

Aus dem Forschungszentrum Borstel  
Zentrum für Medizin und Biowissenschaften  
Abteilung Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie  
Prof. Dr. Dr. h.c. Ernst Th. Rietschel

---

**Die Rolle der C-Typ-Lektine  
DC-SIGN und Makrophagen-Mannose-Rezeptor  
in der experimentellen Tuberkulose**

**Inauguraldissertation**  
**zur**  
**Erlangung der Doktorwürde**  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -  
vorgelegt von  
Cornelia Keßner  
aus Erfurt

Lübeck, 2005

**Gutachter:**

1. PD Dr. Norbert Reiling
2. Prof. Dr. Jürgen Westermann
3. Prof. Dr. Enno Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2006

**...meiner Mutter  
und Bastian**

## **Inhalt**

<b>A. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
A.1. Lektine .....	1
A.1.1. DC-SIGN.....	3
A.1.2. Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MR) .....	5
A.2. Die Rolle antigenpräsentierender Zellen in der Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> .....	7
<b>B. Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
B.1. Geräte .....	13
B.2. Sonstige Labormaterialien .....	13
B.3. Software.....	14
B.4. Reagenzien, Pufferlösungen und Medien .....	14
B.4.1. Reagenzien.....	14
B.4.2. Stimuli .....	18
B.4.3. Zytokine und Antikörper .....	19
B.4.4. Puffer und Medien.....	22
B.4.5. Mausstämme .....	26
B.5. Isolierung und Kultivierung muriner Zellen .....	27
B.5.1. Gewinnung von murinen Knochenmarkszellen.....	27
B.5.2. Generierung von dendritischen Zellen .....	27
B.5.3. Generierung von Makrophagen .....	28
B.5.4. Analyse der gewonnenen Zellen.....	29
B.5.4.1. Charakterisierung dendritischer Zellen .....	29
B.5.5. Funktion der Zellen .....	29
B.5.5.1. Stimulation dendritischer Zellen und Makrophagen .....	30
B.6. Tierexperimentelle Arbeiten .....	31
B.6.1. Aerosolinfektion der Tiere .....	31
B.6.2. Bestimmung von Überlebensraten infizierter Tiere .....	31
B.6.3. Gewinnung von Organen und Serum aus infizierten Tieren .....	32
B.6.4. Herstellung von Lungenhomogenaten und Bestimmung der Keimzahl in infizierten Lungen .....	32

B.6.5.	Herstellung von Homogenaten für die RNA-Isolierung aus Lungen	33
B.6.6.	Histologische Untersuchungen .....	33
B.6.6.1.	Organaufbereitung .....	33
	Paraffinschnitte .....	33
B.6.6.2.	Histologische und immunhistochemische Färbungen .....	34
	Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung .....	34
	Ziehl-Neelsen (ZN)-Färbung .....	34
	Färbung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS2) .....	35
B.7.	Bestimmung der Zytokinexpression .....	36
B.7.1.	RNA-Isolierung aus Zelllysaten .....	36
B.7.2.	Reverse Transkription (RT) .....	36
B.7.3.	Quantitative PCR mittels LightCycler .....	37
B.8.	Bestimmung von Zytokinkonzentrationen mit Hilfe der ELISA-Technik..	39
B.8.1.	Bestimmung der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Zellkulturüberstand .....	39
B.8.2.	Bestimmung der IL-12p40-Konzentration im Zellkulturüberstand ...	40
B.8.3.	Bestimmung der IL-12p40-, TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Seren und Homogenaten .....	41
B.9.	Statistische Analysen .....	42
<b>C.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
C.1.	Die Rolle von humanem DC-SIGN in der Zytokinproduktion <i>M. tuberculosis</i> -infizierter muriner dendritischer Zellen <i>in vitro</i> .....	43
C.1.1.	Phänotypisierung muriner dendritischer Zellen .....	43
C.1.2.	Stimulation dendritischer Zellen mit <i>M. tuberculosis</i> und LPS .....	44
C.1.3.	Vergleichende Analyse der Zytokinexpression in dendritischen Zellen aus C57BL/6- und hDC-SIGN <sup>tg</sup> -Mäusen .....	46
C.1.3.1.	Expression von humanem DC-SIGN (hDC-SIGN) auf murinen dendritischen Zellen .....	46
C.1.4.	Stimulation mit mannosyliertem Lipoarabinomannan (manLAM) ....	48
C.1.5.	Stimulation mit <i>M. tuberculosis</i> .....	50
Ergebnisse C.1.	.....	53
C.2.	Die Rolle von hDC-SIGN <i>in vivo</i> bei Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> .....	53
C.2.1.	Infektion mit 100 KBE <i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....	53

## Inhaltsverzeichnis

C.2.1.1.	Keimzahlentwicklung .....	53
C.2.1.2.	Zytokinexpression .....	54
C.2.1.3.	Granulomentwicklung .....	56
C.2.1.4.	Makrophagenaktivierung.....	58
C.2.1.5.	Langzeit-Überleben.....	60
C.2.2.	Infektion mit 2000 KBE <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	61
C.2.2.1.	Keimzahlentwicklung .....	62
C.2.2.2.	Zytokinexpression .....	62
C.2.2.3.	Makrophagenaktivierung.....	64
C.2.2.4.	Langzeit-Überleben.....	65
Ergebnisse C.2.....		66
C.3.	Die Rolle des MR <i>in vitro</i> bei Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> .....	67
C.3.1.	Expression des MR auf murinen Makropagen .....	67
C.3.2.	Stimulation von Makrophagen mit <i>M. tuberculosis</i> .....	68
C.3.3.	Expression des MR auf dendritischen Zellen.....	69
C.3.4.	Stimulation dendritischer Zellen mit <i>M. tuberculosis</i> .....	70
Ergebnisse C.3.....		72
C.4.	Die Rolle des MR <i>in vivo</i> bei Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> .....	73
C.4.1.	Infektion mit 100 KBE <i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....	73
C.4.1.1.	Keimzahlentwicklung .....	73
C.4.1.2.	Zytokinexpression .....	75
C.4.1.3.	Granulomentwicklung .....	76
C.4.1.4.	Makrophagenaktivierung.....	77
C.4.1.5.	Langzeit-Überleben.....	79
C.4.2.	Infektion mit 1000 Keimen <i>M. tuberculosis</i> .....	80
C.4.2.1.	Langzeit-Überleben.....	80
Ergebnisse C.4.....		81
<b>D. Diskussion .....</b>		<b>82</b>
<b>E. Literaturverzeichnis .....</b>		<b>91</b>

<b>F. Anhang</b> .....	<b>109</b>
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	109
Abkürzungsverzeichnis .....	112
Zusammenfassung.....	114
Danksagung .....	115
Präsentationen .....	116
Lebenslauf.....	117

## **A. Einleitung**

### **A.1. Lektine**

Lektine gehören zu den Kohlenhydrat-bindenden Proteinen, welche die Fähigkeit besitzen, Kohlenhydrate reversibel zu binden ohne deren Struktur zu verändern (1). Erstmals wurde 1888 mit Ricin aus dem Samen von *Ricinus communis* (Rizinus) ein Lektin mit toxischer Wirkung im Rahmen einer Promotionsarbeit an der Universität von Dorpat (jetzt Tartu, Estland) von Peter Hermann Stillmark beschrieben (2). Kurze Zeit später isolierte H. Hellin Abrin, ein zweites toxisches Hämagglutinin aus *Abrus precatorius* (Paternostererbse) (Übersicht in 3). Drei Jahre später veröffentlichte Paul Ehrlich erste immunologische Studien mit Meerschweinchen und Mäusen, die durch diese Toxine verursachten Koagulationen roter Blutkörperchen aufwiesen (4, 5).

Anhand von Sequenz-Homologien der jeweiligen Kohlenhydrat-Erkennungs-Domänen konnte durch K. Drickamer eine erste Klassifizierung der verschiedenen Lektine tierischen Ursprungs eingeführt werden (Übersicht in 6). Inzwischen werden sieben verschiedene Lektin-Klassen unterschieden (7). Dazu zählen die C-Typ-Lektine (Mannose-Rezeptor-Familie, DC-SIGN, Selektine u.a.), S-Typ-Lektine (Galactine), P-Typ-Lektine (Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren), I-Typ-Lektine (Siglecs u.a.), ausgewählte Chaperone (Calnexin, Calreticulin, Calmegin), Hyaluronan-bindende Proteine sowie Frosch-Ei-Lektine (7).

Die Gruppe der C-Typ-Lektine, die im Immunsystem als Adhäsions- und Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*; PRRs) beschrieben wurden (Übersicht in 8), stellt mit mehr als 20 Vertretern eine der größten Klassen dar (7). Dabei ist die Bezeichnung C-Typ auf die Calcium-abhängige Ligandenbindung der Moleküle zurückzuführen (9, Übersicht in 10). Klassische C-Typ-Lektine beinhalten mindestens eine der so genannten Kohlenhydrat-Erkennungs-Domänen (engl. *carbohydrate recognition domain*; CRD). Aber auch die prototypische Lektinfalte, die aus zwei nicht parallelen  $\beta$ -Faltblättern und zwei  $\alpha$ -Helices besteht, wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  gebildet (11).

Neben löslichen Proteinen gibt es unter den C-Typ-Lektinen auch transmembrane Proteine (Übersicht in 12). Beispiele für lösliche C-Typ-Lektine sind Mitglieder der



Collectin-Familie (13, Übersicht in 14) und das Mannose-bindende-Lektin, welches im Plasma nachweisbar ist (15). Transmembrane C-Typ-Lektine werden, basierend auf der Orientierung des Amino (N)-terminus der Polypeptidkette, in zwei Gruppen aufgeteilt. So ist bei Typ-I C-Typ-Lektinen der N-Terminus außerhalb und bei Typ-II C-Typ-Lektinen dieser im Zytoplasma der Zelle lokalisiert (Übersicht in 16 und 12). Vertreter dieser beiden Gruppen sind in Tab. 1 mit einigen ausgewählten Liganden dargestellt.

**Tab. 1: Zusammenfassung der C-Typ-Lektine**  
(modifiziert nach McGreal, E.P. 2004 (Übersicht in 17))

Rezeptor	Liganden (Beispiele)
<b>Typ I C-Typ-Lektine</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MR)</li> <li>• Endo-180</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit Mannose, Fucose und <i>N</i>-acetyl-Glukosaminen glycosylierte sowie sulfatisierte endogene und exogene Liganden</li> <li>• Hormone</li> <li>• Mannose, Fucose, <i>N</i>-acetyl-Glukosamin</li> <li>• Kollagen</li> </ul>
<b>Typ II C-Typ-Lektine</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• DC-SIGN</li> <li>• DC-SIGNR</li> <li>• SIGNR1</li> <li>• Langerin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• komplexe Mannose-Reste, Mannose-haltige Glykokonjugate, Fucose-haltige Lewis-Strukturen</li> <li>• ähnlich wie DC-SIGN</li> <li>• Mannose-haltige Glykokonjugate, Dextran</li> <li>• Mannose, Fucose, <i>N</i>-acetyl-Glukosamin</li> </ul>

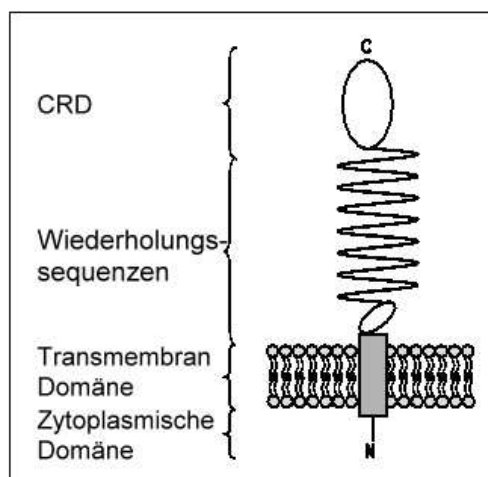
C-Typ-Lektine sind wichtig für Zell-Zell-Interaktionen, Zell-Migration und die Antigenpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen. So transferieren z.B. der Makrophagen-Mannose-Rezeptor und DC-SIGN die Antigene in Endosomen, in denen ein Abbau selbiger zur nachfolgenden Präsentation an T-Zellen stattfindet (18-20, Übersicht in 12). Neuere Arbeiten zeigen, dass C-Typ-Lektine auch eine Funktion in der Interaktion von Zellen des Immunsystems mit Pathogenen haben (Übersicht in 12 und 21).

**A.1.1. DC-SIGN**

Das C-Typ-Lektin DC-SIGN (CD209) ist ein Typ II-Transmembran-Rezeptor auf Chromosom 19p13.3 mit einer einzelnen extrazellulären Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne. Durch seine Fähigkeit, mit Kohlenhydratstrukturen, wie z.B. komplexen Mannose-haltigen Strukturen mit einem Minimum von drei Mannose-Resten, terminalen Di-Mannosen (22, 23) und Fucose-haltigen Glykokonjugaten (24, 25) zu interagieren, spielt DC-SIGN eine wichtige Rolle als Zelladhäsions- und Muster- bzw. Pathogenerkennungsrezeptor (26-30).

Erstmals wurde DC-SIGN im Jahr 2000 von Geijtenbeek und Mitarbeitern als ein 44 kDa großes Adhäsionsmolekül, welches mit (ICAM)-3 (engl. *intercellular adhesion molecule 3*) der T-Zellen interagiert, beschrieben (24). Darüber hinaus vermittelt DC-SIGN das „Rolling“ von dendritischen Zellen am Endothel über

ICAM-2 (32), sowie während der Entzündung die Interaktion mit dem  $\beta$ -Integrin Mac-1 und CEACAM1 (engl. *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*) auf Neutrophilen (33, 34).



**Abb. 1: Aufbau von DC-SIGN**  
nach Soilleux, E. J. 2003 (Übersicht in (31))

Wie in Abb. 1 gezeigt, schließt sich an diese Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne (CRD) eine Region bestehend aus sich wiederholenden 23 Aminosäuren großen Sequenzen (sieben vollständige und eine unvollständige) an (23). Auf die angrenzende, in das Zytoplasma der Zelle

reichende transmembrane Domäne folgt eine zytoplasmatische Domäne mit dem N-Terminus (23). Für die Ligandenbindung ist die Bildung von DC-SIGN-Tetrameren erforderlich (23, 35, 36).

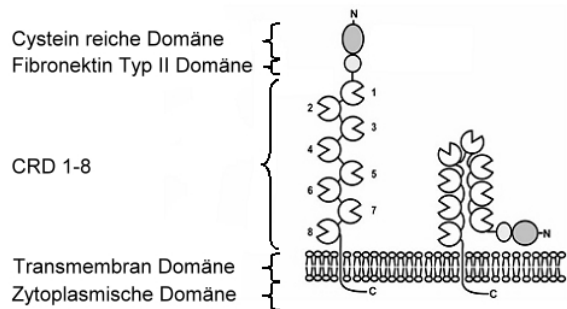
Der erste Hinweis, dass DC-SIGN als Mustererkennungsrezeptor fungiert, geht auf eine Arbeit von B.M. Curtis und Mitarbeitern aus dem Jahr 1992 zurück. In

dieser Arbeit wurde eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindung des aus dem humanen Immundefizienz Virus (HIV)-1 isolierten Moleküls gp120 an ein C-Typ-Lektin auf dendritischen Zellen diskutiert (37). Inzwischen ist DC-SIGN als ein Rezeptor, der mit einer Vielzahl von Pathogenen wie zum Beispiel Viren (HIV, Hepatitis C Virus und Ebola) (38-41), Bakterien (*Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*) (28, 42), Pilzen (*Candida albicans*) (43) und einigen Parasiten (*Leishmania spec.* und *Schistosoma mansoni*) (25, 26, 44, 45) interagiert, beschrieben. In ersten Arbeiten wurde die Expression von DC-SIGN ausschließlich auf myeloiden dendritischen Zellen und auf *in vitro* generierten dendritischen Zellen (Übersicht in 21) beschrieben, jedoch zeigen neuere detaillierte immunhistochemische Studien ebenso eine Expression auf einigen ausgewählten Makrophagenpopulationen (46-48).

Aus murinen Zellen sind bislang fünf homologe cDNAs zu hDC-SIGN kloniert worden. Welches von diesen jedoch das zu humanem DC-SIGN homologe Gen darstellt ist noch nicht endgültig geklärt (49, 50). Von diesen fünf Homologen, die auf Chromosom 8a1.2-1.3 in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander lokalisiert sind, ist nur ein Gen (mDC-SIGN) auf murinen dendritischen Zellen hoch exprimiert. Die anderen vier Gene (SIGNR1-SIGNR4) sind in geringerer Expressionsdichte in lymphatischen Organen (SIGNR1 + 3 auf Milz-DC's, B- und T-Zellen, SIGNR2 auf B-Zellen, die mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert wurden) und in anderen Organen (SIGNR4) exprimiert (49). So ist mSIGNR1 *in vivo* auch ein Mustererkennungsrezeptor auf Marginalzonen-Makrophagen, welche primär eine Bedeutung in der Interaktion mit körpereigenen Strukturen haben (51). Murines SIGNR1 ist zu 74% homolog zu hDC-SIGN und bindet wie dieses an endogene Liganden, z.B. hICAM-2 und hICAM-3 (51). Über die Funktion der übrigen Homologe insbesondere im Rahmen der Regulation einer Immunantwort ist bislang wenig bekannt.

### A.1.2. Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MR)

Der auf Chromosom 10 lokalisierte humane Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MR), gehört der Familie der Mannose-Rezeptoren an. Diese Familie besteht aus vier strukturell ähnlichen Proteinen mit gleicher Domänen-Zusammenstellung (53). Alle diese Rezeptoren, zu denen auch Endo180, DEC-205 (CD205) und der



**Abb. 2 Aufbau des Makrophagen Mannose Rezeptors**

dargestellt ist links die gestreckte Form des MR und rechts die u-förmig abgewinkelte Form nach Napper et al. 2001 (52)

Phospholipase A<sub>2</sub>-Rezeptor (PLA<sub>2</sub>R) zählen, sind Typ I-Transmembran-Rezeptoren mit einer N-terminalen Cystein-reichen Domäne (CR), gefolgt von einer Fibronectin-Typ II-Domäne (FNII) und einer einzigartigen Serie von acht (MR, Endo180, PLA<sub>2</sub>R) oder zehn (DEC-205) hintereinander angeordneten C-Typ-Lektin-ähnlichen Domänen (CRD), an die ein kurzer zytoplasmatischer Rest (45 AS) anschließt (siehe auch Abb. 2).

