere Studien, die durchflusszytometrische Daten mit Ergebnissen des EliSpot<sup>®</sup>-Assays und des QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold vergleichen, werden derzeit in unserer Arbeitsgruppe sowohl für immungesunde Probanden als auch für Immungeschwächte durchgeführt und bieten somit eine Möglichkeit zur weiteren Evaluation des vorgestellten, durchflusszytometrischen Assays anhand der gut untersuchten *IGRAs*. In dieser Studie wird der in der Literatur zwischenzeitlich sehr gut evaluierte T-Spot<sup>®</sup>.TB anstelle des EliSpot<sup>®</sup> verwendet. In einer Arbeit von Franken et al. wurden 313 T-Spot<sup>®</sup>.TB von vier unabhängigen Untersuchern aus zwei Instituten lichtmikroskopisch sowie von zwei automatisierten Readern ausgewertet und dabei signifikante Variationen der Ergebnisse gefunden (FRANKEN et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit korrelierten die Ergebnisse unterschiedlicher Untersucher für beide Assays insgesamt in sehr hohem Maße. Die durchflusszytometrischen Daten zeigen eine minimal bessere Korrelation zumindest im Vergleich zu den CFP-

10 Daten des EliSpot<sup>®</sup>. Dies könnte sich in Einklang mit den Daten von Franken et al. erklären, da in der lichtmikroskopischen Auswertung viel subjektiver Spielraum für die Ergebnisse bleibt, während in der Durchflusszytometrie lediglich das initiale gating der Zellen subjektiven Spielraum zulässt. Daten zu interindividuellen Varianz der Ergebnisse von durchflusszytometrischen Assays in Abhängigkeit von persönlichen gating-Strategien liegen aktuell nicht vor, die Daten der vorliegenden Arbeit weisen jedoch darauf hin, dass dies die Ergebnisse größtenteils unbeeinflusst lässt.

In einer Verlaufskontrolle der Tuberkulin-spezifischen CD4 T Zellen nach Anlage des *TST* an vier Probanden konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der maximalen klinischen Induration die Anzahl zirkulierender Zellen im Blut vermindert ist und dass sie nach Abklingen der Induration wieder ansteigt. Die untersuchte Subgruppe von vier Probanden war sicherlich zu klein um eine statistische Signifikanz herauszuarbeiten. Diese Befunde gehen jedoch einher mit Beobachtungen an HIV-Patienten, die zeigen, dass während eines *TST* in der Haut CD45RO-positive CD4 T Zellen akkumulieren, und dass die Anzahl der in eine Induration infiltrierte Zellen hochsignifikant mit der Größe der Induration korrelieren (SARRAZIN et al., 2009). Interessanterweise wurde eine Asynchronität zwischen dem klinischen und dem zellulären Peaks im *TST* nachgewiesen. So fand sich der Peak CD45RO-positiver CD4 T Zellen erst sieben Tage nach Inokulation des Antigens in die Haut, während die klinische Induration bereits nach 72 Stunden ihr Maximum fand (REED et al., 2004). Für die Praxis gilt daher, dass eine Blutentnahme zur durchflusszytometrischen Bestimmung Antigen-spezifischer T Zellen nicht während der Induration eines *TST* vorgenommen werden sollte. Die Intention einen positiven *TST* durch einen in-vitro-Assay zu bestätigen, könnte so zu einem falsch negativen Ergebnis führen, wenn Vollblut für den Assay am Tag des Ablesens eines positiven *TST* entnommen wird. Dieser Fehler ist in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen, da die Entnahme von Vollblut und Anlage des *TST* simultan am gleichen Tag erfolgten. Diese Ergebnisse sind jedoch unmittelbar von praktischer Relevanz, da das National Institute of Health and Clinical Excellence in Großbritannien in seiner Leitlinien zur Diagnostik der *TBC* empfiehlt, einen *IGRA* zur Bestätigung eines positiven *TST* durchzuführen (NICE, 2011). Darüber hinaus konnte die Kosteneffektivität eines dualen Screeningverfahrens unter sequentieller Verwendung von *TST* und eines *IGRA* (T-Spot<sup>®</sup>-TB oder QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold in tube) nachgewiesen werden (POORAN et al., 2010), sodass sich ein solches Vorgehen in