Studien von Taylor und Mitarbeitern zeigen, dass die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Lektin-Aktivität des MR in den CRD 4-8 zu finden ist. Dabei zeigten nur zwei CRDs (CRD 4 mehr als CRD 5) diese Aktivität (54). In späteren Studien wurde eine an CRD 4 u-förmig abgeknickte Struktur des MR postuliert, die den funktionellen Bedürfnissen des Rezeptors besser angepasst ist, als die lineare Struktur (52).

Der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MR) wurde 1986 erstmals durch die Arbeitsgruppe von Stahl beschrieben (55). Es handelt sich hierbei um einen 175 kDa großen Rezeptor, der mit seiner Cystein-reichen Domäne mit terminal sulfatisierten Glucosen auf den Hypophysenhormonen Lutropin und Thyrotropin (56-58), mit der FNII mit dem C-terminalen Propeptid des Typ I-Collagens (59), Übersicht in (60) und den CRD's mit terminalen einfachen Mannosen, Fucosen und N-Acetyl-Glucosaminen glycosylierten Liganden (55), interagiert. Dabei erfolgt die Interaktion auch mit Enzymen, z.B. Cathepsin D (61) und aus neutrophilen Granulozyten abgegebenen Myeloperoxidasen (62).

Die Funktion des MR ist sehr gut charakterisiert (43, 63, Übersicht in 17 und 60), weshalb an dieser Stelle nur ein kurzer Überblick gegeben werden soll. So spielt der MR in der Immunantwort bei der Phagosomenreifung (64, 65) und der Aufnahme von Antigenen sowie der Antigenpräsentation (66-68, Übersicht in 69) eine sehr wichtige Rolle. Das Auffinden einer löslichen Form des MR in humanem und murinem Serum (70) sowie in bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit von HIV-Patienten (71), hat andere Autoren veranlasst auf eine Rolle des MR insbesondere im Hinblick auf die adaptive Immunantwort zu schließen (60). Ebenso ist der Mannose Rezeptor aufgrund der Bindung mit zirkulierenden Hormonen in die Regulation des Hormonspiegels im Serum eingebunden (72, 73). In MR<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde erstmals die Regulation der Serum-Glykoprotein-Homeostase als eine der Hauptfunktionen des MR erkannt (74). Funktionell und in der Interaktion mit endogenen Liganden und Pathogenen sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen humanem und murinem MR beschrieben.

Der Mannose Rezeptor ist als ein Rezeptor für die Bindung und Internalisierung von verschiedenen Mikroorganismen, wie z.B. Protozoen (z.B. *Pneumocystis carinii*) (75, 76), Viren (z.B. HIV und Influenza Virus) (77-79), Pilzen (z.B. *Candida albicans*) (80-82) und Bakterien (z.B. *Echerichia coli* und Mykobakterien) (83-85) beschrieben worden.

Die Expression des Rezeptors ist bisher auf Gewebsmakrophagen z.B. Alveolarmakrophagen (53, 86) und ausgewählten dendritischen Zellpopulationen (myeloide und *in vitro* generierte DCs) (66, Übersicht in 69) dokumentiert. Weiterhin wurde der MR auf perivaskulären Mikroglia Zellen des Gehirns (87, Übersicht in 88) und Kaposi-Sarkom-Zellen (89) beschrieben.

In der Maus ist der Mannose-Rezeptor auf Chromosom 2 lokalisiert (90) und auf Gewebsmakrophagen und auf Endothelzellen im lymphatischen Gewebe und in der Leber exprimiert (91, 92). Unter bestimmten Kultivierungsbedingungen ist der MR auch auf unreifen dendritischen Zellen detektierbar (66).

## A.2. Die Rolle antigenpräsentierender Zellen in der Infektion mit *M. tuberculosis*

Makrophagen und dendritische Zellen sind die antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems, welche die Aktivierung und Regulation von Lymphozyten im Rahmen der adaptiven Immunantwort steuern (Übersicht in (93)). Vermutlich nimmt bereits die initiale Interaktion zwischen antigenpräsentierenden Zellen und einem pathogenen Mikroorganismus Einfluss auf den Verlauf einer Infektion.

Von besonderer Bedeutung für die Antigenpräsentation sind dendritische Zellen. So werden über verschiedene Rezeptoren (z.B. C-Typ-Lektine) der dendritischen Zellen Antigene internalisiert. Aus diesen Antigenen prozessierte Peptide werden nachfolgend über MHC II (engl. *major histocompatibility complex II*) den T-Zellen präsentiert (94, 95, Übersicht in 96).

Mikroorganismen exprimieren Motive (engl. *pathogen associated molecular patterns*; PAMPs), die dendritische Zellen stimulieren und deren Reifung induzieren (Übersicht in 97 und 98). Einige der wichtigsten Rezeptoren auf dendritischen Zellen, die primär mikrobielle Produkte erkennen und die adaptive Immunantwort initiieren, sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR), deren Name auf das Protein Toll zurückgeht. Toll ist ein Typ-I-Transmembran-Protein, das erstmals als ein Rezeptor für die ventro-dorsale Achsenformation im Embryo der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde (99, 100). Charakterisiert werden Toll-like-Rezeptoren (TLR) durch eine extrazelluläre Leucin-reiche Region und eine intrazelluläre Toll-IL-1R (TIR)-Domäne. Für verschiedene Toll-like-Rezeptoren wurden spezifische Liganden, wie z.B. Lipoproteine und Lipoarabinomannan (LAM) aus *M. tuberculosis* (für TLR2), LPS Gram-negativer Bakterien (für TLR4) und CpG (für TLR9) gefunden (Übersicht in 101). Über Interaktionen mit ihren Liganden setzen TLRs nach Rekrutierung von verschiedenen Adapterproteinen, z.B. MyD88 (engl. *myeloid differentiation factor 88*) an die TIR-Domäne (102), weitere Signalkaskaden in Gang (Übersicht in 103). Diese Signalkaskaden führen unter anderem zur Heraufregulation von kostimulatorischen Molekülen und zur Freisetzung von Zytokinen (Übersicht in 97). So antworten dendritische Zellen nach Stimulation mit LPS über TLR4 mit

einer vermehrten Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins Tumor Nekrose Faktor (TNF)- $\alpha$ , allerdings nur, solange sie noch nicht ausgereift sind (104). Daraus lässt sich ableiten, dass nur unreife dendritische Zellen in der Lage sind, auf Pathogene zu reagieren und im nächsten Schritt auszureifen und Antigene an die T-Lymphozyten zu präsentieren. So induzieren dendritische Zellen, die TNF- $\alpha$  und Interleukin (IL)-12 ausschütten, eine T<sub>H</sub>1-Polarisation von T-Zellen (105, 106).

Unter allen bakteriell verursachten Infektionskrankheiten weltweit ist die Tuberkulose die mit höchster Morbidität und Mortalität behaftete Erkrankung (107). Erreger der Tuberkulose ist *M. tuberculosis*, ein Bakterium des „*Mycobacterium tuberculosis complex*“. Robert Koch beschrieb *M. tuberculosis* erstmals 1882 vor der physiologischen Gesellschaft in Berlin (108). Es handelt sich hierbei um nicht sporenbildende, grampositive 2-4  $\mu\text{m}$  große Stäbchenbakterien, welche der Gattung *Mycobacterium* (Actinomycetes im Reich Bacteria) zugeordnet werden (109). Mykobakterien lassen sich mit Karbolfuchsin bzw. Phenolfuchsin anfärben und mit Hilfe eines Ethanol-Salzsäure-Gemisches nicht wieder entfärben (Ziehl-Neelsen-Färbung) (110). Sie werden daher auch als säurefeste Stäbchen bezeichnet (109).

In den letzten zwei Jahrzehnten haben zwei Faktoren zu der ungebrochen hohen Prävalenz der Tuberkulose beigetragen: Koinfektion bei HIV-Patienten und Multiresistenz des Erregers. Die Selektion multiresistenter Stämme beruht darauf, dass die antibiotische Therapie mit ungeeigneten Medikamenten oder unzureichend lang durchgeführt wird. Von Multiresistenz (MDR) im engeren Sinne spricht man, wenn eine Unempfindlichkeit von *M. tuberculosis* gegen mindestens Isoniazid und Rifampizin besteht. Der weltweit sehr häufig vorkommende Stamm Beijing kann zu MDR neigen (111). Bei diesem Stamm ist eine Resistenz bis in das Jahr 1978 zurück zu verfolgen (112). So ist zum Beispiel die Tuberkulose die häufigste Todesursache bei HIV-Infizierten (113). Im Jahr 2001 konnte bei 70% aller Infizierten in Asien der Beijing-Genotypus identifiziert werden (114). Die Multiresistenzen nehmen inzwischen weltweit an Bedeutung zu (115-117).

Die Infektion mit Mykobakterien erfolgt hauptsächlich aerogen über den Respirationstrakt. Die Lungentuberkulose ist das häufigste Erscheinungsbild, obwohl sich eine Infektion mit *M. tuberculosis* in verschiedenen Organen manifestieren kann (Übersicht in 118). Dabei kann das Immunsystem *M. tuberculosis* im Allgemeinen kontrollieren: So bleiben 90% der infizierten Patienten von einer Tuberkulose verschont. Aktuellen Schätzungen der WHO zufolge sind circa ein Drittel der Weltbevölkerung latent mit *M. tuberculosis* infiziert (107). Die Reaktivierung einer solchen latenten TB kann einerseits unter immunsupprimierenden Bedingungen (z.B. verminderte T-Lymphozyten-Anzahl im Verlauf einer Infektion mit HIV), andererseits auch ohne erkennbaren Immundefekt erfolgen.

In der Lunge sind Alveolarmakrophagen die *in vivo* von Mykobakterien zuerst infizierten Zellen des Wirtsorganismus. Eine ganze Reihe von Rezeptoren auf diesen Zellen können die Phagozytose einleiten und einen Einfluss auf die nachfolgende intrazelluläre Aktivierung der Wirtszelle haben (119, 120). So führt die über den Fc-Rezeptor vermittelte Aufnahme von Mykobakterien zu einer Aktivierung antimikrobieller Abwehrmechanismen, die die Fusion des Bakterien-enthaltenden Phagosoms mit lysosomalen Kompartimenten, die saure Hydrolasen beinhalten, welche die Degradation von bakteriellen Strukturen katalysieren (121), Übersicht in (122). Die Phagozytose über den Komplementrezeptor 3 führt dagegen nicht zur Zellaktivierung (123). Unspezifisch voraktivierte Makrophagen sind in der Lage, die Bakterienanzahl durch antimikrobielle Abwehrmechanismen zu dezimieren und somit eine gewisse Resistenz zu vermitteln, jedoch können pathogene Mykobakterien die Reifung des Phagolysosoms erfolgreich verhindern und schaffen somit eine Voraussetzung für ihre intrazelluläre Persistenz (124-126, Übersicht in 122 und 127).

Lysate von *M. tuberculosis* oder auch lösliche Lipoproteine der mykobakteriellen Zellwand induzieren über die TLRs die Freisetzung einer ganzen Reihe von Mediatoren, insbesondere von Chemokinen und Zytokinen (128, Übersicht in 118). Makrophagen und im Serum zirkulierende unreife dendritische Zellen setzen schon sehr früh nach Kontakt mit apathogenen und pathogenen Mykobakterien



TNF- $\alpha$  frei. Das Zytokin TNF- $\alpha$  unterstützt lokal die Entzündungsreaktion, in der es zu einem verlangsamten lokalen Blutfluss durch Vergrößerung des Gefäßdurchmessers, zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Gefäßendothel sowie zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäßwände führt (Übersicht in 118).

Die immunologische Kontrolle mykobakterieller Infektionen beruht, basierend auf der Freisetzung von IL-12 durch antigenpräsentierende Zellen (128), auf einer Typ-1-T-Helferzell-(T<sub>H</sub>1)-Antwort (129, Übersicht in 130 und 131). Die Wichtigkeit der Rolle von IL-12 kann daraus abgeleitet werden, dass IL-12-defiziente Mäuse hoch suszeptibel für mykobakterielle Infektionen sind (132, 133). IL-12 bildet eine essentielle Voraussetzung für die Differenzierung naiver CD4-positiver T<sub>H</sub>-Zellen in T<sub>H</sub>1-Effektorzellen und induziert auch die Produktion von IFN- $\gamma$  durch natürliche Killerzellen (Übersicht in 134). So zeigt ein Infektionsmodell mit IFN- $\gamma$ -defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen eine sehr stark erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer Infektion mit *M. tuberculosis* (135, 136). IFN- $\gamma$  induziert wiederum in myeloiden Antigen-präsentierenden Zellen die Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS2). Unter Verwendung von L-Arginin als Substrat wird hierbei die Produktion von reaktiven Stickstoffintermediaten katalysiert (137). So ist in einer akuten und chronischen Infektion der Maus mit Mykobakterien das durch die Makrophagen freigesetzte Stickstoffmonoxid (NO) essentiell für die Abtötung von *M. tuberculosis* (138, 139). Eine stark erhöhte Expression von NOS2 ist auch in den Alveolarmakrophagen sowie in den epitheloidzellig transformierten Makrophagen und Langhans'schen Riesenzellen von Patienten mit aktiver pulmonaler Tuberkulose nachweisbar (140-142). Stickstoffmonoxid scheint von essentieller Bedeutung in der antimykobakteriellen Abwehr zu sein, so sterben die NOS2-gen-defizienten Mäuse im Modellsystem wesentlich früher, als die zugehörigen C57BL/6-Mäuse. Allerdings überlebten die NOS2-gen-defizienten Mäuse die IFN- $\gamma$ -gen-defizienten Mäuse, was auf IFN- $\gamma$ -abhängige, aber NOS2-unabhängige Effektormechanismen hindeutet (143). Betrachtet man die Entwicklung einer Tuberkulose in den Lungen infizierter Mäuse histologisch, so zeigt sich die Bildung von Granulomen in Folge der

mykobakteriellen Abwehr. In diesen Granulomen sind zentral die mit Mykobakterien infizierten Makrophagen angeordnet, die von einem Saum aus T-Lymphozyten umgeben sind (144, 145). Für die Aufrechterhaltung eines solchen Granuloms ist die Expression verschiedener Effektormoleküle, wie Zytokinen (z.B. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) und Chemokinen (z.B. IP-10) von großer Bedeutung (146-148).

Neuere Arbeiten zeigen unter Verwendung von humanen Immunzellen, dass C-Typ-Lektine einen Einfluss auf die Expression von Zytokinen nach Kontakt mit Pathogenen haben können (149, 150). Um die Funktionen einzelner Moleküle analysieren zu können, ist es erforderlich reduktionistische Modellsysteme anzuwenden. So bietet sich bei der Untersuchung der Rolle der C-Typ-Lektine in mykobakteriellen Infektionen das Mausmodell an (Übersicht in 151). Bei diesem Modellsystem ist es möglich, einzelne Moleküle transgen über zu exprimieren oder zu deletieren. So wurden mit diesem System für die Infektabwehr wichtige Schlüsselmoleküle wie z.B. TNF- $\alpha$  (147, 152), NOS2 (138), IFN- $\gamma$  (135) identifiziert und der Beitrag von TLR2 und -4 (153) in mykobakteriellen Infektionen geklärt.

Für die Untersuchung der Funktion des Mannose-Rezeptors standen Mäuse zur Verfügung, die defizient für diesen Rezeptor waren. In dieser Arbeit wurden diese Mäuse das erste Mal für Untersuchungen einer experimentellen Tuberkulose verwendet. Da die genauen Funktionen der murinen Homologe zu DC-SIGN bisher nur unzureichend bekannt sind, gibt es noch keine Möglichkeit, mit Mäusen zu arbeiten, die defizient für murines DC-SIGN sind. Es standen jedoch exklusiv für diese Arbeit erstmals Mäuse zur Verfügung, die transgen für humanes DC-SIGN sind. Daher ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

### Teil I

Zeigen dendritische Zellen aus Mäusen, die für humanes DC-SIGN transgen bzw. für den MR-defizient sind, nach Stimulation mit verschiedenen Stämmen von *M. tuberculosis* eine im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen veränderte Produktion proinflammatorischer Zytokine?

**Teil II**

Hat die Präsenz von C-Typ-Lektinen Auswirkungen auf den Verlauf einer experimentellen Tuberkulose nach Aerosolinfektion von Mäusen mit *M. tuberculosis*?

## **B. Material und Methoden**

### **B.1. Geräte**

Autotechnicon (PathCentre; SHANDON, Pittsburgh, PA, USA)  
Biophotometer (EPPENDORF, Hamburg)  
Brutschränke (HERAEUS, Hanau)  
Digitalkamera (Digital Sight DS-L1; NIKON, Düsseldorf)  
Durchflusszytometer (FACS Calibur; BD BIOSCIENCES, Heidelberg)  
ELISA-Lesegerät (Sunrise; TECAN, Crailsheim)  
Heizplatte (MEDAX, Kiel)  
Heizblock (EPPENDORF)  
Homogenisator (PotterS; B. BRAUN, Melsungen)  
Inhalationssystem (Modell 099C A4224; GLAS-COL, Terre Haute, IN, USA)  
Infektioskäfige (Marine und Industrie Technik - MIT, Hamburg)  
ThermoCycler (LightCycler; ROCHE, Mannheim)  
Mikroskop (ZEISS, Oberkochen)  
Paraffingießstation (Leica EG1140C; LEICA, Nussloch)  
Rotationsmikrotom (Leica RM2155; LEICA)  
Schnellkochtopf (FISSLER, Idar-Oberstein)  
Ultraschallbad (35 kHz; BANDELIN, Berlin)  
Wasserbad (GFL1052; GFL, Burgwedel)  
Zentrifugen (Rotanta460R, MIKRO22R, MIKRO200R; HETTICH ZENTRIFUGEN, Hanau)

### **B.2. Sonstige Labormaterialien**

Bakterienkulturschalen (SARSTEDT, Nürnbrecht)  
Gewebekulturschalen (Nunclon™ $\Delta$ -Surface; NUNC, Roskilde, Dänemark)  
Histogrid (SIMPORT, Bernard-Pilon, Kanada)  
Kanülen und Spritzen (BD BIOSCIENCES)  
Knopfkanüle (ACUFIRM, Dreieich)  
Mikrotiterplatten (mit 96 Vertiefungen, Flachboden, Maxisorp; NUNC)

Neubauer Zählkammer (BRAND, Wertheim)  
Objektträger (SuperFrostPlus; LANGENBRINCK, Emmendingen)  
Petrischalen (SARSTEDT)  
Pipetten (EPPENDORF)  
Pistillen (RETTBERG, Göttingen)  
Reaktionsgefäße (1,5 2,0 ml; EPPENDORF)  
Serumseparationsröhrchen (BD BIOSCIENCES)  
Skalpelle (SWANN MORTEN, Sheffield, UK)  
Zellkulturplatten (mit 24 Vertiefungen, Flachboden; NUNC)  
Zellkulturschalen (FALCON1029; BD BIOSCIENCES)  
Zentrifugenröhrchen (15 - 50 ml; NUNC)

### **B.3. Software**

„Cellquest Pro“ (BD BIOSCIENCES)  
„LightCycler“ Software (ROCHE)  
„Magellan“ (TECAN)  
“Graph Pad Prism 4.0” (GRAPH PAD, San Diego, CA, USA)

### **B.4. Reagenzien, Pufferlösungen und Medien**

#### **B.4.1. Reagenzien**

Accutase (PAA; Pasching, Österreich)  
Aceton (2-Propanon; MERCK, Darmstadt)  
Ammoniumchlorid (MERCK)  
*aqua bidest* (zweifach deionisiertes Wasser; Deionisierungsanlage,  
Forschungszentrum Borstel)  
Borsäure (MERCK)  
1-Brom-3-Chlorpropan (SIGMA, Deisenhofen)  
Bromphenolblau (SERVA)  
Buratton (S&M, Norderstedt)

Desoxynucleosidtriphosphat (dNTP's; AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg)  
Diethylpyrocarbonat (DEPC; AMBION, Huntingdon, Großbritannien)  
Dimethylsulfoxid (DMSO; SIGMA)  
Dinatriumhydrogenphosphat (MERCK)  
Dithiothreitol (INVITROGEN, Karlsruhe)  
DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Media*; PAA)  
Entellan (MERCK)  
Eosin (1%; MERCK)  
Ethanol (MERCK)  
Ethanol (für Molekularbiologie) (MERCK)  
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA; ICN BIOMEDICALS, Eschwege)  
First Strand Puffer (5x; INVITROGEN)  
Formalin (37%) (MERCK)  
Fötale Kälberserum (FCS; BIOCHROM, Berlin); hitzeinaktiviert (30 min, 56°C)  
L-Glutamin (BIOCHROM)  
Glycerin (MERCK)  
Guanidiniumthiocyanat (GUTC; MERCK)  
Hämatoxylin nach Gill (MERCK)  
HEPES (PAA)  
Hirn-Herz-Agar (engl. *brain heart infusion agar*; DIFCO, Heidelberg)  
Kaisers Glycerin-Gelatine (MERCK)  
Kaliumchlorid (MERCK)  
Kaliumdihydrogenphosphat (MERCK)  
Karbolfuchsin (MERCK)  
Ketamin (10%; WDT, Garbsen)  
Löfflers-Methylenblau (MERCK)  
Magnesiumchlorid (INVITROGEN)  
Mausserum (PAA)  
β-Mercaptoethanol (SIGMA)  
Middlebrook 7H10 Agar (DIFCO)  
Middlebrook 7H9 (DIFCO)

Natriumazid (MERCK)  
Natriumcarbonat (MERCK)  
Natriumchlorid (MERCK)  
Trinatriumcitratdihydrat (MERCK)  
Natriumdihydrogenphosphat (MERCK)  
Natriumhydrogencarbonat (MERCK)  
Natriumpyruvat (PAA)  
N-Lauroylsarcosin (MERCK)  
Oleinsäure, Albumin, Dextrose, Katalase (OADC; BD BIOSCIENCES)  
Oligo-dT-Nukleotide (12-18mer, 25 U; AMERSHAM BIOSCIENCES)  
Paraffin (Paraplast Plus; SHERWOOD MEDICAL, St. Louis, USA)  
Paraformaldehyd (PFA; MERCK)  
10x PBS (PAA)  
PCR-Puffer (10x; für quantitative LightCycler-PCR; INVITROGEN)  
Penicillin/Streptomycin (BIOCHROM)  
ProClin150 (SIGMA)  
2-Propanol (Isopropanol; SIGMA)  
Propidiumiodid (0,5 mg/ml; SIGMA)  
Reverse Transkriptase (Superscript II RT, 10.000 U; INVITROGEN,)  
Rinderserumalbumin (BSA; SIGMA)  
RNase-Inhibitor (RNasin, 2500 U; PROMEGA, Mannheim)  
Rompun (2%), BAYER, Leverkusen)  
Rotihistol (ROTH, Karlsruhe)  
RPMI 1640 (BIOCHROM)  
Schwefelsäure, 95-97% (MERCK)  
Streptavidin, Peroxidase gekoppelt (1 mg/ml; DIANOVA, Hamburg)  
Streptavidin, Peroxidase gekoppelt (BD BIOSCIENCES)  
Sucrose (Saccharose) (SIGMA)  
SYBR-Green (ROCHE)  
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB; FLUKA, Buchs, Schweiz)  
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (TRIS; SERVA)

TriFast (PEQLAB; Erlangen)

Trypanblau (FLUKA)

Tween-20 (SIGMA)

Tween-80 (SIGMA)

Wasser (steril, pyrogenfrei) (B. BRAUN)

Wasserstoffperoxid (35%) (MERCK)

Zitronensäuremonohydrat (Zitrat; MERCK)



### B.4.2. Stimuli

**Bakterien:** Die *M. tuberculosis*-Stämme

H37Rv	Laborstamm
CDC1551	Keimisolat aus Kentucky-Tennessee (154)
Beijing3547/01	Keimisolat eines Patienten aus Afghanistan
Beijing4203/01	Keimisolat eines Patienten aus Vietnam

wurden in Middlebrook 7H9 Medium mit einem Zusatz von 10% OADC und 0,05% Tween-80 bis zur mittleren logarithmische Phase angezüchtet. Mögliche Kontaminationen wurden durch Aufbringen auf *brain heart infusion*-Agar und mittels Ziehl-Neelsen-Färbung untersucht. Die Bakteriensuspensionen wurden aliquotiert und bis zum weiteren Verbrauch bei -80 °C gelagert.

Um die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen der Bakteriensuspension in sterilem destilliertem Wasser mit einem Zusatz von 0,05% Tween-80 angefertigt und auf 7H10 Agar mit 10% OADC ausplattiert. Nach einer Inkubation von 3 Wochen bei 37 °C wurde die Anzahl der Kolonien auf den Agarplatten bestimmt und die KBE für jede Kultur berechnet.

Für die Stimulationsversuche wurden die Bakterien aufgetaut und abzentrifugiert (1000 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien in sterilem PBS resuspendiert und zur Trennung von möglichen Aggregaten 10x durch eine 1 ml-Spritze (BD BIOSCIENCES) mit einer 26 G-Kanüle (BD BIOSCIENCES) gezogen sowie für 5 min mit Ultraschall (BANDELIN) behandelt.

Die Keimisolate (CDC1551; Beijing3547/01 und Beijing4203/01) wurden freundlicherweise von PD Dr. Stefan Niemann, Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien, Borstel zur Verfügung gestellt.

**LPS:** Die verwendete Lipopolysaccharid-Präparation (*Salmonella enterica*, Serotyp Friedenau H909) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Helmut Brade, Laborgruppe Medizinische und Biochemische Mikrobiologie, Forschungszentrum Borstel zur Verfügung gestellt.

**manLAM:** Mannosyliertes Lipoarabinomannan (manLAM) aus *M. tuberculosis* (Stamm H37Rv) wurde freundlicherweise von Charmaine Matheson im Rahmen des NIH-Contract HHSN266200400091C der Colorado State University in Ft. Collins, Colorado, USA zur Verfügung gestellt.

### **B.4.3. Zytokine und Antikörper**

#### **Zytokine für die Zellkultur**

rekombinanter muriner (rm)GM-CSF (Lot.Nr. BJ11408A und BJ11505A; R&D SYSTEMS, Wiesbaden)

rekombinanter humaner (rh)M-CSF (Lot.Nr. CC10410B; R&D SYSTEMS)

#### **Standards für Zytokin-ELISAs**

(rm)TNF- $\alpha$	(DuoSet (DY410); R&D SYSTEMS)
(rm)TNF- $\alpha$	(OptEIA (558874); BD PHARMINGEN, Heidelberg)
(rm)IL-12p40	(OptEIA (555165); BD PHARMINGEN)
(rm)IL-12p40	(Pairs (554594); BD PHARMINGEN)
(rm)IFN- $\gamma$	(OptEIA (555138); BD PHARMINGEN)

## Antikörper (AK)

**Tab. 2: ELISA-Antikörper für die Zytokinanalyse im Kulturüberstand**

Zytokin	Antikörper	Klon	Quelle	Verwendung
IL-12p40	Ratte-anti-Maus IL-12 (p40/p70)	C15.6	(551219) BD PHARMINGEN	primärer AK
	Ratte-anti-Maus IL12 (p40/p70), Biotin konjugiert	C17.8	(554476) BD PHARMINGEN	sekundärer AK
TNF- $\alpha$	Ziege-anti-Maus TNF- $\alpha$	--	(DY410)	primärer AK
	Ziege-anti-Maus TNF- $\alpha$ , Biotin konjugiert	polyklonal	R&D SYSTEMS	sekundärer AK

**Tab. 3: ELISA-Antikörper für die Zytokinanalyse in Seren und Homogenaten**

Zytokin	Antikörper	Klon	Quelle	Verwendung
IL-12p40	anti-Maus IL-12p40	monoklonal	(555165)	primärer AK
	anti-Maus IL-12p40, Biotin konjugiert	monoklonal	BD PHARMINGEN	sekundärer AK
TNF- $\alpha$	anti-Maus TNF- $\alpha$	monoklonal	(558874)	primärer AK
	anti-Maus TNF- $\alpha$ , Biotin konjugiert	polyklonal	BD PHARMINGEN	sekundärer AK
IFN- $\gamma$	anti-Maus IFN- $\gamma$	monoklonal	(555138)	primärer AK
	anti-Maus IFN- $\gamma$ , Biotin konjugiert	monoklonal	BD PHARMINGEN	sekundärer AK

**Tab. 4: Antikörper für immunhistologische Analysen**

Antikörper	Spezies/Isotyp	Klon	Firma
NOS2	Kaninchen IgG	Polyklonal	UPSTATE BIOTECH
Kaninchen	Ziege IgG, Peroxidase gekoppelt	Polyklonal	DIANOVA
Ziege	Kaninchen IgG, Peroxidase gekoppelt	Polyklonal	DIANOVA

**Tab. 5: Antikörper für durchflusszytometrische Analysen**

Antikörper	Isotyp	Klon	Markierung / (Verdünnung [µg/ml])	Firma
α-CD11c (Integrin α <sub>π</sub> chain)	Armenischer Hamster IgG <sub>1</sub> , λ2	HL3	FITC, PE (5 µg/ml-FITC/ 2 µg/ml-PE)	BD PHARMINGEN
α-CD45R/B220	Ratte IgG <sub>2a</sub> , κ	RA3-6B2	PE (0,6 µg/ml)	BD PHARMINGEN
α-FCγ-Rezeptor	Ratte IgG <sub>2b</sub> , κ	2.4G2	unmarkiert (100 µg/ml)	BD PHARMINGEN
α-CD209 (DC-SIGN)	Maus IgG <sub>2b</sub>	120507	PE (0,5 µg/ml)	R & D SYSTEMS
α-GR1	Ratte IgG <sub>2b</sub> , κ	RB6-8C5	PE (0,075 µg/ml)	BD PHARMINGEN
α-CD206 (Makrophagen- Mannose-Rezeptor)	Ratte IgG <sub>2a</sub> , κ	MR5D3	PE (10 µg/ml)	SEROTEC, Düsseldorf
α-Mac3	Ratte IgG <sub>1</sub> , κ	M3/84	FITC (12,5 µg/ml)	BD PHARMINGEN
α-I-A <sup>b</sup> (MHC II)	Maus IgG <sub>2a</sub> , κ	KH74	Biotin (1 µg/ml)	BD PHARMINGEN
α-IgM	Ratte IgG <sub>2a</sub> , κ	R6-60.2	FITC (1,6 µg/ml)	BD PHARMINGEN
Streptavidin- Phycoerythrin		Streptavidin	PE (0,5 µg/ml)	BD PHARMINGEN
<b>Isotypkontrollen</b>				
Hamster IgG <sub>1</sub> , λ1	Armenischer Hamster IgG1, λ 1	G235-2356	PE	BD PHARMINGEN
Maus IgG <sub>2a</sub> , κ	Maus IgG <sub>2a</sub> , κ	G155-178	PE	
Maus IgG <sub>2b</sub>	Maus IgG <sub>2b</sub>	27-35	PE	
Ratte IgG <sub>2a</sub> , κ	Ratte IgG <sub>2a</sub> , κ	R35-95	PE	
Ratte IgG <sub>2b</sub> , κ	Ratte IgG <sub>2b</sub> , κ	A95-1	PE	

### **B.4.4. Puffer und Medien**

(Sofern nicht besonders vermerkt, wurden die Puffer mit *aqua bidest* angesetzt.)

#### **Puffer und Medien für die Zellkulturen**

**RCLB-Puffer (RedCellLysispuffer)** 155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 16 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, pH 7,3

**Differenzierungsmedium für murine dendritische Zellen** RPMI 1640, 10% FCS (i.a.), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 50 µM β-Mercapto-Ethanol

**R10-Zellkulturmedium für murine dendritische Zellen** RPMI 1640, 10% FCS (hitzeinaktiviert, i.a.), 2 mM L-Glutamin, 50 µM β-Mercapto-Ethanol

**MMM-Zellkulturmedium für murine Makrophagen** DMEM, 10% FCS (i.a.), 10 mM HEPES, 1 mM Natrium-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin

**Puffer und Lösungen für Zytokin-ELISAs**

**Gemeinsame Lösungen**

**Abstopplösung** 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**Beschichtungspuffer (IL-12p40 (Zellkultur (Z), Serum (S), Homogenate (H)); TNF- $\alpha$  (S, H); IFN- $\gamma$  (S, H))** 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, 34 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,5

**Blockpuffer (TNF- $\alpha$  (Z); IL-12p40 (Z))** 146 mM Sucrose, 8 mM NaN<sub>3</sub>, 1% BSA in PBS

**Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2

**Waschpuffer** 0,05% Tween-20 in PBS

**Puffer für den TNF- $\alpha$  (Zellkultur)-ELISA**

**Verdünnungspuffer** 1% BSA in PBS

**Substratpuffer** 33 mM Zitronensäure, pH 4,1

**3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung** 2 M Aceton, 20 M Ethanol, 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 mM 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

**Substratlösung** 5% TMB in Substratpuffer

**Puffer für die IL-12p40-, TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ (Serum, Homogenat)-ELISA**

**Verdünnungspuffer** 10% FCS, 0,15% ProClin150 in PBS

**Substratlösung** Tetramethylbenzidin (TMB) und Hydrogenperoxid (TMB Substrat Reagenz Set (555214); BD PHARMINGEN)

**Puffer für den IL-12p40 (Zellkultur)-ELISA**

**Verdünnungspuffer** 20 mM Tris, 151 mM NaCl, 0,05% Tween-20, 0,1% BSA

**Puffer für Durchflusszytometrische Analysen**

**Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2

**azidhaltige Phosphat-gepufferte Salzlösung (Azid-PBS)** 121 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,2

**FACS-Verdünnungspuffer** 3% FCS in PBS mit 0,1% NaN<sub>3</sub>

**Puffer für histologische und immunhistologische Techniken**

**TRIS-gepufferte Salzlösung (TBS)** 150 mM NaCl, 10 mM TRIS, pH 7,4

**Formalin** 4% Formalin in PBS

**Angesäuertes Ethanol** 21 M Ethanol, 1,4 M HCl

**IHC-Verdünnungspuffer** 10% FCS in TBS

**Zitratpuffer** 10 mM Zitrat

**Blockierungslösung** 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS

**Mausserum** 10% in IHC-Verdünnungspuffer

**Molekularbiologische Lösungen**

**Guanidiniumthiocyanat (GUTC)-Puffer** 48 mM NatriumZitrat; 80 mM GUTC;  
34 mM N-Lauroylsarcosin in DEPC-H<sub>2</sub>O

**TE-Puffer** 10 mM TRIS-HCl (pH 8,0), pH ; 1 mM EDTA

**Tierexperimentelle Arbeiten**

Die Tiere wurden mit einer Überdosis Narkotikum (1,25% Ketamin (WDT) und 0,025% Rompun (BAYER) in isotonischer Kochsalzlösung) schmerzfrei getötet.



**B.4.5. Mausstämme**

Zur Untersuchung der Rolle von DC-SIGN und des Makrophagen-Mannose-Rezeptors während mykobakterieller Infektionen wurden 10 bis 12 Wochen alte gen-defiziente (defizient, <sup>-/-</sup>) bzw. gen-überexprimierende (transgene, <sup>tg</sup>) Mäuse (männlich und weiblich) verwendet (Tab. 6). Als immunkompetente Kontrolltiere dienten Mäuse vom Stamm C57BL/6 (CHARLES RIVER, Sülzfeld), was dem genetischen Hintergrund des jeweiligen defizienten bzw. transgenen Mausstamm entsprach. Alle Mäuse waren frei von viralen, bakteriellen und parasitären Erkrankungen. Die Tierversuchsvorhaben zu den Infektionsversuchen wurden vom Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein unter der Nummer V742-72241.123-3(75-9/03) genehmigt.