der Praxis durchsetzen könnte, und die Beobachtungen dieser Arbeit bei der Entnahme von Vollblut für eine in-vitro-Stimulation unbedingt beachtet werden sollte. Im Verlauf der Untersuchungen für diese Arbeit fiel ein Proband mit einer Frequenz Tuberkulin-spezifischer CD4 T Zellen von maximal 38,98% und einer solchen ESAT-6-spezifischer Zellen von maximal 41,57% auf, die sich in abnehmender Intensität über zwei Jahre verfolgen und mittels drei weiterer immunologischer Assays nachvollziehen ließ. Da der Proband ursprünglich zur Abklärung von Hämoptysen aufgenommen wurde, lag vor dem Hintergrund einer solch massiven Reaktivität in vitro eine manifeste *TBC* nahe, die jedoch mittels Sputumkultur nicht nachgewiesen werden konnte. In einem, dem in der vorliegenden Arbeit sehr ähnlichen Assay mit einer Inkubationszeit von ebenfalls sechs Stunden, überschritten die Frequenzen Tuberkulin-spezifischer CD69- und IFN $\gamma$ - doppelpositiver CD4 T Zellen von 17 Patienten mit aktiver *TBC* nicht 1,0% und die ESAT-6-spezifischer Zellen nicht 0,2% (HUGHES et al., 2005). Für Patienten mit einer aktiven *TBC* wurden in einem sehr ähnlichen Assay im Median 1,1% CD69- und IFN $\gamma$ - doppelpositive CD4 T Zellen nach Stimulation mit Tuberkulin nachgewiesen, CD69- und TNF $\alpha$ - doppelpositive CD4 T Zellen lagen im Median bei 1,2% und die Mediane der Patienten mit latenter *TBC* lagen noch darunter (COSMI et al., 2007). Diese Daten veranschaulichen die außergewöhnliche Dimension der Immunantwort des Probanden. In einer Gruppe von 161 gesunden Probanden mit serologisch nachgewiesener *CMV*-Infektion konnte mittels des gleichen durchflusszytometrischen Assays eine maximale Frequenz von 43,8% reaktiven Zellen beobachtet werden, die oligoklonalen Ursprunges waren (SESTER et al., 2002b). Interessanterweise wiesen die Patienten in dieser Studie Zellen des gleichen Phänotyps auf und ebenfalls eine Expression von Th1 Zytokinen, wie der beschriebene Proband. Kein Patient dieser Studie, ebenso wenig wie der beschriebene Proband, wies einen klinischen Anhalt für eine akute oder chronische Infektion auf. Während 11% der Patienten der *CMV*-Studie eine Reaktivität über 10% der CD4 T Zellen aufwiesen, war der beschriebene Proband unter 528 getesteten Probanden der Einzige mit einer solch hohen Frequenz reaktiver Zellen. Erstaunlich ist das wiederholt negative Ergebnis des *TST*, trotz einer solch massiven Reaktivität gegen das gleiche Antigen in vitro. Eine für die *IGRAs* nachgewiesene höhere Sensitivität im Vergleich zum *TST* im Nachweis von Tuberkulin-spezifischen Zellen kommt wohl vor dem Hintergrund einer solch massiven Reaktivität nicht in Frage. Patienten, die trotz nachgewiesener Immunität

gegen Tuberkulin keine Reaktion im *TST* zeigen, sind beschrieben worden (MCMURRAY, ECHEVERRI, 1978). Fehlende Reaktivität im *TST* könnte auf einer verminderten Expression von *cutaneous lymphocyte antigen* (CLA), einem homing-receptor zur Einwanderung von T Zellen in die Haut, beruhen (MAGNANI et al., 2000). In unserer Arbeitsgruppe konnten wir jedoch auch auf Tuberkulin-spezifischen T Zellen von *TST*-positiven Probanden eine verminderte Expression von CLA finden (Daten nicht gezeigt), sodass nicht klar ist, ob eine solche tatsächlich einen negativen *TST* erklären könnte. Bei der zuvor erwähnten durchflusszytometrischen Untersuchung von Tuberkulin-spezifischen CD4 T Zellen, die aus dem Punktat der Induration von *TST* gewonnen wurde, konnte gezeigt werden, dass nicht alle Klone spezifischer Zellen, die im Blut zirkulieren, in der Hautläsion erscheinen. Dies war nur für 44-85% der CD4 T Zell-Klone der Fall (REED et al., 2004). In einem externen Labor konnte die Monoklonalität der ESAT-6-Peptid-2-spezifischen Zellen nachgewiesen werden. Vor diesem Hintergrund ist es denkbar, dass es sich um einen solchen Klon handelt, der nicht in die Haut infiltriert, und daher keinerlei Induration entstehen konnte.

Nachdem die gesamte Reaktivität gegen ein einzelnes Epitop aus dem ESAT-6-Protein besteht, könnte möglicherweise eine bislang unbekannte Kreuzreaktivität mit einem Umweltantigen bestehen. Zum einen hatte der Proband jedoch anamnestisch keinerlei Hinweis für eine allergische Disposition, zum anderen erklärt dies nicht das massive Auftreten dieser Zellen. Die Entstehung dieser spezifischen Zellen aufgrund eines vorherigen Kontaktes mit *M. tuberculosis* wird von der Tatsache untermauert, dass sich eine spezifische Immunantwort gegen das *M. tuberculosis*-spezifische Antigen CFP-10 nachweisen liess.

Klonale Expansion von T Zellen kann ein Indikator für ein T Zell-Lymphom oder – Leukämie darstellen (MEYERSON, 2010). Es fand sich im beschriebenen Fall jedoch kein Anhalt für eine maligne Erkrankung, zumal die Zellen voll funktionsfähig und über nahezu ein Jahr stabil reproduzierbar waren. Eine lympho-proliferative Erkrankung mit Expansion eines Klons von CD4 T Zellen mit zufälliger Spezifität gegen das getestete Antigen wäre eine Erklärung, vergleichbar mit dem prä-malignen Auftreten von monoklonalen Plasmazellen im Knochenmark im Rahmen der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (*MGUS*) (KYLE, RAJKUMAR, 2006). Solche T Zell-Proliferationen unklarer Signifikanz (*MTUS*) wurden bereits beschrieben und treten in höherem Alter zunehmend auf (GRUNEWALD et al., 1992;

POSNETT et al., 1994; GNIADDECKI, LUKOWSKY, 2005), die antigene Spezifität dieser Zellen wurde jedoch nie identifiziert. Bei den hier beschriebenen Zellen könnte es sich um den ersten Fall einer *MTUS* mit bekannter antigener Spezifität handeln. Mit diesem Fall wurde gezeigt, dass mit dem vorgestellten Assay zu untersuchende Antigene problemlos variiert werden können und eine immunologische Charakterisierung der Zellen möglich ist, die zum weiteren Verständnis der Ergebnisse dieser relativ neuen Diagnostikmethoden beiträgt.