**Tab. 6: Verwendete genetisch veränderte Mausstämme**

Stamm	Genetischer Hintergrund	Herkunft	Zweck	Referenz
CD11c-hDC-SIGN <sup>tg</sup>	C57BL/6	Dr. med. T. Sparwasser TU München	Untersuchung der Funktion von DC-SIGN während einer experimentellen Tuberkulose.	(155)
BAC-hDC-SIGN <sup>tg</sup>	C57BL/6	Dr. med. T. Sparwasser TU München		
MR <sup>-/-</sup>	C57BL/6	M.C. Nussenzweig, M.D., Ph.D. Rockefeller University, New York, USA	Untersuchung der Funktion des MR während einer Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> .	(74)

### **B.5. Isolierung und Kultivierung muriner Zellen**

#### **B.5.1. Gewinnung von murinen Knochenmarkszellen**

Durch intraperitoneale Injektion eines hochdosierten Narkotikums erfolgte die Tötung der Maus. Die Maus wurde mit einer Schere an der Peritonealseite geöffnet. Nach dem Freilegen der Hinterbeine wurden diese entnommen und auf Eis gekühlt. Das Gewebe von Femur und Tibia wurde mit Hilfe einer Schere entfernt und die Knochen voneinander getrennt. Mit einer sterilen Schere wurden die Knochenenden vorsichtig abgeschnitten und somit die Knochenhöhlen eröffnet. Über einem 50 ml-Röhrchen (NUNC) wurden die Knochen vorsichtig mit PBS ausgespült. Die Zellsuspension aus Knochenmark-vorläuferzellen wurde für 10 Minuten bei 320 x g, 4°C zentrifugiert (Rotanta460R; HETTICH ZENTRIFUGEN). Nach Abnehmen des Überstandes, wurden die Zellen in 1 ml RCLB-Puffer resuspendiert. Es erfolgte eine Inkubation von 5 min auf Eis. Die Reaktion wurde mit 25 ml R10-Medium abgestoppt. Nach erneuter Zentrifugation (320 x g, 10 min, 4°C) wurde das Zellpellet in PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zählung der Knochenmarkvorläuferzellen erfolgte unter Ausschluss der durch Trypanblau (FLUKA) blaugefärbten (toten) Zellen. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau verdünnt und in einer Zählkammer (BRAND) der Anteil der ungefärbten lebenden Zellen bestimmt.

#### **B.5.2. Generierung von dendritischen Zellen**

Die Gewinnung dendritischer Zellen erfolgte nach einer modifizierten Methode basierend auf der Beschreibung von Lutz und Mitarbeitern (156).

Je  $2 \times 10^6$  Zellen wurden in 10 ml Differenzierungsmedium für murine dendritische Zellen mit 20 ng/ml rmGM-CSF (R&D SYSTEMS) in Kulturschalen (100 x 15 mm; FALCON1029, BD BIOSCIENCES) ausgesät. Die Zellen wurden für 3 Tage bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> bebrütet. An Tag 3 wurden zusätzlich 10 ml Differenzierungsmedium mit 20 ng/ml rmGM-CSF in die Kulturschalen gegeben. Die Zellen wurden erneut für 3 Tage bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> bebrütet. Der Mediaustausch an Tag 6 erfolgte durch Abnahme von 10 ml Medium, Zentrifugation (320 x g, 10 min, 4°C), Resuspension des Pellets in 10 ml Differenzierungsmedium mit 10 ng/ml

rmGM-CSF und Wiedergabe auf die in den Kulturschalen verbliebenen Zellen. Die Ernte der Zellen erfolgte an Tag 8 durch Abnahme des Überstandes und abspülen der nicht adhärenen Zellen. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (320 x g, 10 min, 4°C), Abnahme des Überstandes und Resuspension des Pellets in R10-Zellkulturmedium wurde nach Färbung mit Trypanblau die Zellzahl bestimmt und die Viabilität der Zellen bestimmt.

### **B.5.3. Generierung von Makrophagen**

Die Generierung der Makrophagen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Sarmiento et al. (157) und Reiling et al. (158).

Die Knochenmarkvorläuferzellen (siehe B.5.1) wurden zum Entfernen der Fibroblasten in 10 ml Differenzierungsmedium für murine Makrophagen mit 50 ng/ml rhM-CSF (R&D SYSTEMS) resuspendiert und auf einer Gewebekulturschale (NUNC) ausgesät. Die Zellen wurden 16-24 h bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die nicht adhärenen Zellen wurden abgenommen und zentrifugiert (320 x g, 10 min, 20°C). Das Pellet wurde in Differenzierungsmedium mit 50 ng/ml rhM-CSF resuspendiert und auf Kulturschalen (92 x 16 mm; SARSTEDT) mit einer Dichte von  $1,5-2,0 \times 10^7$  Zellen ausgesät. Nach dreitägiger Kultivierung (37°C/5% CO<sub>2</sub>) wurde das Medium ausgetauscht. An Tag 7 wurden die ausdifferenzierten Makrophagen geerntet. Dazu wurde das Medium entfernt und in die Kulturschalen je 5 ml 37°C warme Accutaselösung (PAA) gegeben. Die Ablösung der Makrophagen erfolgte während einer 15minütigen Inkubation bei 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Die Kulturschalen wurden zweimal mit warmen PBS gewaschen und die gesamte Zellsuspension bei 320 x g (10 min, 20°C) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in Zellkulturmedium für Makrophagen resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte unter Ausschluss der toten Zellen mit Hilfe von Trypanblau.

### B.5.4. Analyse der gewonnenen Zellen

#### B.5.4.1. Charakterisierung dendritischer Zellen

Je  $3 \times 10^6$  der dendritischen Zellen wurden zunächst bei  $380 \times g$  für 2 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert (MIKRO 22R; HETTICH ZENTRIFUGEN). Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen durch Resuspension in FACS-Puffer resuspendiert und durch erneute Zentrifugation ( $380 \times g$ , 2 min,  $4^\circ\text{C}$ ) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in  $\alpha$ -FC- $\gamma$ -Rezeptor für 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert und  $150 \mu\text{l}$  FACS-Puffer zugegeben. Nach Aufteilung der Zellen (jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen /  $25 \mu\text{l}$ ) wurden  $100 \mu\text{l}$   $\alpha$ -CD11c-FITC- und  $\alpha$ -I-A<sup>b</sup> (MHC II)-Biotin-Antikörper (siehe Tab. 5) zugegeben. Nach Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  für 15 min wurden die Antikörper durch zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt. Es folgte ein zweiter Färbeschritt durch Zugabe von  $100 \mu\text{l}$  Streptavidin-PE. Zum Nachweis von humanem DC-SIGN und dem Makrophagen-Mannose-Rezeptor wurde das oben beschriebene Zellpellet mit  $100 \mu\text{l}$   $\alpha$ -CD11c- und  $\alpha$ -hDC-SIGN-PE- bzw.  $\alpha$ -MR-PE-Antikörper für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Zur Analyse der Reinheit der dendritischen Zellkultur erfolgte eine Färbung mit  $\alpha$ -GR1-,  $\alpha$ -IgM und  $\alpha$ -CD45/B220. Die Färbeschemata wurden auch mit den Isotyp-Kontrollen der jeweiligen Antikörper angewandt. Nach zweimaligem Waschen wurden  $100 \mu\text{l}$  Propidiumiodid-Lösung ( $1 \mu\text{g/ml}$ ; SIGMA) zur Lebend-Tod-Unterscheidung der Zellen zugegeben. Es erfolgte die sofortige Messung am Durchflusszytometer.

#### B.5.5. Funktion der Zellen

Die zu dendritischen Zellen (DCs) bzw. Makrophagen ( $M\phi$ ) ausdifferenzierten Zellen (Abschnitt B.5.2 und B.5.3) wurden zu  $5 \times 10^5$  Zellen in  $500 \mu\text{l}$  R10-Medium (dendritische Zellen) bzw. MMM-Medium (Makrophagen) in die 24-Vertiefungen einer Flachboden-Zellkulturplatte (NUNC) ausgesät. Bei  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$  wurden die dendritischen Zellen für 1 h und die Makrophagen über Nacht vorinkubiert.

Für die Stimulation mit mannosyliertem Lipoarabinomannan (manLAM) wurden die dendritischen Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen in  $100 \mu\text{l}$  R10-Medium in einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät.

### B.5.5.1. Stimulation dendritischer Zellen und Makrophagen

Die unreifen dendritischen Zellen der hDC-SIGN-transgenen- und C57BL/6-Mäuse wurden mit LPS und mannosyliertem Lipoarabinomannan (manLAM) einzeln als Kontrolle sowie gemeinsam in den jeweils angegebenen Konzentrationen inkubiert. Nach 8 h Inkubation bei 37°C /5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellkulturüberstände der Kulturen abgenommen und bei -20°C bis zur späteren Analyse aufbewahrt.

Für die Analyse der Zytokinproduktion wurden die dendritischen Zellen und die Makrophagen mit LPS als Kontrollstimulus sowie den *M. tuberculosis*-Stämmen H37Rv, CDC1551, Beijing3547 und Beijing4203 in den jeweils angegebenen Konzentrationen inkubiert. Nach 24stündiger (DCs) und 8stündiger (Mφ) Inkubation bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> wurden die Überstände der Zellkulturen abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Für die Analyse der DC's auf die Expression von mRNA wurden die Zellen mit LPS und den oben beschriebenen *M. tuberculosis* -Stämmen für 4 h bei 37°C /5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellkulturplatten für 10 min bei 320 x g und 4°C zentrifugiert, die Zellkulturüberstände für den Nachweis freigesetzter Zytokine abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Das restliche Kulturmedium wurde sorgfältig entfernt und die Zellen in 500 µl Phenol/Guanidinisothiocyanat-Lösung (TriFast; PEQLAB) lysiert. Nach Zugabe von 130 µl sterilem PBS und sorgfältigem Vermischen wurden die Lysate bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **B.6. Tierexperimentelle Arbeiten**

#### **B.6.1. Aerosolinfektion der Tiere**

Für die Aerosolinfektion wurden die Mäuse in spezielle Aerosolkäfige (Marine & Industrie Technik, Hamburg) überführt. Diese Käfige wurden in ein Inhalationssystem (Modell 099C A4224; GLAS-COL) gestellt. Um die Mykobakterienaggregate aufzulösen wurde die Suspension mithilfe einer 26G-Kanüle (BD BIOSCIENCES) 10x in eine 1 ml-Spritze gezogen (BD BIOSCIENCES) und wieder entlassen. In Vorversuchen wurde die optimale Bakterienkonzentration für eine Infektionsdosis von  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$  sowie  $2 \times 10^3$  KBE *M. tuberculosis* (H37Rv) pro Tier ermittelt. Für die Infektion wurden  $5 \times 10^6$  (100 Keime pro Lunge),  $3,75 \times 10^7$  (1000 Keime pro Lunge),  $6,25 \times 10^7$  (2000 Keime pro Lunge) auf 6 ml mit sterilem Wasser gegeben. Von dieser Suspension wurden 500  $\mu$ l entnommen und in einer seriellen Verdünnungsreihe (1:10-1:10<sup>6</sup>) auf OADC-Platten ausplattiert. Mit Hilfe einer Spritze wurden die verbliebenen 5,5 ml in das Vernebelungsgefäß (GLAS-COL, Indiana, USA) gegeben. Das System wurde vollständig geschlossen und gestartet. Mit einem Programm von 900 s Vorwärmzeit, 2400 s Vernebelungszeit, 2400 s Absaugzeit und 900 s Dekontaminationszeit wurden die Tiere infiziert. Während der Aerosolinfektion wurde der Durchflussdruck der Hauptluft konstant auf 60 CFH (Kubik Fuß je Stunde = 1,68 m<sup>3</sup>/h) gehalten und zu Beginn der Vernebelung die Kompressionsluft auf 10 CFH (=0,28 m<sup>3</sup>/h) eingestellt.

Nach Beendigung der Infektion wurden die Tiere aus den Aerosolkäfigen in normale Käfige überführt. Das Inhalationssystem wurde durch Verwendung von 2%igem Buraton dekontaminiert. Einen Tag nach der Infektion wurde die Keimlast der Lunge zur Kontrolle der tatsächlichen Infektionsdosis bei 4 Mäusen bestimmt.

#### **B.6.2. Bestimmung von Überlebensraten infizierter Tiere**

Die infizierten Mäuse wurden ab Beginn der Infektion regelmäßig beobachtet und gewogen. Erreichten die infizierten Mäuse einen Grenzwert von 25% weniger Körpergewicht gegenüber nicht infizierten Kontrollmäusen, wurden sie mittels einer überdosierten Narkose schmerzfrei getötet.

### **B.6.3. Gewinnung von Organen und Serum aus infizierten Tieren**

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Keimzahl, Pathologie und Immunparameter in den Lungen infizierter Mäuse bestimmt. Die Tötung erfolgte durch eine überdosierte intraperitoneale Narkose nach Injektion von je 800 µl Narkotikum. Im direkten Anschluss erfolgte die Öffnung der Bauchdecke und die Blutentnahme aus der Vena cava inferior. Das Blut wurde in Serumseparationsröhrchen (BD BIOSCIENCES) bei 6000 x g (MIKRO 200R; HETTICH ZENTRIFUGEN) zentrifugiert und das gewonnene Serum bei -80 °C aufbewahrt. Für die Genotypisierung der Mäuse wurde ein kleines Stück Schwanz abgeschnitten und ebenfalls bei -80 °C verwahrt. Zur Bestimmung der Keimlast, für PCR-Analysen und für histopathologische Analysen wurden die Lungen entnommen und gewogen. Der Oberlappen und der Mittellappen des rechten Lungenflügels wurden gewogen und für die Herstellung von Homogenat und zur Keimlastbestimmung verwendet. Der Oberlappen des linken Lungenflügels wurde mit 500 µl 4%igem Formalin mit Hilfe einer 1 ml Spritze aufgespritzt und in einem Histogrid (SIMPORT, Bernard-Pilon, Kanada) in 4%igem Formalin zur späteren histologischen Untersuchung fixiert. Der Unterlappen des rechten Lungenflügels und der Oberlappen des linken Lungenflügels wurden in 1 ml Guanidinisothiocyanat (GUTC)-Puffer in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

### **B.6.4. Herstellung von Lungenhomogenaten und Bestimmung der Keimzahl in infizierten Lungen**

Im Anschluss an die Entnahme der Lungenflügel (B.6.3) wurden diese in sterilem Wasser mit Zusatz von 0,05% Tween-80 mit Hilfe eines Homogenisators (PotterS, B. BRAUN) und sterilen bei -20 °C gekühlten Pistillen (RETTBERG) mittels 3-5 Hüben homogenisiert. Von dem Lungenhomogenat wurde jeweils 1 ml in sterile Eppendorf-Gefäße überführt und bei 4 °C und 10.000 x g für 15 min zentrifugiert (MIKRO 200R; HETTICH ZENTRIFUGEN). Von dem restlichen Homogenat wurden 500 µl in einer seriellen Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:10<sup>1</sup>-1:10<sup>5</sup>) in sterilem Wasser, versetzt mit 0,05% Tween-80 verdünnt und auf OADC-Platten

ausgestrichen. Die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) wurde nach einer Inkubation von 3 Wochen bei 37 °C ausgezählt und die Keimlast der Lunge anhand des Organgewichts berechnet.

### **B.6.5. Herstellung von Homogenaten für die RNA-Isolierung aus Lungen**

Die in Abschnitt B.6.3 beschrieben, eingefrorenen Lungenflügel wurden aufgetaut und in 2 ml Phenol/Guanidinisothiocyanat-Lösung (TriFast; PEQLAB) überführt. Im Anschluss wurden die Lungen mit Hilfe eines Homogenisators (PotterS; B. BRAUN) und sterilen bei -20 °C gekühlten Pistillen (RETTBERG) homogenisiert. Das Lungenhomogenat wurde nach Zugabe von 500 µl kaltem PBS gemischt und in jeweils zwei RNase-freie Reaktionsgefäße (EPPENDORF) aufgeteilt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

### **B.6.6. Histologische Untersuchungen**

#### **B.6.6.1. Organaufbereitung**

Nach 24stündiger Fixierung in 4%igem Formalin wurden die Lungen in einem Gewebeeinbettautomaten (PathCentre; SHANDON) in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert ( 45 min 50% Ethanol (MERCK); 45 min 70% Ethanol; 45 min 95% Ethanol; 3x 45 min Ethanol absolut; 3x 45 min Xylol (SHANDON); 2x 60 min 65 °C heißes Paraffin (SHERWOOD MEDICAL) und anschließend in einer Paraffingießstation (Leica EG1140C; LEICA) bei 65 °C in flüssigem Paraffin eingebettet. Die abgekühlten Paraffinblöcke wurden bei 4 °C aufbewahrt.

#### **Paraffinschnitte**

An einem Rotationsmikrotom (Leica RM2155; LEICA) wurden die auf Eis gekühlten Paraffinblöcke in 10 µm Schritten so lange angeschnitten, bis die Organe im Schnitt gut sichtbar waren. Anschließend wurden 2 µm dünne Paraffinschnitte angefertigt und mit Hilfe einer Pinzette in ein kaltes Wasserbad überführt. Nachdem alle Luftblasen und Falten entfernt waren, wurden die Schnitte in ein 37 °C warmes Wasserbad (GFL1052; GFL) zum Strecken überführt und mit



einem Objektträger (SuperFrostPlus; LANGENBRINCK) aufgenommen. Die Paraffinschnitte wurden für 4 h bei 37°C getrocknet.

### **B.6.6.2. Histologische und immunhistochemische Färbungen**

Für die Färbungen wurden die Schnitte dreimal aufeinanderfolgend in Rotihistol (ROTH) für jeweils 5 min entparaffiniert und im Anschluss für 1 min in Rotihistol und Ethanol (1:1) geschwenkt. Mittels Schwenken in einer absteigenden Alkoholreihe (3x Ethanol absolut; 1x 96% Ethanol; 1x 80% Ethanol; 1x 40% Ethanol), an deren Ende die Schnitte in *aqua bidest* verblieben, wurden diese gewässert.