Diese Arbeit untersuchte ein großes Kollektiv von Probanden mit einer hohen Rate an positiven Ergebnissen. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass der Nachweis Antigen-spezifischer T Zellen lediglich eine immunologische Auseinandersetzung mit dem Bakterium nachweist, wenn auch mit dem Nachweis der Immunität gegen ESAT-6 eine hohe Spezifität für *M. tuberculosis* erreicht wird. Wie für den *TST* und die *IGRAs* bereits beschrieben, ist eine solche positive Immunantwort nicht beweisend für die Existenz von lebenden, vermehrungsfähigen Erregern im Körper (MACK et al., 2009). Kürzlich konnte darüber hinaus die Persistenz von *M. tuberculosis*-spezifischen T Zellen über mehrere Jahrzehnte nach einer antituberkulösen Chemotherapie gezeigt werden (TAPANINEN et al., 2010). Ob dies auf eine unvollständige Eradikation der Erreger oder ein Persistieren der betreffenden Zellen ohne antigene Stimulation zurück zu führen ist, konnte nicht abschließend beantwortet werden. Einige Autoren haben die klassische Unterteilung in aktive oder latente Infektion verlassen, und schlagen ein dynamischeres Modell der Infektion mit *M. tuberculosis* vor, welches ein kontinuierliches Spektrum von klinisch manifester Erkrankung über Stadien der subklinischen Infektion mit oder ohne replizierende Erreger, über die Eradikation des Erregers mit persistierender Immunität bis hin zur Persistenz der Immunität nach vollständiger Eradikation der Erreger umfasst (BARRY et al., 2009; YOUNG et al., 2009). Daher sollten *IGRAs* oder die durchflusszytometrische Analyse spezifischer T Zellen lediglich solchen Patienten zukommen, die aufgrund einer nachgewiesenen Exposition gegenüber *M. tuberculosis* dem Risiko einer Übertragung ausgesetzt waren, durch ein erhöhtes Risiko der Manifestation der *TBC* von einer Chemoprophylaxe profitieren und bereit sind, eine solche über den empfohlenen Zeitraum konsequent durchzuführen (MACK et al., 2009). Wie kürzlich für die *IGRAs* gefordert (LANGE, RIEDER, 2011), sollte auch für die Durchflusszytometrie gelten: "Intention to test is Intention to treat".

## 6. Literaturverzeichnis

1. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M (2008) Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 73:975-983
2. Arend SM, Thijsen SF, Leyten EM, Bouwman JJ, Franken WP, Koster BF, Cobelens FG, van Houte AJ, Bossink AW (2007) Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 175:618-627
3. Arend SM, van Dissel JT (2002) Evidence of endogenous reactivation of tuberculosis after a long period of latency. *J Infect Dis* 186:876-877
4. Barry CE, 3rd, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, Schnappinger D, Wilkinson RJ, Young D (2009) The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol* 7:845-855
5. Barry SM, Lipman MC, Bannister B, Johnson MA, Janossy G (2003) Purified protein derivative-activated type 1 cytokine-producing CD4+ T lymphocytes in the lung: a characteristic feature of active pulmonary and nonpulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 187:243-250
6. Bass JB, Jr., Farer LS, Hopewell PC, O'Brien R, Jacobs RF, Ruben F, Snider DE, Jr., Thornton G (1994) Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. American Thoracic Society and The Centers for Disease Control and Prevention. *Am J Respir Crit Care Med* 149:1359-1374
7. Bothamley GH, Ditiu L, Migliori GB, Lange C (2008) Active case finding of tuberculosis in Europe: a Tuberculosis Network European Trials Group (TBNET) survey. *Eur Respir J* 32:1023-1030
8. Breinig T, Sester M, Sester U, Meyerhans A (2006) Antigen-specific T cell responses: determination of their frequencies, homing properties, and effector functions in human whole blood. *Methods* 38:77-83
9. Brodie D, Schluger NW (2005) The diagnosis of tuberculosis. *Clin Chest Med* 26:247-271
10. Caccamo N, Guggino G, Joosten SA, Gelsomino G, Di Carlo P, Titone L, Galati D, Bocchino M, Matarese A, Salerno A, Sanduzzi A, Franken WP, Ottenhoff TH, Dieli F (2010) Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Immunol* 40:2211-2220