#### **Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung**

Die histologische Untersuchung erfolgte mittels einer modifizierten Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (159, 160). Nach der Bewässerung der Schnitte erfolgte eine 20minütige Färbung mit Hämatoxylin nach Gill, welches Chromatin blau anfärbt. Das Bläuen der Schnitte erfolgte durch Schwenken in *aqua bidest* und unter fließendem Leitungswasser für 10 min. Mit einer Kontrastfärbung in 1% Eosin, wurde das Zytoplasma innerhalb von 3 min rot gefärbt. Überschüssige Farbreste wurden mit *aqua bidest* entfernt. Mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (1x 70% Ethanol; 2x 96% Ethanol; 2x Ethanol absolut) erfolgte die Entwässerung. Durch Überführen in Ethanol und Rotihistol (1:1) und die Endbehandlung mit Rotihistol erfolgte die Vorbereitung auf das Eindeckeln mit Eindeckmedium (Entellan; MERCK).

#### **Ziehl-Neelsen (ZN)-Färbung**

Die Färbung der Paraffinschnitte mit der Ziehl-Neelsen-Färbung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach F. A. Brandt (161). Mykobakterien in infizierten Lungen wurden mit Hilfe von Karbolfuchsin angefärbt und mit Methyleneblau gegengefärbt. Die entparaffinierten und gewässerten Gewebeschnitte wurden mit Karbolfuchsin-Lösung bedeckt und anschließend dreimal erhitzt. Nach Abkühlung und Waschen der Präparate in *aqua bidest*

wurden die Schnitte mit salzsaurem Ethanol entfärbt. Nach dem Waschen der Schnitte mit *aqua bidest* wurden die Schnitte in Löfflers-Methylenblau für 1 min gegengefärbt. Durch Schwenken in *aqua bidest*, 96% Ethanol und Isopropanol erfolgte die Vorbereitung auf das Eindeckeln mit Eindeckmedium.

### **Färbung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS2)**

Zum immunhistochemischen Nachweis von NOS2 wurden die Paraffinschnitte, nachdem sie entparaffiniert wurden (siehe Abschnitt B.6.6.2) gewässert und dreimal in TBS-Puffer gewaschen. Die Wiederherstellung der Antigenkonformation erfolgte durch zweiminütiges Kochen der Präparate in Zitratpuffer in einem Schnellkochtopf (162). Die Schnitte wurden dreimal mit TBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine 10minütige Inkubation in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS. Wiederum wurden die Schnitte wie beschrieben gewaschen und im Anschluss für 45 min mit einem polyklonalem Kaninchen- $\alpha$ -NOS2-Antikörper in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Schnitte in TBS wurde der Sekundärantikörper, ein Peroxidase-gekoppelter Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper gemeinsam mit Mausserum für 45 min auf Präparate gegeben. Nach dem Entfernen des überschüssigen Antikörpers durch Waschen mit TBS erfolgte die Zugabe eines Peroxidase-gekoppelten Kaninchen- $\alpha$ -Ziege-IgG-Antikörpers als Tertiärantikörper zur Signalverstärkung. Nach 45 min wurde erneut gewaschen und die Substratlösung (TM 3,3'-Diaminobenzidin Tabletten Set; SIGMA) auf die Präparate gegeben. Die enzymatische Reaktion wurde nach lichtgeschützter Inkubation von 10-15 min bei Raumtemperatur mikroskopisch kontrolliert und mit TBS-Puffer abgestoppt. Nachfolgend diente eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Gill. Jeder Objektträger wurde im Anschluss mit 75  $\mu$ l Kaisers Glyceringelatine (MERCK) eingedeckt.

Die Photodokumentation der histologischen Präparate erfolgte mit einer digitalen Kamera (Digital Sight DS-L1; NIKON)

## **B.7. Bestimmung der Zytokinexpression**

### **B.7.1. RNA-Isolierung aus Zelllysaten**

Die Lysate (Abschnitt B.5.5.1 und B.6.5) wurden bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Nach Zugabe von 1/10 des Volumens 1-Brom-3-Chlorpropan (SIGMA) wurden die Lysate 15 s kräftig geschüttelt. Nach der 15minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Trennung der klaren Wasserphase (Gesamt-RNA) von der organischen Phase (Proteine) durch Zentrifugation bei 12.000 x g (15 min, 4°C; MIKRO200R). Die entstandene weiße Interphase enthielt DNA. Die RNA-enhaltende wässrige Phase (ca. 60%) wurde in 600 µl- bzw. 250 µl-Portionen in sterile, RNase-freie Reaktionsgefäße (2 ml) überführt, in die je 1 µl lineares Polyacrylamid (SIGMA) als Fällhilfe vorgelegt wurde. Durch Zugabe des gleichen Volumens 2-Propanol wurde die RNA bei 4°C gefällt (Inkubation mindestens 15 min), zentrifugiert (12.000 x g, 15 min, 4°C) und das Präzipitat anschließend zweimal mit 500 µl 75%-igem eiskaltem Ethanol gewaschen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA in 500 µl Ethanol bei -80°C gelagert.

Für die weitere Aufarbeitung wurden die RNA-Pellets zentrifugiert (12.000 x g, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen und die Präzipitate so lange an Luft getrocknet, bis diese fast durchsichtig waren. Die präzipitierte RNA wurde in jeweils 200 µl (Lungenhomogenat) bzw. 50 µl (Zelllysate) Wasser, das zuvor mit Diethylpyrocarbonat (DEPC; AMBION) behandelt wurde, gelöst.

Die RNA-Konzentration sowie die Reinheit wurden photometrisch durch die Bestimmung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm überprüft (Biophotometer; EPPENDORF).

### **B.7.2. Reverse Transkription (RT)**

Die in der Gesamt-RNA enthaltene mRNA wurde mit Hilfe von oligo-dT-Nukleotiden (12-18mer) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Das Erstellen der der Lösungen für die RT erfolgte auf Eis. Zu 8 µl isolierter RNA wurden 2 µl oligo-dT-Nukleotide pipettiert. Durch die nachfolgende Inkubation von 10 min bei 65°C in einem Heizblock (EPPENDORF) wurden die Sekundärstrukturen der RNA aufgelöst.

Jedem Reaktionsansatz wurden

- 4 µl 5x First Strand Puffer
- 2 µl 100mM DTT
- 2 µl 10 mM dNTP
- 1 µl RNase-Inhibitor (RNAsin)
- 1 µl Reverse Transkriptase (Superscript II RT)

zugemischt, vorsichtig gemischt und kurz an zentrifugiert. Die RT erfolgte bei 37°C für 90 min im Heizblock (EPPENDORF). Durch 2minütige Inkubation des Reaktionsansatzes bei 95°C wurde die Enzymreaktion gestoppt. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 180 µl steriles Wasser gegeben und diese enthaltene cDNA bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### **B.7.3. Quantitative PCR mittels LightCycler**

Die quantitative Analyse der Expression von Genprodukten wurde an einem ThermoCycler (LightCycler; ROCHE) mit der LightCycler Software (Version 3.5; ROCHE) durchgeführt. Je Reaktionsansatz wurden

- |         |  |
|---------|--|
| 4,55 µl | steriles Wasser                        |
| 1,40 µl | 10x PCR-Puffer                         |
| 0,70 µl | 50 mM MgCl <sub>2</sub>                |
| 0,50 µl | 100 µM dNTP (PEQLAB)                   |
| 0,60 µl | 100 mM BSA (NEB)                       |
| 0,40 µl | 6,25 µM sense Primer                   |
| 0,40 µl | 6,25 µM antisense Primer               |
| 0,20 µl | SYBR-Green (1:1000 in DMSO)            |
| 0,25 µl | Taq-DNA-Polymerase (500 U; INVITROGEN) |

zu 1 µl cDNA hinzugefügt und durch kurze Zentrifugation bei 2.000 x g in einer Glaskapillare gemischt. Die verwendeten Gen-spezifischen Primer sind in Tab. 7 aufgeführt. Die PCR-Reaktionen erfolgten nach folgendem Protokoll: 15 s bei 95°C; 35-45 Zyklen je nach verwendetem Primerpaar 5 s 95°C, 10 s 60°C (Annealing Temperatur), 10 s 72°C (Elongationstemperatur), 1 s Analysetemperatur (Temperatur, bei der die Fluoreszenzmessung für in doppelsträngige

DNA inkorporierte SYBR-Green erfolgte). Die Analysetemperaturen sind Tab. 7 zu entnehmen. cDNA dendritischer Zellen nach Inkubation (24 h) mit LPS in den Zellkulturlysaten, sowie cDNA infizierter Lungen der tierexperimentellen Analysen (unverdünnt, 1:2, 1:8, 1:32, 1:128) diente als interner Standard. Die Quantifizierung der untersuchten Proben erfolgte mittels der LightCycler Software. Den Standardverdünnungen wurden entsprechend der Verdünnungsreihe Expressionswerte zwischen 100 (unverdünnt) und 0,781 (1:128) zugeordnet. Aus definierten Standardwerten wurde eine Standardkurve durch lineare Regression ermittelt. Die Expressionswerte der zu analysierenden Proben wurden mittels der Regressionsgeraden relativ zu den Expressionswerten der Standardverdünnungen ermittelt. Die Expression der mRNA wurde gegen die Expression des „house keeping genes“ Hypoxanthine-Guanine-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) (163, 164) dargestellt.

**Tab. 7: Primersequenzen, Fragmentgrößen und Analysetemperaturen**

Gen	sense Primer	antisense Primer	Produkt [bp]	Analyse-temp. [°C]
HPRT	GCAGTACAGCCCCAAAATGG	AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA	84	78
TNF- $\alpha$	TCTCATCAGTTCTATGGCCC	GGGAGTAGACAAGGTACAAC	211	80
IL-12p40	CTGGCCAGTACACCTGCCAC	GTGCTTCCAACGCCAGTTCA	383	80
IFN- $\gamma$	GCTCTGAGACAATGAACGCT	AAAGAGATAATCTGGCTCTGC	228	80
NOS2	AGCTCCTCCCAGGACCACAC	ACGCTGAGTACCTCATTGGC	481	80

## **B.8. Bestimmung von Zytokinkonzentrationen mit Hilfe der ELISA-Technik**

### **Funktionsprinzip**

Die verwendeten ELISAs (*enzyme linked immunosorbent assays*) beruhen auf dem „Sandwich“-Prinzip. An einen primären zytokinspezifischen Antikörper, der auf dem Boden einer Mikrotiterplatte haftet, wird das entsprechende Zytokinmolekül gebunden. Mit einem zweiten zytokinspezifischen Antikörper, welcher ein anderes Epitop erkennt, kann das gebundene Zytokinmolekül detektiert werden. Sämtliche benötigten Antikörper sind in Tab. 2 und Tab. 3 dargestellt. Der Nachweis erfolgte in allen Fällen durch eine Peroxidase-vermittelte Farbreaktion, welche in einem ELISA-Lesegerät (Sunrise; TECAN) bei einer Absorptionswellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software „Magellan“ (TECAN).

### **B.8.1. Bestimmung der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Zellkulturüberstand**

Flachboden-Mikrotiterplatten (96-Vertiefungen, Maxisorp; NUNC) wurden mit dem primären Antikörper (1:180 in PBS) zu 50  $\mu$ l pro Vertiefung sensibilisiert. Nach 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen mit mindestens 300  $\mu$ l Waschpuffer pro Vertiefung entfernt. Zur Absättigung freier Proteinbindungskapazität der Mikrotiterplatten wurden in jede Vertiefung 200  $\mu$ l Blockpuffer gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde als Standard rekombinantes murines TNF- $\alpha$  in einer Konzentration von 2000 pg/ml in einem Volumen von 50  $\mu$ l in Doppelreihen aufgetragen und mit Verdünnungspuffer in Halbierungsschritten seriell bis 15,625 pg/ml verdünnt. Die Überstandsproben (siehe B.5.5) wurden in 50  $\mu$ l (in den Verdünnungstufen von 1:3; 1:9; 1:27) pro Vertiefung gegeben. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 4°C wurde die Mikrotiterplatte erneut mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Zugabe des sekundären, Biotin-gekoppelten Antikörpers (1:180 in Verdünnungspuffer) in einem Volumen von 50  $\mu$ l pro Vertiefung sowie eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach

dreimaligem Waschen wurden je 50 µl Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin (1:200 in Verdünnungspuffer) in die Vertiefungen gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Enzymlösung wurde anschließend durch dreimaliges Waschen entfernt. Durch Zugabe von je 100 µl TMB-Substratlösung sowie Inkubation von 5-15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln kam es zum Substratumsatz. Diese Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt.

### **B.8.2. Bestimmung der IL-12p40-Konzentration im Zellkulturüberstand**

In die Vertiefungen einer Flachboden-Mikrotiterplatte (96-Vertiefungen, Maxisorp; NUNC) wurden 50 µl pro Vertiefung primärer Antikörper (1:1000 in Beschichtungspuffer) zur Sensibilisierung der Platte gegeben. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C wurden überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen mit mindestens 300 µl Waschpuffer pro Vertiefung entfernt. Die Absättigung freier Proteinkapazitäten erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit Blockpuffer. Nach dreimaligem Waschen wurde als Standard rekombinantes murines IL-12p40 in einer Konzentration von 100 ng/ml in einem Volumen von 50 µl in Doppelreihen aufgetragen und mit Verdünnungspuffer in Halbierungsschritten seriell bis 781,25 pg/ml verdünnt. Die Zellkulturüberstände (siehe B.5.5) wurden ebenfalls in 50 µl (in den Verdünnungstufen von 1:3; 1:9; 1:27) pro Vertiefung aufgetragen. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 4°C wurde die Mikrotiterplatte erneut mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Zugabe des sekundären, Biotin-gekoppelten Antikörpers (1:1000 in Verdünnungspuffer) in einem Volumen von 50 µl pro Vertiefung sowie eine zweistündige Inkubation bei 37°C. Nach dreimaligem Waschen wurden je 50 µl Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin (1:1000 in Verdünnungspuffer) in die Vertiefungen hinzugefügt und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkel inkubiert. Die Enzymlösung wurde anschließend durch dreimaliges Waschen entfernt und durch Zugabe von je 50 µl Tetramethylbenzidin-Substratlösung sowie Inkubation von 1-5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln kam es zum Substratumsatz. Diese Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt.

### **B.8.3. Bestimmung der IL-12p40-, TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Seren und Homogenaten**

Eine 96er-Flachboden-Mikrotiterplatte wurde mit 50  $\mu$ l eines 1:250 in Beschichtungspuffer verdünnten primären Antikörpers (Tab. 3) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit mindestens 300  $\mu$ l Waschpuffer je Vertiefung entfernt. Zum Absättigen der freien, nicht gebundenen Stellen in der Vertiefung wurde in jede Vertiefung 200  $\mu$ l Verdünnungspuffer gegeben. Nach dreimaligem Waschen wurde der zytokinspezifische Standard (TNF- $\alpha$ , IL-12p40, IFN- $\gamma$ ) in einer Konzentration von 10 ng/ml (IL-10 zu 2 ng/ml) zu 50  $\mu$ l in die Vertiefungen gegeben. Der Standard wurde 1:2 in Doppelwerten bis auf 78,125 pg/ml in Verdünnungspuffer verdünnt. Die Proben (siehe B.5.5 und B.6.4) wurden ebenfalls in 50  $\mu$ l pro Vertiefung (unverdünnt, 1:3-, 1:9-verdünnt) aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug bei diesem Schritt 24 Stunden bei 4 °C. Nach viermaligem Waschen wurden je 50  $\mu$ l Avidin-Block (Avidin/Biotin Blocking Kit; VECTOR LAB., Burlingame, Kalifornien, USA), um die gewebespezifische Bindung von Avidin-Biotinylierter-HRP abzublocken, für 15 min bei Raumtemperatur in die Vertiefungen gegeben. Wiederum wurde dreimal gewaschen und mit 50  $\mu$ l Biotin-Blockungsreagenz (Avidin/Biotin Blocking Kit; VECTOR LAB.) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Zugabe des sekundären Antikörpers in einer Verdünnung von 1:250 in Verdünnungspuffer in einem Volumen von 50  $\mu$ l. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach sechsmaligem Waschen wurden je Vertiefung 50  $\mu$ l Avidin-HRP-Lösung (1:250) zugegeben. Um die Enzymreaktion einzuleiten wurde nach siebenmaligem Waschen das Enzym entfernt und 50  $\mu$ l Tetramethylbenzidin-Substratlösung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10-30 min wurde die Enzymreaktion mit 50  $\mu$ l 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt.



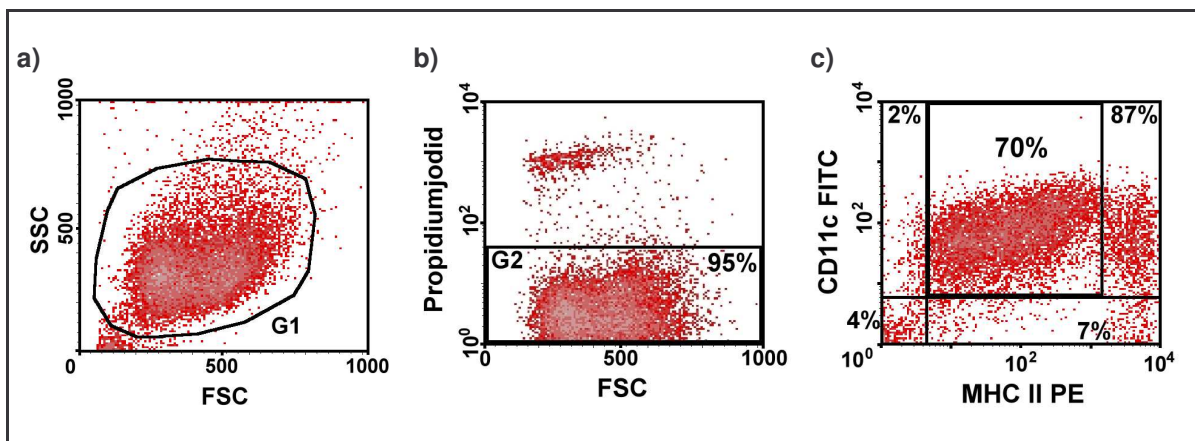
**B.9. Statistische Analysen**

Das Programm „Graph Pad Prism 4.0“ (GRAPH PAD) wurde für alle statistischen Tests verwendet. Die Ermittlung der Signifikanzen erfolgte über den Student's t-Test (two tailed, Konfidenz-Intervall 95%). Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben. Eine statistische Analyse der Überlebensrate von infizierten Mäusen erfolgte mittels des LogRank-Testes. Die Anzahl der analysierten Proben bzw. untersuchten Tiere eines Experimentes ist in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben.

## C. Ergebnisse

### C.1. Die Rolle von humanem DC-SIGN in der Zytokinproduktion *M. tuberculosis*-infizierter muriner dendritischer Zellen *in vitro*

#### C.1.1. Phänotypisierung muriner dendritischer Zellen



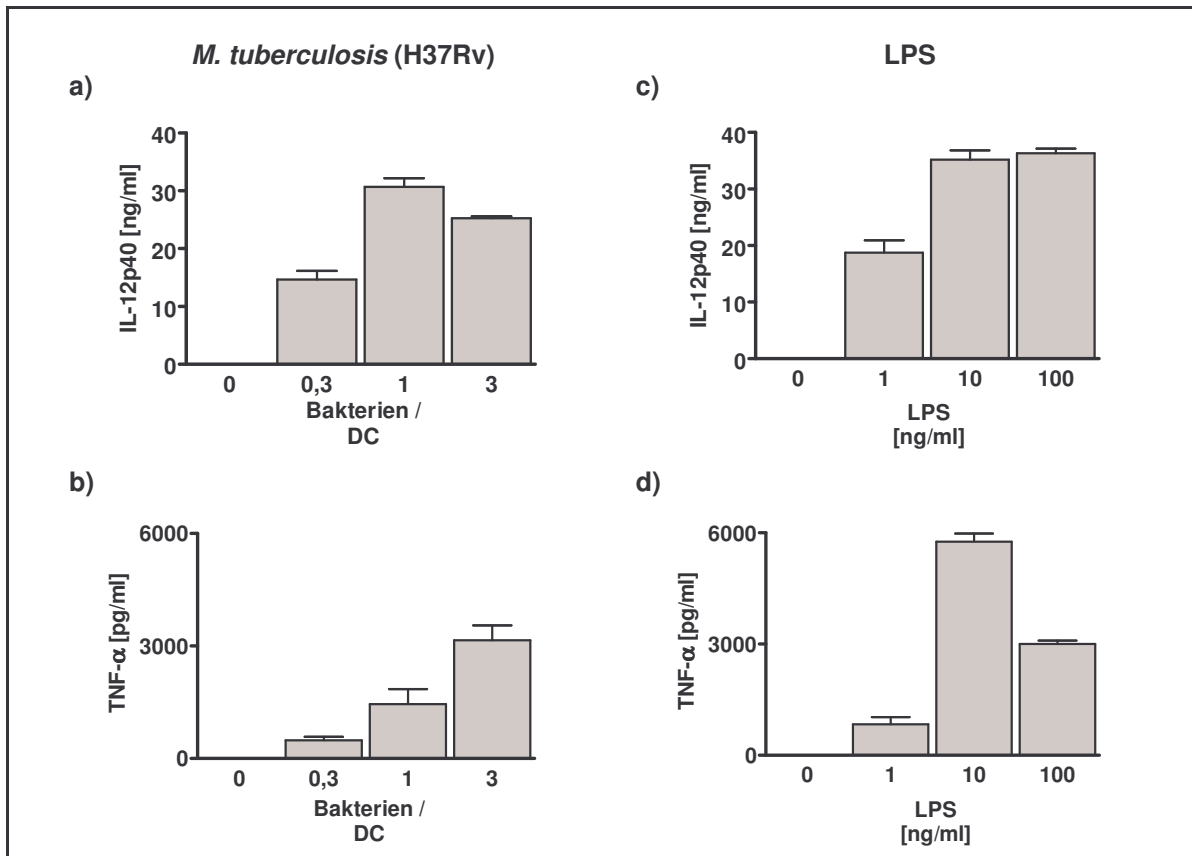
**Abb. 3. Expression von CD11c und MHC II auf murinen dendritischen Zellen aus C57BL/6-Mäusen.**

Murine dendritische Zellen wurden für 15 min mit einem Antikörpergemisch aus  $\alpha$ -CD11c und  $\alpha$ -MHC II inkubiert. Dargestellt sind SSC gegen FSC (a), PI gegen FSC aus G1 (b) und CD11c gegen MHC II aus G2 (c) CD11c/MHC II-markierter Zellen nach durchflusszytometrischer Analyse. G1: Gesamtpopulation der aus murinem Knochenmark generierten dendritischen Zellen an Tag 8; G2: Population der PI-negativen dendritischen Zellen, die auf die Expression von CD11c und MHC II analysiert wurden. Es ist ein repräsentatives Experiment von vier unabhängigen Experimenten dargestellt.

Murine dendritische Zellen wurden durchflusszytometrisch im Vorwärts (FSC)- und Seitwärts (SSC)-Streulicht analysiert. Nach Setzen einer Analyseregion (G1, Abb. 3a) wurden die Zellen der Region G1 auf die Expression von Propidiumjodid (PI) untersucht. Aus den PI-negativen Zellen (G2, Abb. 3b) aus G1 wurde die Expression von CD11c und MHC II ermittelt. Ungefähr 70% der CD11c-positiven Zellen wiesen eine mittlere Expressionsdichte von MHC II auf (Abb. 3c) und konnten somit als unreife dendritische Zellen identifiziert werden.

### C.1.2. Stimulation dendritischer Zellen mit *M. tuberculosis* und LPS

Unreife murine dendritische Zellen (DC) wurden mit *M. tuberculosis* (Stamm H37Rv) bzw. LPS in steigenden Dosen bzw. Konzentrationen für 24 h inkubiert. In Medium kultivierte dendritische Zellen dienten als Kontrolle. Die Überstände der Zellen wurden gewonnen und mittels ELISA analysiert.

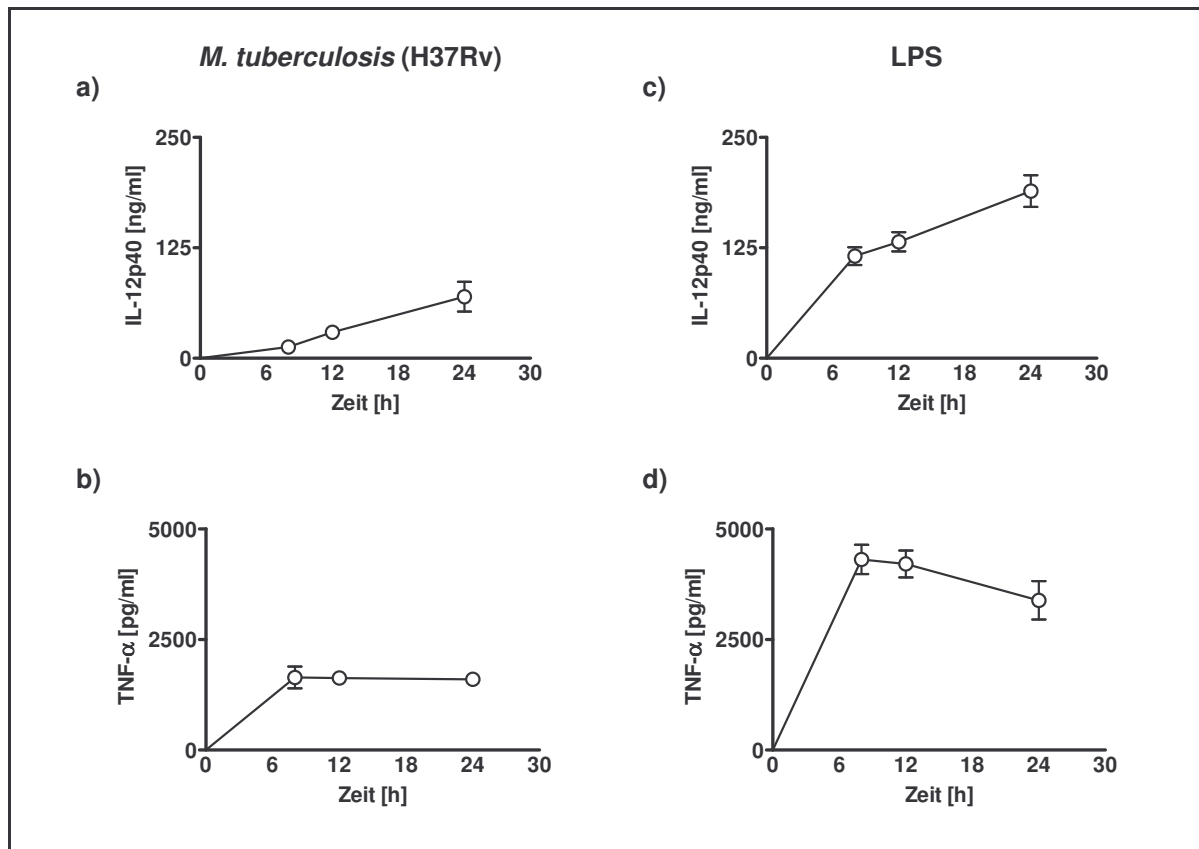


**Abb. 4. Dosisabhängigkeit der Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-12p40 nach Inkubation mit *M. tuberculosis* und LPS.**

Murine dendritische Zellen aus einer C57BL/6 Maus wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen des jeweiligen Stimulus inkubiert. Die Inkubation erfolgte in Triplikaten. Mit Hilfe eines ELISA wurde die IL-12p40- und TNF- $\alpha$ -Proteinkonzentration der Zellkulturüberstände analysiert. Es ist ein repräsentatives Experiment von zwei durchgeführten Experimenten dargestellt.

Nach 24 h Inkubation mit LPS bzw. *M. tuberculosis* konnte eine dosisabhängige Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-12p40 detektiert werden (Abb. 4). Bei Inkubation mit *M. tuberculosis* erreichte die Induktion der IL-12p40-Freisetzung bereits bei einer Dosis von drei Bakterien je dendritischer Zelle ein Plateau (Abb. 4a),

während die Freisetzung von TNF- $\alpha$  stetig anstieg (Abb. 4b). Eine maximale Produktion von IL-12p40 und TNF- $\alpha$  wurde bei Verwendung einer Konzentration von 10 ng/ml LPS beobachtet. Die Expression von IL-12p40 erreichte bei Zugabe von 100 ng/ml LPS ein Plateau, während die Expression von TNF- $\alpha$  sank (Abb. 4c-d).



**Abb. 5. Zeitkinetik der Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-12p40 nach Inkubation mit *M. tuberculosis* und LPS.**

Murine dendritische Zellen aus einer C57BL/6 Maus wurden mit einem Bakterium pro Zelle *M. tuberculosis* H37Rv (a-b) bzw einer Dosis von 10 ng/ml LPS (c-d) inkubiert. Die Inkubation erfolgte in Triplikaten. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Überstände auf die jeweiligen Zytokine untersucht. Es ist ein repräsentatives Experiment von zwei durchgeführten Experimenten dargestellt.

Als nächstes wurde der zeitliche Verlauf der Expression von TNF- $\alpha$  und IL-12p40 analysiert. Dazu wurden dendritische Zellen mit *M. tuberculosis* (H37Rv; ein Bakterium je Zelle) und LPS (10 ng/ml) inkubiert. Nach 8 h, 12 h und 24 h wurden die Kulturüberstände gewonnen und der Gehalt an TNF- $\alpha$  und IL-12p40 mittels

ELISA-Technik untersucht (Abb. 5). Die Expression von IL-12p40 stieg über den gemessenen Zeitraum bei Inkubation mit *M. tuberculosis*, wie auch bei Inkubation mit LPS stetig an (Abb. 5a und c). Die höchste Expression von TNF- $\alpha$  war bei beiden Stimuli bereits nach acht Stunden detektierbar. Während die Expression von TNF- $\alpha$  bei Inkubation mit LPS schon nach acht Stunden wieder abnahm, blieb sie bei Inkubation mit *M. tuberculosis* auf einem Plateau (Abb. 5b und d).

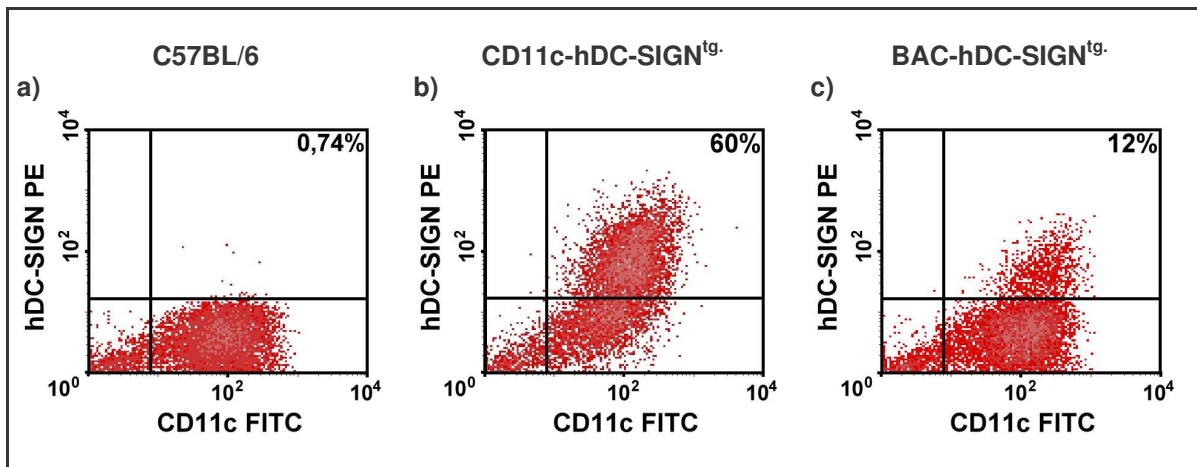
Auf Grund dieser Befunde wurden murine dendritische Zellen - sofern nicht anders angegeben - mit einem Mykobakterium pro DC bzw. 10 ng/ml LPS inkubiert und nach 24 h die Kulturüberstände zur Analyse der Zytokinfreisetzung gewonnen.

### **C.1.3. Vergleichende Analyse der Zytokinexpression in dendritischen Zellen aus C57BL/6- und hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen**

Auf murinen dendritischen Zellen gibt es fünf verschiedene DC-SIGN-Homologe. Selektiv gendefiziente Mäuse waren zum Zeitpunkt der Arbeit nicht beschrieben bzw. nicht verfügbar. In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse, die transgen für humanes DC-SIGN sind, eingesetzt. Diese Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. med. T. Sparwasser (Technische Universität München) zur Verfügung gestellt.

#### **C.1.3.1. Expression von humanem DC-SIGN (hDC-SIGN) auf murinen dendritischen Zellen**

Aus murinem Knochenmark generierte dendritische Zellen von C57BL/6-, CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- sowie BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- Mäusen wurden mit einem gegen humanes DC-SIGN gerichteten Antikörper auf ihre Expression von DC-SIGN untersucht. Während CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse DC-SIGN unter der Kontrolle des murinen CD11c-Promotors exprimieren, ist hDC-SIGN in den BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse an den humanen DC-SIGN-Promotor gekoppelt.



**Abb. 6. Expression von hDC-SIGN auf murinen dendritischen Zellen aus C57BL/6-, CD11c-DC-SIGN<sup>tg</sup>- und BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen.**

Murine dendritische Zellen der verschiedenen Mausstämme wurden für 15 min mit einem Antikörpergemisch aus  $\alpha$ -CD11c und  $\alpha$ -hDC-SIGN inkubiert. Nach Zugabe von Propidiumiodid wurden die PI-negativen Zellen auf die Expression von h-DC-SIGN und CD11c in C57BL/6- (a), CD11c-DC-SIGN<sup>tg</sup>- (b) und BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (c) Mäusen durchflusszytometrisch analysiert. Es ist ein repräsentatives Experiment von vier unabhängigen Experimenten dargestellt.

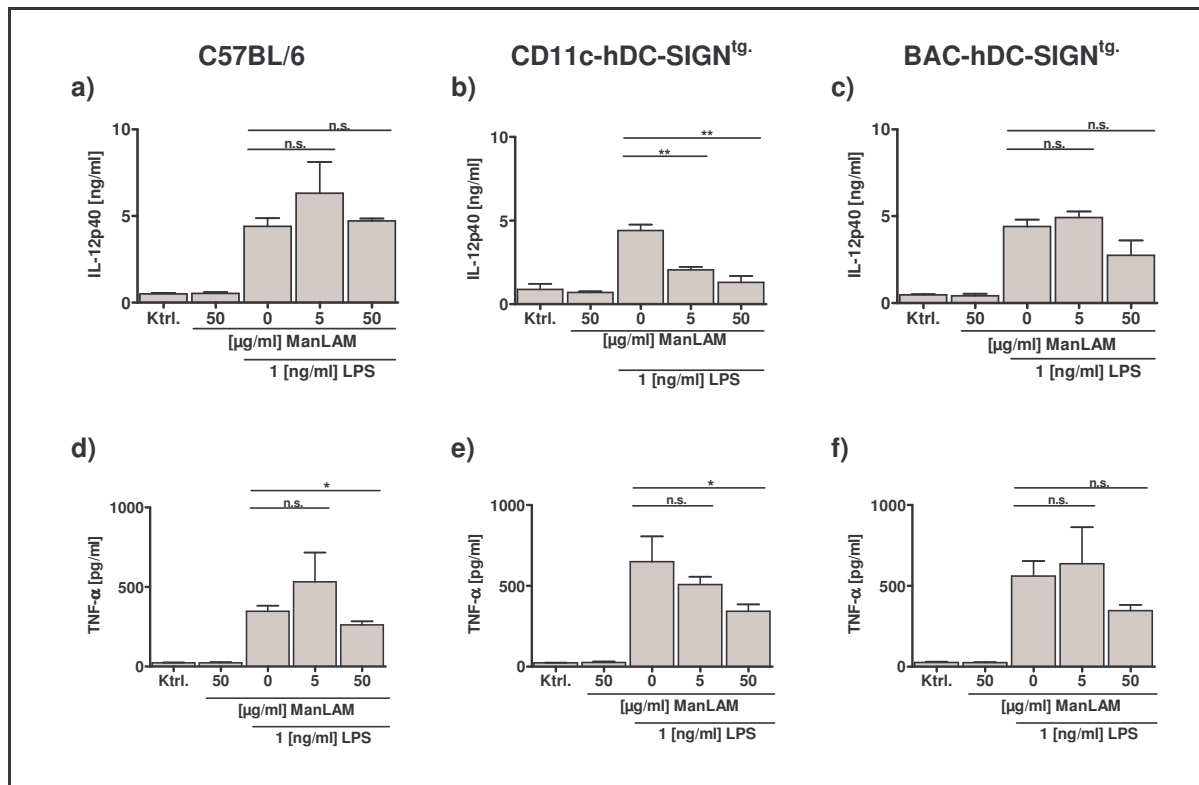
Die Auswahl der auf humanes DC-SIGN untersuchten Zellen erfolgte nach dem Schema wie in C.1.1 beschrieben. Die PI-negativen Zellen wurden auf die Expression von CD11c und hDC-SIGN untersucht.