11. Chan J, Flynn J (2004) The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clin Immunol* 110:2-12
12. Cobelens FG, Egwaga SM, van Ginkel T, Muwinge H, Matee MI, Borgdorff MW (2006) Tuberculin skin testing in patients with HIV infection: limited benefit of reduced cutoff values. *Clin Infect Dis* 43:634-639
13. Codecasa L, Mantegani P, Galli L, Lazzarin A, Scarpellini P, Fortis C (2006) An in-house RD1-based enzyme-linked immunospot-gamma interferon assay instead of the tuberculin skin test for diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol* 44:1944-1950
14. Cook DN, Bottomly K (2007) Innate immune control of pulmonary dendritic cell trafficking. *Proc Am Thorac Soc* 4:234-239
15. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Frosali F, Angeli R, Mazzetti M, Vultaggio A, Matucci A, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F (2007) Detection by flow cytometry of ESAT-6- and PPD-specific circulating CD4+ T lymphocytes as a diagnostic tool for tuberculosis. *Int Arch Allergy Immunol* 143:1-9
16. Daniel TM (2006) The history of tuberculosis. *Respir Med* 100:1862-1870
17. De Jong R, Brouwer M, Hooibrink B, Van der Pouw-Kraan T, Miedema F, Van Lier RA (1992) The CD27- subset of peripheral blood memory CD4+ lymphocytes contains functionally differentiated T lymphocytes that develop by persistent antigenic stimulation in vivo. *Eur J Immunol* 22:993-999
18. Delves PJ, Roitt IM (2000a) The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343:37-49
19. Delves PJ, Roitt IM (2000b) The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 343:108-117
20. Dheda K, Schwander SK, Zhu B, van Zyl-Smit RN, Zhang Y (2010) The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. *Respirology* 15:433-450
21. Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Niemann S, Nienhaus A (2008) Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 177:1164-1170
22. Diel R, Loddenkemper R, Niemann S, Meywald-Walter K, Nienhaus A (2011) Negative and Positive Predictive Value of a Whole-Blood Interferon- $\gamma$  Release Assay for Developing Active Tuberculosis: An Update. *Am J Respir Crit Care Med* 183:88-95

23. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A (2010) Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. *Chest* 137:952-968
24. Dinser R, Fousse M, Sester U, Albrecht K, Singh M, Kohler H, Muller-Ladner U, Sester M (2008) Evaluation of latent tuberculosis infection in patients with inflammatory arthropathies before treatment with TNF-alpha blocking drugs using a novel flow-cytometric interferon-gamma release assay. *Rheumatology* 47:212-218
25. Doherty TM, Demissie A, Olobo J, Wolday D, Britton S, Eguale T, Ravn P, Andersen P (2002) Immune responses to the Mycobacterium tuberculosis-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* 40:704-706
26. Ehrt S, Schnappinger D (2009) Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cell Microbiol* 11:1170-1178
27. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, Bryant G, Waller S, Andersen P, Monk P, Lalvani A (2003) Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 361:1168-1173
28. Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Roversi P, Piro R, Meacci M, Meccugni B, Dori IM, Andreani A, Bergamini BM, Mussini C, Rumpianesi F, Fabbri LM, Richeldi L (2006) Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with Mycobacterium tuberculosis: a prospective study. *Lancet* 367:1328-1334
29. Franken WP, Thijsen S, Wolterbeek R, Bouwman JJ, el Bannoudi H, Kik SV, van Dissel JT, Arend SM (2009) Variation in T-SPOT.TB spot interpretation between independent observers from different laboratories. *Clin Vaccine Immunol* 16:1439-1442
30. Fuhrmann S, Streitz M, Kern F (2008) How flow cytometry is changing the study of TB immunology and clinical diagnosis. *Cytometry A* 73:1100-1106
31. Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, Lalloo U, Zeller K, Andrews J, Friedland G (2006) Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* 368:1575-1580
32. Gey van Pittius NC, Sampson SL, Lee H, Kim Y, van Helden PD, Warren RM (2006) Evolution and expansion of the Mycobacterium tuberculosis PE and PPE

multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (esx) gene cluster regions. *BMC Evol Biol* 15;6:95

33. Gniadecki R, Lukowsky A (2005) Monoclonal T-cell dyscrasia of undetermined significance associated with recalcitrant erythroderma. *Arch Dermatol* 141:361-367

34. Goletti D, Butera O, Bizzoni F, Casetti R, Girardi E, Poccia F (2006) Region of difference 1 antigen-specific CD4+ memory T cells correlate with a favorable outcome of tuberculosis. *J Infect Dis* 194:984-992

35. Grunewald J, Jeddi-Tehrani M, Dersimonian H, Andersson R, Wigzell H (1992) A persistent T cell expansion in the peripheral blood of a normal adult male: a new clinical entity? *Clin Exp Immunol* 89:279-284

36. Harari A, Rozot V, Enders FB, Perreau M, Stalder JM, Nicod LP, Cavassini M, Calandra T, Blanchet CL, Jaton K, Faouzi M, Day CL, Hanekom WA, Bart PA, Pantaleo G (2011) Dominant TNF-alpha(+) Mycobacterium tuberculosis-specific CD4(+) T cell responses discriminate between latent infection and active disease. *Nat Med* 17:372-376

37. Harries AD, Dye C (2006) Tuberculosis. *Ann Trop Med Parasitol* 100:415-431

38. Havlir DV, Barnes PF (1999) Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 340:367-373

39. Horsburgh CR, Jr. (2004) Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States. *N Engl J Med* 350:2060-2067

40. Houk VN, Baker JH, Sorensen K, Kent DC (1968) The epidemiology of tuberculosis infection in a closed environment. *Arch Environ Health* 16:26-35

41. Huebner RE, Schein MF, Bass JB, Jr. (1993) The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis* 17:968-975

42. Hughes AJ, Hutchinson P, Gooding T, Freezer NJ, Holdsworth SR, Johnson PD (2005) Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection using ESAT-6 and intracellular cytokine cytometry. *Clin Exp Immunol* 142:132-139

43. Janeway C, Travers P (2005) Immunobiology. The immune system in health and disease, 6th edn (New York, Garland Science Publishing).

44. Janossy G, Barry SM, Breen RA, Hardy GA, Lipman M, Kern F (2008) The role of flow cytometry in the interferon-gamma-based diagnosis of active tuberculosis and its coinfection with HIV-1--A technically oriented review. *Cytometry B Clin Cytom* 74 Suppl 1:S141-151

45. Jiang J, Wang X, Cao Z, Liu Y, Dong M, Tong A, Cheng X (2010) Reduced CD27 expression on antigen-specific CD4+ T cells correlates with persistent active tuberculosis. *J Clin Immunol* 30:566-573
46. Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM, Haller O, Eckert J, Deplazes P (2010) *Medizinische Mikrobiologie*, 12. Auflage (Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG).
47. Keane J (2004) Tumor necrosis factor blockers and reactivation of latent tuberculosis. *Clin Infect Dis* 39:300-302
48. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, Siegel JN, Braun MM (2001) Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 345:1098-1104
49. Keeler E, Perkins MD, Small P, Hanson C, Reed S, Cunningham J, Aledort JE, Hillborne L, Rafael ME, Girosi F, Dye C (2006) Reducing the global burden of tuberculosis: the contribution of improved diagnostics. *Nature* 444 Suppl 1:49-57
50. Khader SA, Cooper AM (2008) IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine* 41:79-83
51. Kirby AC, Coles MC, Kaye PM (2009) Alveolar macrophages transport pathogens to lung draining lymph nodes. *J Immunol* 183:1983-1989
52. Klein J, Sato A (2000a) The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 343:702-709
53. Klein J, Sato A (2000b) The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med* 343:782-786
54. Klote MM, Agodoa LY, Abbott K (2004) Mycobacterium tuberculosis infection incidence in hospitalized renal transplant patients in the United States, 1998-2000. *Am J Transplant* 4:1523-1528
55. Kursar M, Koch M, Mittrucker HW, Nouailles G, Bonhagen K, Kamradt T, Kaufmann SH (2007) Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 178:2661-2665
56. Kyle RA, Rajkumar SV (2006) Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 134:573-589
57. Lalvani A (2007) Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy. *Chest* 131:1898-1906
58. Lalvani A, Pareek M (2010) A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection. *Br Med Bull* 93:69-84

59. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ, Reece WH, Latif M, Pasvol G, Hill AV (2001a) Enhanced contact tracing and spatial tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 357:2017-2021
60. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AV (2001b) Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 163:824-828
61. Lange C, Rieder HL (2011) Intention to test is intention to treat. *Am J Respir Crit Care Med* 183:3-4
62. Leung CC, Yam WC, Yew WW, Ho PL, Tam CM, Law WS, Au KF, Tsui PW (2010) T-Spot.TB outperforms tuberculin skin test in predicting tuberculosis disease. *Am J Respir Crit Care Med* 182:834-840
63. Leung WL, Law KL, Leung VS, Yip CW, Leung CC, Tam CM, Kam KM (2009) Comparison of intracellular cytokine flow cytometry and an enzyme immunoassay for evaluation of cellular immune response to active tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 16:344-351
64. Lillebaek T, Dirksen A, Baess I, Strunge B, Thomsen VO, Andersen AB (2002) Molecular evidence of endogenous reactivation of Mycobacterium tuberculosis after 33 years of latent infection. *J Infect Dis* 185:401-404
65. Lillebaek T, Dirksen A, Vynnycky E, Baess I, Thomsen VO, Andersen AB (2003) Stability of DNA patterns and evidence of Mycobacterium tuberculosis reactivation occurring decades after the initial infection. *J Infect Dis* 188:1032-1039
66. Lönard BM, Sester M, Sester U, Pees HW, Mueller-Lantzsch N, Kohler H, Gartner BC (2007) Estimation of human herpesvirus 8 prevalence in high-risk patients by analysis of humoral and cellular immunity. *Transplantation* 84:40-45
67. Loudon RG, Spohn SK (1969) Cough frequency and infectivity in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 99:109-111
68. Mack U, Migliori GB, Sester M, Rieder HL, Ehlers S, Goletti D, Bossink A, Magdorf K, Holscher C, Kampmann B, Arend SM, Detjen A, Bothamley G, Zellweger JP, Milburn H, Diel R, Ravn P, Cobelens F, Cardona PJ, Kan B, Solovic I, Duarte R, Cirillo DM, C. Lange for the TBNET (2009) LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis? A TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 33:956-973

69. Magnani ZI, Confetti C, Besozzi G, Codecasa LR, Panina-Bordignon P, Lang R, Rossi GA, Pardi R, Burastero SE (2000) Circulating, Mycobacterium tuberculosis-specific lymphocytes from PPD skin test-negative patients with tuberculosis do not secrete interferon-gamma (IFN-gamma) and lack the cutaneous lymphocyte antigen skin-selective homing receptor. *Clin Exp Immunol* 119:99-106
70. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK (1996) Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis. *J Bacteriol* 178:1274-1282
71. Marks SM, Taylor Z, Qualls NL, Shrestha-Kuwahara RJ, Wilce MA, Nguyen CH (2000) Outcomes of contact investigations of infectious tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 162:2033-2038
72. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A (2005) Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. *MMWR Recomm Rep* 54:49-55
73. Mazurek M, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K (2010) Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection - United States, 2010. *MMWR Recomm Rep* 59:1-25
74. McMurray DN, Echeverri A (1978) Cell-mediated immunity in anergic patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 118:827-834
75. Menzies D, Pai M, Comstock G (2007) Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med* 146:340-354
76. Meyerson HJ (2010) A practical approach to the flow cytometric detection and diagnosis of T-cell lymphoproliferative disorders. *Lab Hematol* 16:32-52
77. Millington KA, Innes JA, Hackforth S, Hinks TS, Deeks JJ, Dosanjh DP, Guyot-Revol V, Gunatheesan R, Klenerman P, Lalvani A (2007) Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load. *J Immunol* 178:5217-5226
78. Nemeth J, Winkler HM, Karlhofer F, Selenko-Gebauer N, Graninger W, Winkler S (2010) T cells co-producing Mycobacterium tuberculosis-specific type 1 cytokines for the diagnosis of latent tuberculosis. *Eur Cytokine Netw* 21:34-39
79. NICE (2011). Tuberculosis: Clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control: Clinical Guideline 117