Die auf hDC-SIGN untersuchten CD11c-positiven Zellen (dendritische Zellen) der CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen waren zu 60% positiv für DC-SIGN (Abb. 6b), während die dendritischen Zellen aus C57BL/6-Mäuse keine Reaktivität zeigten (Abb. 6a). Bei Analyse der dendritischen Zellen der BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Maus waren 12% der Zellen positiv für hDC-SIGN (Abb. 6c).

**C.1.4. Stimulation mit mannosyliertem Lipoarabinomannan (manLAM)**

In Publikationen anderer Wissenschaftler ist gezeigt, dass manLAM in humanen dendritischen Zellen die LPS-induzierte Freisetzung von IL-12 inhibiert (149). Daher sollte die Funktionalität des humanen DC-SIGN auf murinen dendritischen Zellen überprüft werden. Murine dendritische Zellen aus C57BL/6-, CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- sowie BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen wurden gleichzeitig mit LPS und mannosyliertem Lipoarabinomannan (manLAM) inkubiert und nach 8 h Inkubation die IL-12p40- sowie die TNF- $\alpha$ -Produktion im Zellkulturüberstand bestimmt. Als Kontrollen dienten in Medium kultivierte bzw. nur mit manLAM inkubierte dendritische Zellen (Abb. 7).

Unstimulierte dendritische Zellen und DCs, die mit 50  $\mu$ g/ml manLAM stimuliert wurden, wurden auf die Produktion von IL-12p40 und TNF- $\alpha$  untersucht. Während dendritische Zellen aus allen Mäusen auf die Inkubation mit 50  $\mu$ g/ml manLAM mit kaum einer Produktion von IL-12p40 reagierten, war bei Inkubation mit 1 ng/ml LPS eine deutliche Reaktion bezüglich der Produktion von IL12p40 detektierbar. In den dendritischen Zellen der C57BL/6-Mäuse wurde bei Inkubation mit LPS und steigenden Konzentrationen an manLAM etwa die gleiche Menge an IL-12p40 produziert. Bei Analyse der IL-12p40-Produktion in den dendritischen Zellen der CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse zeigte sich, dass bei gleichzeitiger Inkubation von LPS und manLAM in steigenden Konzentrationen eine signifikante, dosisabhängige Verringerung der Freisetzung von IL-12p40 gegenüber der Inkubation mit LPS allein auftrat. In dendritischen Zellen aus BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen konnte keine signifikante Reduktion der Expression von IL-12p40 bei gleichzeitiger Inkubation mit LPS und manLAM gegenüber der Inkubation mit LPS gezeigt werden. Allerdings war bei diesen Zellen eine Tendenz der verringerten Freisetzung von IL-12p40 bei hoher manLAM-Konzentration erkennbar.



**Abb. 7. Einfluss von manLAM auf die LPS-induzierte IL-12p40- sowie TNF- $\alpha$ -Produktion in murinen dendritischen Zellen.**

Murine dendritische Zellen aus C57BL/6-, CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- und BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- Mäusen wurden mit LPS in einer Konzentration von 1 ng/ml und manLAM in Konzentrationen von 5  $\mu$ g/ml und 50  $\mu$ g/ml inkubiert. Als Kontrollen dienten unstimulierte Zellen, LPS-Kulturen ohne Zusatz der Zellwandstrukturen sowie manLAM ohne LPS. Nach 8 h wurden die Überstände gewonnen und die Zytokine mittels ELISA analysiert. Die Stimulation erfolgte in Triplikaten. Es ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten gezeigt. (Student's-t-Test: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; n.s., nicht signifikant).

Eine parallele Untersuchung der Ausschüttung von TNF- $\alpha$  ergab in allen drei Mausstämmen bei gleichzeitiger Inkubation mit 5  $\mu$ g/ml manLAM und 1 ng/ml LPS keine signifikante Reduktion. Allerdings war bei Inkubation mit 50  $\mu$ g/ml ManLAM und 1 ng/ml LPS gleichzeitig eine signifikante Reduktion der Freisetzung von TNF- $\alpha$ , unabhängig von der Anwesenheit von hDC-SIGN, detektierbar.

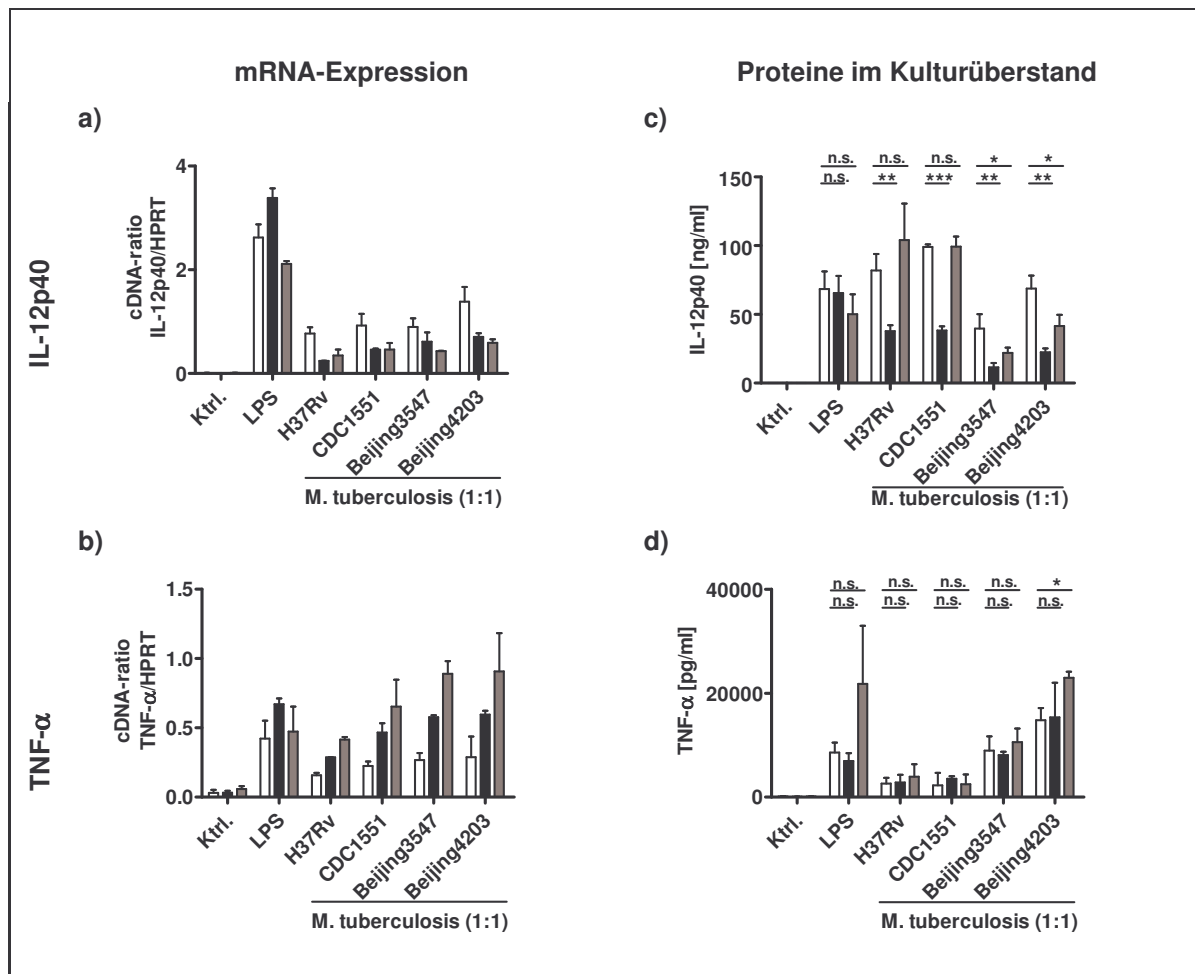


**C.1.5. Stimulation mit *M. tuberculosis***

Murine dendritische Zellen aus C57BL/6-, CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- sowie BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen wurden mit LPS und verschiedenen *M. tuberculosis*-Stämmen (H37Rv, CDC1551, Beijing3547 und Beijing4203) stimuliert.

Zur Analyse der mRNA-Expression wurden die Zellen nach 4 h Inkubation lysiert, die mRNA gewonnen und nach reverser Transkription mittels quantitativer PCR am LightCycler analysiert. Für die Darstellung der Zytokinproduktion wurden nach 24 h die Kulturüberstände gewonnen und mittels ELISA analysiert.

Eine Analyse der IL-12p40-mRNA-Expression zeigte eine deutliche Reaktion dendritischer Zellen der C57BL/6-Mäuse auf die Inkubation mit LPS und die *M. tuberculosis*-Stämme nach 4 h. Die Expression der IL-12p40-mRNA nach Stimulation mit LPS war in den dendritischen Zellen der CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse vergleichbar mit der mRNA-Expression der dendritischen Zellen der C57BL/6-Mäuse. Allerdings zeigten die Zellen dieser Mäuse eine um 30-60% reduzierte IL-12p40-mRNA-Expression nach Stimulation mit allen vier *M. tuberculosis*-Stämmen (Abb. 8c). Die dendritischen Zellen der BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse zeigten die gleiche Reaktion auf die Stimulation mit *M. tuberculosis* wie die Zellen der CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse.



**Abb. 8. Expression von IL-12p40 und TNF- $\alpha$  in murinen dendritischen Zellen nach Inkubation mit Mykobakterien.**

Murine dendritische Zellen aus C57BL/6- (weiße Balken), CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (schwarze Balken) und BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (graue Balken) Mäusen wurden mit unterschiedlichen Stämmen von *M. tuberculosis* stimuliert. Als Kontrollen dienten unstimulierte und mit LPS stimulierte Zellen. Nach 24 h wurden für den Zytokin-ELISA die Überstände gewonnen und IL-12p40 sowie TNF- $\alpha$  analysiert (**a-b**). Für die Analyse der IL-12p40- und TNF- $\alpha$ -mRNA wurden nach 4 h die Zellen lysiert, in einer quantitativen PCR am LightCycler analysiert und auf HPRT-Expression normalisiert (**c-d**). Die Inkubation für die Analyse erfolgte in Duplikaten, für den ELISA in Triplikaten. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Es ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. (Student's-t-Test: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; n.s.=nicht signifikant)

Der nach 24 h gemessene IL-12p40-Gehalt im Zellkulturüberstand dendritischer Zellen der C57BL/6-Mäuse wies nach Simulation mit LPS als Kontrolle und *M. tuberculosis* bei allen vier *M. tuberculosis*-Stämmen eine deutliche Produktion von IL-12p40 auf. Allerdings induzierten die beiden Beijing-Stämme keine so hohe

Produktion von IL-12p40 wie H37Rv und CDC1551. Bei Untersuchung der Freisetzung von IL-12p40 in dendritischen Zellen aus CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen konnte auch hier eine deutliche Produktion dieses Zytokins bei Stimulation mit LPS festgestellt werden. Allerdings ließ sich in diesen Zellen nach Stimulation mit *M. tuberculosis* eine um ca. 50% reduzierte Ausschüttung von IL-12p40 detektieren. Die dendritischen Zellen der BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse wiesen nach 24stündiger Inkubation mit LPS ebenso wie die dendritischen Zellen der C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse eine deutliche Produktion von IL-12p40 auf. Es konnte jedoch in den dendritischen Zellen dieser Mäuse nach Stimulation mit den *M. tuberculosis*-Stämmen H37Rv und CDC1551 keine signifikante Verringerung der Ausschüttung von IL-12p40 nachgewiesen werden. Allerdings zeigte die Stimulation mit den Beijing-Stämmen durchaus eine um ca. 40% verringerte Freisetzung von IL-12p40 (Abb. 8a).

Wurden die *M. tuberculosis*-Stämme nach 24stündiger Inkubation in ihrer Auswirkung auf die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  dendritischer Zellen der C57BL/6-Mäuse miteinander verglichen, zeigte sich, dass H37Rv und CDC1551 wesentlich weniger TNF- $\alpha$  induzieren, als die beiden Beijing-Stämme. Eine Untersuchung dendritischer Zellen aus beiden transgenen Mausstämmen zeigte eine ähnliche Reaktion auf *M. tuberculosis* ohne signifikante Unterschiede zu der Reaktion dendritischer Zellen der C57BL/6-Mäuse (Abb. 8b). Die erhöhte TNF- $\alpha$ -Produktion nach Stimulation dendritischer Zellen mit den Beijing-Stämmen konnte jedoch nicht in der Expression der TNF- $\alpha$ -mRNA nachgewiesen werden. Auffällig ist jedoch, dass die dendritischen Zellen beider transgener Mausstämmen eine erhöhte Expression der TNF- $\alpha$ -mRNA gegenüber den dendritischen Zellen der C57BL/6-Mäuse aufwiesen, obwohl die Expression der TNF- $\alpha$ -mRNA nach Stimulation mit LPS bei allen drei Mausstämmen gleich ausfiel (Abb. 8d).

### **Ergebnisse C.1.**

In murinen dendritischen Zellen aus hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen konnte im Gegensatz zu dendritischen Zellen aus C57BL/6-Mäusen eine LPS-induzierte IL-12p40-Antwort durch gleichzeitige Zugabe von manLAM dosisabhängig reduziert werden.

Mit verschiedenen Stämmen von *M. tuberculosis* ließ sich die Ausschüttung von IL-12p40, nicht aber TNF- $\alpha$  in dendritischen Zellen aus hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen im Gegensatz zu C57BL/6-Mäusen auf Proteinebene signifikant vermindern.

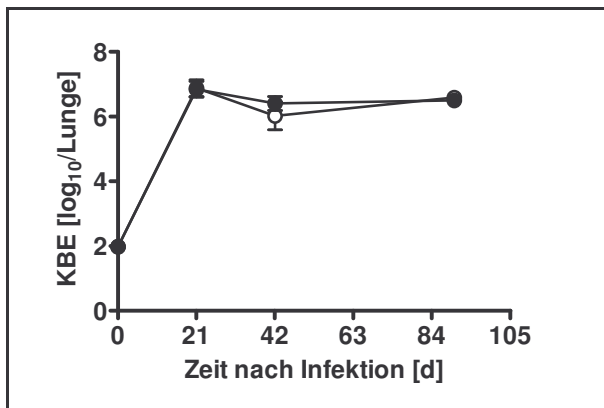
## **C.2. Die Rolle von hDC-SIGN *in vivo* bei Infektion mit *M. tuberculosis***

### **C.2.1. Infektion mit 100 KBE *M. tuberculosis* H37Rv**

Über die Bedeutung von DC-SIGN in mykobakteriellen Infektionen unter *in vivo*-Bedingungen ist bislang nichts bekannt. Um die Rolle von DC-SIGN für die Immunantwort während einer Infektion mit *M. tuberculosis* modellhaft zu untersuchen, wurden C57BL/6- und hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse mit *M. tuberculosis* H37Rv infiziert und der Infektionsverlauf detailliert charakterisiert.

#### **C.2.1.1. Keimzahlentwicklung**

C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* (Stamm H37Rv) über den Aerosolweg infiziert. Einen Tag nach Versuchsbeginn wurde die tatsächliche Infektionsdosis in den Lungen von Kontrolltieren ermittelt. Anschließend wurde im Verlauf der Infektion an den Tagen 21, 42 und 90 die Keimzahlentwicklung in der Lunge infizierter Mäuse analysiert.