(London, UK, National Collaborating Centre for Chronic Conditions, Royal College of Physicians; <http://www.nice.org.uk/guidance/CG117>, 1-64, letzter Zugriff 24.06.2011)

80. Pai M, Riley LW, Colford JM, Jr. (2004) Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 4:761-776
81. Pai M, Zwerling A, Menzies D (2008) Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med* 149:177-184
82. Passalent L, Khan K, Richardson R, Wang J, Dedier H, Gardam M (2007) Detecting latent tuberculosis infection in hemodialysis patients: a head-to-head comparison of the T-SPOT.TB test, tuberculin skin test, and an expert physician panel. *Clin J Am Soc Nephrol* 2:68-73
83. Ponce de Leon D, Acevedo-Vasquez E, Alvizuri S, Gutierrez C, Cucho M, Alfaro J, Perich R, Sanchez-Torres A, Pastor C, Sanchez-Schwartz C, Medina M, Gamboa R, Ugarte M (2008) Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. *J Rheumatol* 35:776-781
84. Pooran A, Booth H, Miller RF, Scott G, Badri M, Huggett JF, Rook G, Zumla A, Dheda K (2010) Different screening strategies (single or dual) for the diagnosis of suspected latent tuberculosis: a cost effectiveness analysis. *BMC Pulm Med* 10:7
85. Posnett DN, Sinha R, Kabak S, Russo C (1994) Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy". *J Exp Med* 179:609-618
86. Raviglione MC, Dye C, Schmidt S, Kochi A (1997) Assessment of worldwide tuberculosis control. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Lancet* 350:624-629
87. Reed JR, Vukmanovic-Stejc M, Fletcher JM, Soares MV, Cook JE, Orteu CH, Jackson SE, Birch KE, Foster GR, Salmon M, Beverley PC, Rustin MH, Akbar AN (2004) Telomere erosion in memory T cells induced by telomerase inhibition at the site of antigenic challenge in vivo. *J Exp Med* 199:1433-1443
88. Reichler MR, Reves R, Bur S, Thompson V, Mangura BT, Ford J, Valway SE, Onorato IM (2002) Evaluation of investigations conducted to detect and prevent transmission of tuberculosis. *Jama* 287:991-995
89. Rohde K, Yates RM, Purdy GE, Russell DG (2007) Mycobacterium tuberculosis and the environment within the phagosome. *Immunol Rev* 219:37-54

90. Rose DN (2000) Benefits of screening for latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Arch Intern Med* 160:1513-1521
91. Rueda CM, Marin ND, Garcia LF, Rojas M (2010) Characterization of CD4 and CD8 T cells producing IFN-gamma in human latent and active tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 90:346-353
92. Rusch-Gerdes S, Hillemann D (2008) Moderne mykobakteriologische Labordiagnostik. *Pneumologie* 62:533-540
93. Rutella S, Rumi C, Lucia MB, Barberi T, Puggioni PL, Lai M, Romano A, Cauda R, Leone G (1999) Induction of CD69 antigen on normal CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets and its relationship with the phenotype of responding T-cells. *Cytometry* 38:95-101
94. Sagebiel D, Hauer B, Haas W, Magdorf K, Priwitzer M, Loddenkemper R (2005) Zukünftige Tuberkulinversorgung in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 48:477-482
95. Sargentini V, Mariotti S, Carrara S, Gagliardi MC, Teloni R, Goletti D, Nisini R (2009) Cytometric detection of antigen-specific IFN-gamma/IL-2 secreting cells in the diagnosis of tuberculosis. *BMC Infect Dis* 9:99
96. Sarrazin H, Wilkinson KA, Andersson J, Rangaka MX, Radler L, van Veen K, Lange C, Wilkinson RJ (2009) Association between tuberculin skin test reactivity, the memory CD4 cell subset, and circulating FoxP3-expressing cells in HIV-infected persons. *J Infect Dis* 199:702-710
97. Saunders BM, Britton WJ (2007) Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol* 85:103-111
98. Schluger NW, Burzynski J (2010) Recent advances in testing for latent TB. *Chest* 138:1456-1463
99. Sester M, Gartner BC, Sester U, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Kohler H (2003) Is the cytomegalovirus serologic status always accurate? A comparative analysis of humoral and cellular immunity. *Transplantation* 76:1229-1230
100. Sester M, Sester U, Alarcon Salvador S, Heine G, Lipfert S, Girndt M, Gartner B, Kohler H (2002a) Age-related decrease in adenovirus-specific T cell responses. *J Infect Dis* 185:1379-1387
101. Sester M, Sester U, Clauer P, Heine G, Mack U, Moll T, Sybrecht GW, Lalvani A, Kohler H (2004) Tuberculin skin testing underestimates a high prevalence of latent tuberculosis infection in hemodialysis patients. *Kidney Int* 65:1826-1834

102. Sester M, Sester U, Gartner B, Heine G, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Meyerhans A, Kohler H (2001) Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* 71:1287-1294
103. Sester M, Sester U, Gartner B, Kubuschok B, Girndt M, Meyerhans A, Kohler H (2002b) Sustained high frequencies of specific CD4 T cells restricted to a single persistent virus. *J Virol* 76:3748-3755
104. Sester M, Sester U, Kohler H, Schneider T, Deml L, Wagner R, Mueller-Lantzsch N, Pees HW, Meyerhans A (2000) Rapid whole blood analysis of virus-specific CD4 and CD8 T cell responses in persistent HIV infection. *Aids* 14:2653-2660
105. Sester M, Sotgiu G, Lange C, Giehl C, Girardi E, Migliori GB, Bossink A, Dheda K, Diel R, Dominguez J, Lipman M, Nemeth J, Ravn P, Winkler S, Huitric E, Sandgren A, Manissero D (2011a) Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 37:100-111
106. Sester U, Fousse M, Dirks J, Mack U, Prasse A, Singh M, Lalvani A, Sester M (2011b) Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active States. *PLoS One* 6:e17813
107. Sester U, Gartner BC, Wilkens H, Schwaab B, Wossner R, Kindermann I, Girndt M, Meyerhans A, Mueller-Lantzsch N, Schafers HJ, Sybrecht GW, Kohler H, Sester M (2005) Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant* 5:1483-1489
108. Sester U, Junker H, Hodapp T, Schutz A, Thiele B, Meyerhans A, Kohler H, Sester M (2006) Improved efficiency in detecting cellular immunity towards M. tuberculosis in patients receiving immunosuppressive drug therapy. *Nephrol Dial Transplant* 21:3258-3268
109. Sester U, Sester M, Kohler H, Pees HW, Gartner BC, Wain-Hobson S, Bocharov G, Meyerhans A (2007) Maintenance of HIV-specific central and effector memory CD4 and CD8 T cells requires antigen persistence. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:549-553

110. Sester U, Wilkens H, van Bentum K, Singh M, Sybrecht GW, Schafers HJ, Sester M (2009) Impaired detection of *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients using high levels of immunosuppressive drugs. *Eur Respir J* 34:702-710
111. Solovic I, Sester M, Gomez-Reino JJ, Rieder HL, Ehlers S, Milburn HJ, Kampmann B, Hellmich B, Groves R, Schreiber S, Wallis RS, Sotgiu G, Scholvinck EH, Goletti D, Zellweger JP, Diel R, Carmona L, Bartalesi F, Ravn P, Bossink A, Duarte R, Erkens C, Clark J, Migliori GB, Lange C (2010) The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 36:1185-1206
112. Stephan C, Wolf T, Goetsch U, Bellinger O, Nisius G, Oremek G, Rakus Z, Gottschalk R, Stark S, Brodt HR, Staszewski S (2008) Comparing QuantiFERON-tuberculosis gold, T-SPOT tuberculosis and tuberculin skin test in HIV-infected individuals from a low prevalence tuberculosis country. *Aids* 22:2471-2479
113. Streitz M, Fuhrmann S, Powell F, Quassem A, Nomura L, Maecker H, Martus P, Volk HD, Kern F (2011) Tuberculin-specific T cells are reduced in active pulmonary tuberculosis compared to LTBI or status post BCG vaccination. *J Infect Dis* 203:378-382
114. Streitz M, Tesfa L, Yildirim V, Yahyazadeh A, Ulrichs T, Lenkei R, Quassem A, Liebetrau G, Nomura L, Maecker H, Volk HD, Kern F (2007) Loss of receptor on tuberculin-reactive T-cells marks active pulmonary tuberculosis. *PLoS One* 2:e735
115. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG (1994) Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263:678-681
116. Sutherland JS, Adetifa IM, Hill PC, Adegbola RA, Ota MO (2009) Pattern and diversity of cytokine production differentiates between *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. *Eur J Immunol* 39:723-729
117. Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A, Legres L, Dreher D, Nicod LP, Gluckman JC, Lagrange PH, Gicquel B, Neyrolles O (2003) DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 197:121-127
118. Tapaninen P, Korhonen A, Pusa L, Seppala I, Tuuminen T (2010) Effector memory T-cells dominate immune responses in tuberculosis treatment: antigen or bacteria persistence? *Int J Tuberc Lung Dis* 14:347-355

119. Tesfa L, Koch FW, Pankow W, Volk HD, Kern F (2004) Confirmation of Mycobacterium tuberculosis infection by flow cytometry after ex vivo incubation of peripheral blood T cells with an ESAT-6-derived peptide pool. *Cytometry B Clin Cytom* 60:47-53
120. Tian T, Woodworth J, Skold M, Behar SM (2005) In vivo depletion of CD11c+ cells delays the CD4+ T cell response to Mycobacterium tuberculosis and exacerbates the outcome of infection. *J Immunol* 175:3268-3272
121. Tissot F, Zanetti G, Francioli P, Zellweger JP, Zysset F (2005) Influence of bacille Calmette-Guerin vaccination on size of tuberculin skin test reaction: to what size? *Clin Infect Dis* 40:211-217
122. Ulrichs T, Kaufmann SH (2006) New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* 208:261-269
123. van den Beemd R, Boor PP, van Lochem EG, Hop WC, Langerak AW, Wolvers-Tettero IL, Hooijkaas H, van Dongen JJ (2000) Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls. *Cytometry* 40:336-345
124. von Andrian UH, Mackay CR (2000) T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 343:1020-1034
125. Wang L, Turner MO, Elwood RK, Schulzer M, FitzGerald JM (2002) A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* 57:804-809
126. WHO (2010). Global tuberculosis control (Genf, Schweiz, World Health Organization; [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf), 1-218, letzter Zugriff 20.07.2011)
127. Widmann T, Sester U, Gartner BC, Schubert J, Pfreundschuh M, Kohler H, Sester M (2008) Levels of CMV specific CD4 T cells are dynamic and correlate with CMV viremia after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS One* 3:e3634
128. Winthrop KL, Nyendak M, Calvet H, Oh P, Lo M, Swarbrick G, Johnson C, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM, Mazurek GH (2008) Interferon-gamma release assays for diagnosing mycobacterium tuberculosis infection in renal dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 3:1357-1363
129. Wolfe F, Michaud K, Anderson J, Urbansky K (2004) Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy. *Arthritis Rheum* 50:372-379

130. Won DI, Park JR (2010) Flow cytometric measurements of TB-specific T cells comparing with QuantiFERON-TB gold. *Cytometry Part B* 78B:71-80
131. Young DB, Gideon HP, Wilkinson RJ (2009) Eliminating latent tuberculosis. *Trends Microbiol* 17:183-188

## 7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei vielen Kollegen und Freunden bedanken, die zur erfolgreichen Durchführung dieses aufwendigen Projektes beigetragen haben.

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester für die Möglichkeit, diese interessante und aktuelle Fragestellung bearbeiten zu dürfen, ihr und Herrn PD Dr. med. Urban Sester (im Text U.S.) danke ich herzlich für die treue und engagierte Unterstützung während der gesamten Arbeit. Aber noch viel mehr danke ich Euch dafür, dass Ihr mir wissenschaftliches Arbeiten nahe gebracht habt und vor allem das Interesse geweckt habt auch weiterhin in diesem Bereich tätig zu sein.

Herrn Prof. emerit. Dr. med. Hans Köhler danke ich für die Möglichkeit die notwendigen Versuche für diese Arbeit im Labor der Klinik für Nephrologie durchführen zu dürfen.

Herrn Prof. emerit. Dr. med. G. Sybrecht sowie Herrn Dr. med. Ulrich Mack der Klinik für Innere Medizin V für die Unterstützung bei der Rekrutierung dieser enormen Patientenzahl sowie die Durchführung zahlreicher Hauttests. Den MTAs Rebecca Ruth (im Text R.R.), Candida Guckelmus und Martina Wagner für exzellente technische Unterstützung, sowie Dr. med. Stephan Thijssen und Dr. rer. nat. Daniela Presser für die engagierte und geduldige Einarbeitung in die notwendigen Methoden. Allen nicht genannten Mitarbeitern der Klinik für Innere Medizin IV und V sowie den Mitarbeitern des nephrologischen Labors sei gedankt für eine sehr schöne Zeit, an die ich gerne zurückdenke, und für ein angenehmes und kollegiales Miteinander.

Herrn Dr. med. Bernhard Thiele danke ich für die Möglichkeit in seinem Institut für Immunologie und Genetik in Kaiserslautern die EliSpot<sup>®</sup>-Reihe durchführen zu dürfen. Frau Prof. Dr. med. Enders und Herr Dr. Thomas Meier (Labor Enders und Partner in Stuttgart) danke ich für die Durchführung eines ELISPOT<sup>®</sup> im Rahmen der Fallbeschreibung, und Herrn Prof. Dr. med. Paul Fisch und Prof. Dr. med. Stephan Ehl am Universitätsklinikum Freiburg für die Durchführung des T Zell-Rezeptor-Spektratyping und der RNA-Sequenzierung. Herrn Dr. med. Wolfgang Wahlen in Homburg danke ich für die Zusammenarbeit bei der Durchführung einer Umgebungsuntersuchung nach einem Indexfall mit *TBC*.

Ulrike Rohnert danke ich für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Tobias Hodapp  
Anschrift: Peter-Schlemihl-Straße 7a / 81377 München  
Geburtsdatum: 29.06.1979  
Geburtsort: Neuwied  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

Schulbildung: 1985 – 1989 Friedrich Ebert Grundschule, Neuwied  
1989 – 1995 Rhein Wied Gymnasium, Neuwied  
1995 – 1998 Ludwig Erhardt Schule, Neuwied  
1998 Hochschulreife

Zivildienst: 1998 – 1999 Deutsches Rotes Kreuz, Montabaur

Hochschulbildung: 1999 – 2000 Verwaltungs- und  
Wirtschaftsakademie, Koblenz  
2000 – 2007 Studium der Humanmedizin an der  
Universität des Saarlandes  
2005 – 2007 experimenteller Teil der Doktorarbeit  
bei Frau Professor Dr. rer. nat. Martina  
Sester, Abteilung für Transplantations-  
und Infektionsimmunologie am  
Universitätsklinikum des Saarlandes  
November 2007 Abschluss des Medizinstudiums

Beruflicher Werdegang: Februar 2008 - Klinik für Anästhesiologie und  
Februar 2009 operative Intensivmedizin,  
Klinikum Mannheim  
März 2009 - Klinik für Anästhesiologie, Intensiv-  
Dezember 2010 medizin und Schmerztherapie,  
Universitätsklinikum des Saarlandes  
Seit Januar 2011 Klinik für Anästhesiologie der  
Universität München