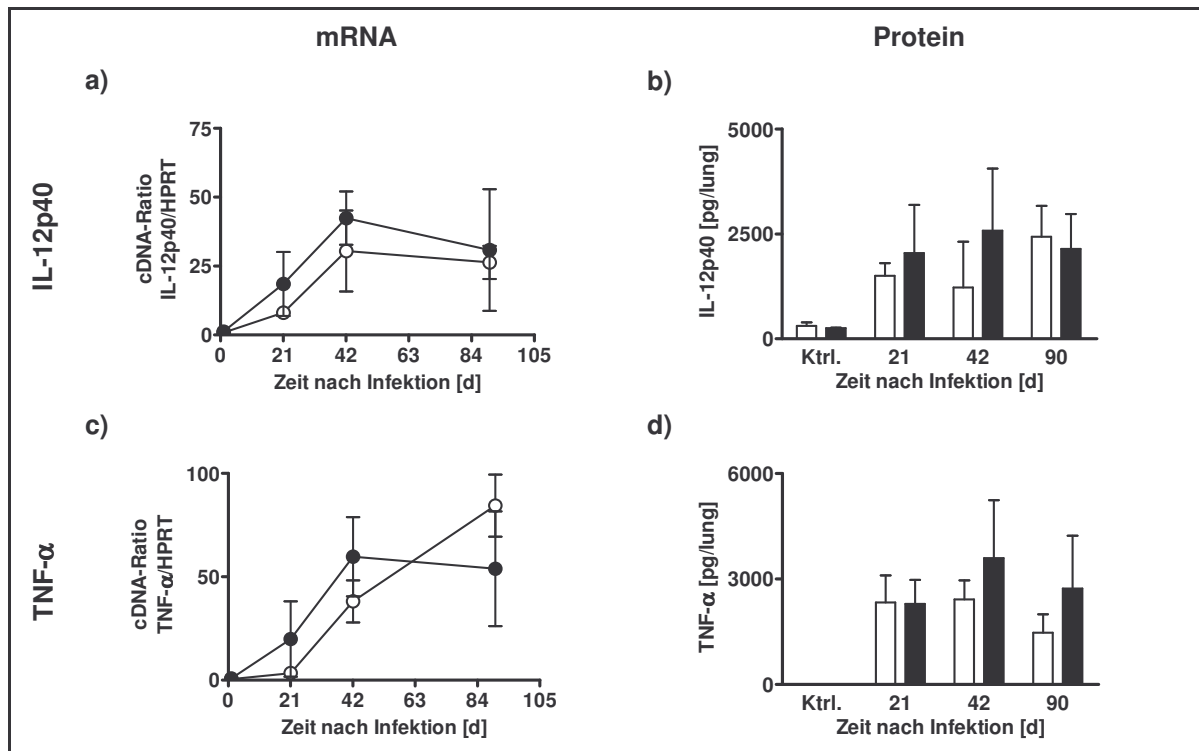
**Abb. 9. Keimlast von *M. tuberculosis* infizierten C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen.**

C57BL/6-Wildtyp- (weiße Kreise) und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (schwarze Kreise) Mäuse wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. Zu den dargestellten Infektionszeitpunkten wurde die Anzahl der KBE bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von je 5 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt aus einem durchgeführten Experiment. (Student's-t-Test: nicht signifikant)

In den ersten drei Wochen nach Infektionsbeginn erfolgte ein deutliches Wachstum von *M. tuberculosis* in den Lungen beider untersuchter Mausstämme (Abb. 9). Die am Tag 21 erreichte Keimlast von  $10^7$  KBE/Lunge verblieb über den gesamten Versuchsverlauf (Tage 42 und 90) auf gleichbleibend hohem Niveau. Unterschiede zwischen C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen im Hinblick auf die Keimzahlentwicklung wurden nicht beobachtet. Zum Zeitpunkt dieser Analysen standen BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse nicht zur Verfügung.

### C.2.1.2. Zytokinexpression

Um eine Aussage über die Aktivierung des Immunsystems im Verlauf der Infektion mit *M. tuberculosis* H37Rv treffen zu können, wurden die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-12p40 und TNF- $\alpha$  in den Lungen der infizierten C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse analysiert.



**Abb. 10. Produktion von IL-12p40 und TNF- $\alpha$  in C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen nach Infektion mit *M. tuberculosis*.**

C57BL/6- (weiße Symbole, Balken) und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (schwarze Symbole, Balken) Mäuse wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* H37Rv via Aerosol infiziert. Die mRNA-Expression von IL-12p40 (a) und TNF- $\alpha$  (c) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten in der Lunge mittels quantitativer PCR am LightCycler, auf die Expression von HPRT normalisiert, analysiert. Gleichzeitig wurde der Gehalt an IL-12p40 (b) sowie TNF- $\alpha$  (d) im Lungenhomogenat mittels ELISA ermittelt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Mäusen pro Gruppe aus einem durchgeführten Experiment. Eine statistische Auswertung der Daten ergab keine vom Mausstamm abhängigen signifikanten Unterschiede. (Student's-t-Test: nicht signifikant)

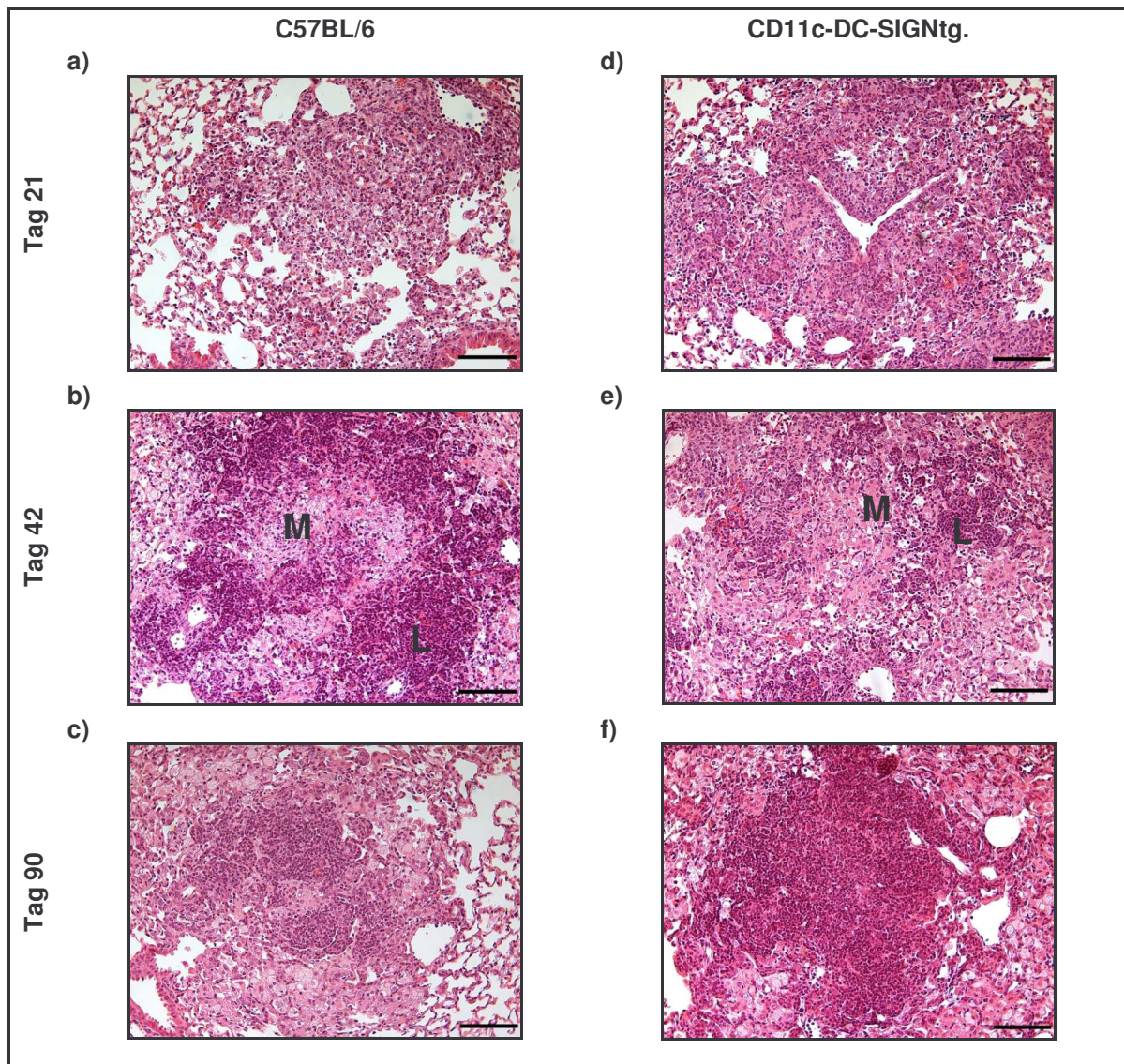
Die mRNA-Expression von IL-12p40 stieg bis Tag 42 an und verblieb bis Tag 90 auf einem gleich hohen Niveau (Abb. 10a). Auch auf Proteinebene im Lungenhomogenat zeigte sich der gleiche Verlauf der IL-12p40-Expression mit einem Anstieg bis Tag 42 und Halten dieses Levels bis Tag 90 (Abb. 10b).

Die mit Hilfe quantitativer PCR am LightCycler ermittelte Expression von TNF- $\alpha$ -mRNA in den C57BL/6-Mäusen stieg während des Verlaufs der Infektion an. In der CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Maus zeigte sich in etwa der gleiche Verlauf des Anstieges ohne signifikanten Unterschied (Abb. 10c). Eine Analyse der Produktion von TNF- $\alpha$  in den Lungen infizierter Mäuse zeigte einen Anstieg bis Tag 42, der bis

Tag 90 auf einem Plateau gehalten wurde (Abb. 10d). Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mausstypen ermittelt werden.

### **C.2.1.3. Granulomentwicklung**

Inwieweit ein möglicher Unterschied in Bezug auf die Granulomentwicklung in den Lungen infizierter C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen nach Infektion mit *M. tuberculosis* besteht, wurde mit Hilfe einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung in formalin-fixierten Paraffinschnitten mikroskopisch untersucht. Bereits drei Wochen nach Infektion der Tiere zeigten sich in den Lungen der C57BL/6-Mäuse erste mononukleäre Infiltrationen (Abb. 11a und d). Weitere 21 Tage später (Tag 42) lagen Granulome sowohl in den Lungen von C57BL/6- als auch in den Lungen von hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen vor (Abb. 11b und e). An Tag 90 nach Infektion war der weitgehende Teil des Alveolarraumes beider Mausstämme mit epitheloidzelligen Makrophagen gefüllt (Abb. 11c). Die Lungen der hDC-SIGN-transgenen Mäuse zeigten keinen Unterschied in der Infiltration von Monozyten und Lymphozyten an Tag 90 im Vergleich mit den C57BL/6-Mäusen.



**Abb. 11. Histologische Untersuchungen zur Granulomentwicklung in Lungen aus *M. tuberculosis*-infizierten C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen.**

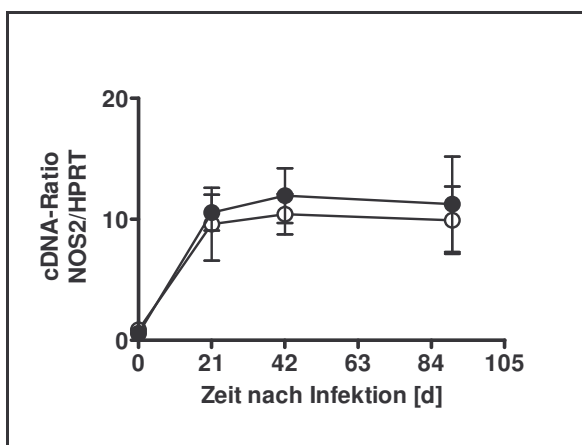
C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. Zur lichtmikroskopischen Analyse von histologischen Veränderungen wurden 2 µm dünne Paraffinschnitte von Formalin-fixierten Lungengewebe zu den angegebenen Infektionszeitpunkten von C57BL/6- (**a-c**) und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (**d-f**) Mäusen angefertigt und mit Hilfe von Hämatoxylin & Eosin gefärbt. Balken = 100 µm

L = Lymphozyteninfiltration; M = Makrophageninfiltration



#### C.2.1.4. Makrophagenaktivierung

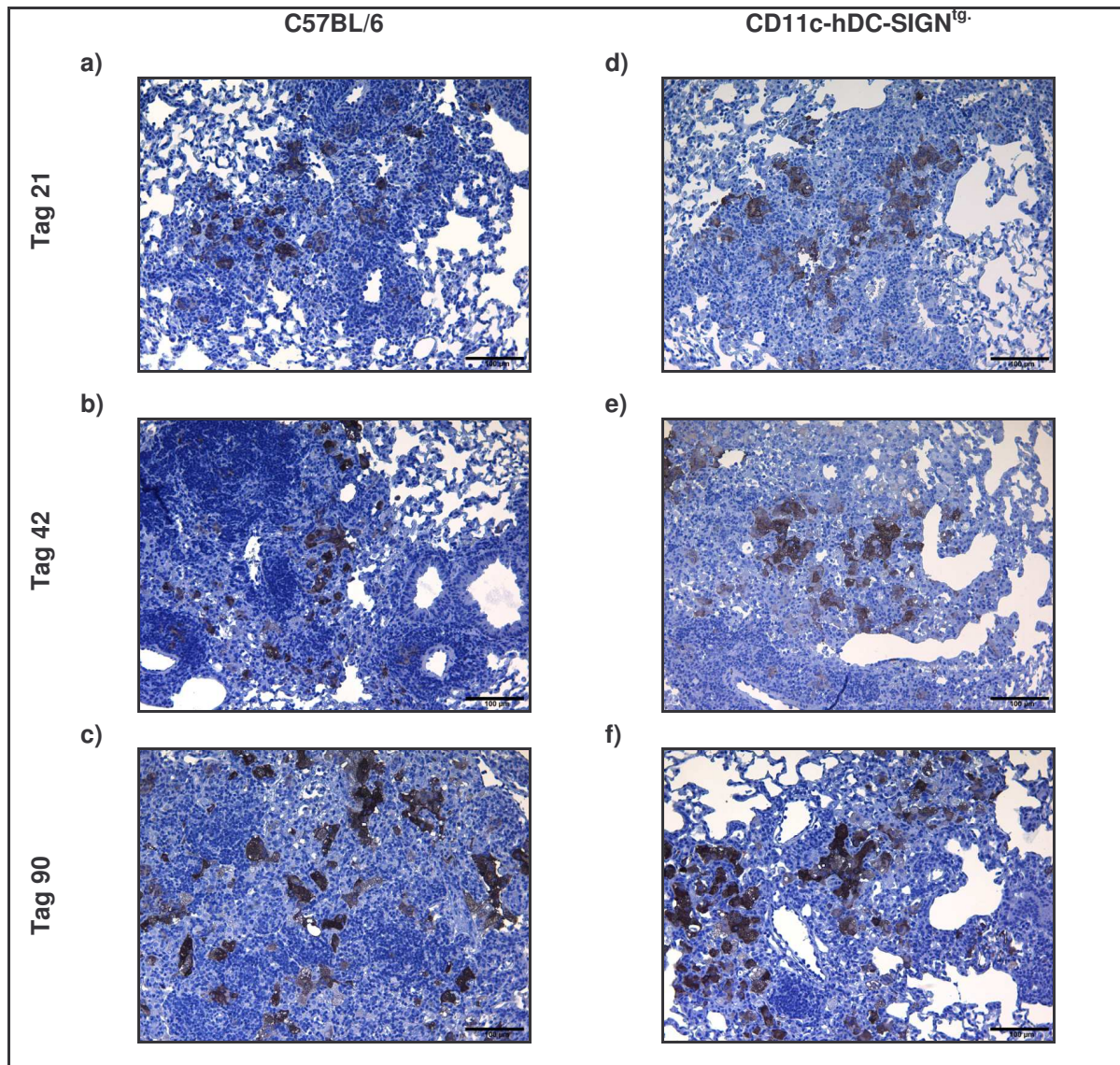
Makrophagen sind nach Aktivierung durch IFN- $\gamma$  in der Lage, unter anderem mit Hilfe der durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS2) freigesetzten reaktiven Stickstoffintermediate Mykobakterien abzutöten. Um eine Aussage über die Makrophagenaktivierung in CD11c-DC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen treffen zu können, wurde die Expression von NOS2 in den Lungen mittels quantitativer PCR und immunhistochemischer Färbungen analysiert.



**Abb. 12. Expression von NOS2 in C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen nach einer Infektion mit *M. tuberculosis*.**

C57BL/6- (weiße Kreise) und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (schwarze Kreise) Mäuse wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* H37Rv via Aerosol infiziert. Die Expression von NOS2 wurde zu verschiedenen Zeitpunkten in der Lunge mittels quantitativer PCR am LightCycler, auf die Expression von HPRT normalisiert, analysiert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Mäusen pro Gruppe aus einem durchgeführten Experiment. (Student's-t-Test: nicht signifikant)

Die quantitative Analyse von NOS2 in den Lungen infizierter C57BL/6-Wildtyp-Mäuse zeigte im Verlauf der Infektion mit *M. tuberculosis* einen deutlichen Anstieg der mRNA-Expression von NOS2 auf ein Plateau ab Tag 42. Die CD11c-h-DC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse zeigten zu allen Infektionszeitpunkten eine vergleichbare NOS2-mRNA-Expression (Abb. 12).

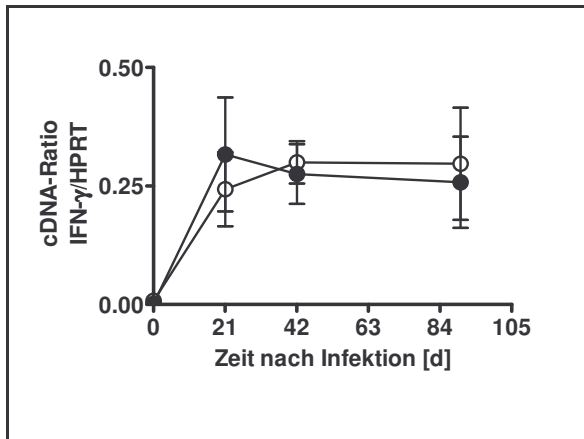


**Abb. 13. Immunhistologische Analyse der NOS2-Expression im Lungengewebe von *M. tuberculosis*-infizierten C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen.**

C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. Zur lichtmikroskopischen Analyse von aktivierten Makrophagen wurden 2 µm dünne Paraffinschnitte von Formalin-fixierten Lungengewebe zu den angegebenen Infektionszeitpunkten von C57BL/6- (a-c) und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (d-f) Mäusen angefertigt und die NOS2-Expression immunhistochemisch mittels einer Peroxidase-Reaktion nachgewiesen. Balken = 100µm

Der immunhistochemische Nachweis von NOS2 in formalin-fixierten Paraffinschnitten von Lungen aus C57BL/6-Mäusen mit Hilfe einer Peroxidase-vermittelten Anfärbung der NOS2-Moleküle, lässt einen zeitlichen Verlauf der NOS2-positiven Zellen erkennen: In den Paraffinschnitten lässt sich eine Zunahme

der NOS2-exprimierenden Zellen bis Tag 90 zeigen (Abb. 13a-c). Unterschiede in der Expression von NOS2 in CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen konnten zu keinem Zeitpunkt der Analyse dargestellt werden (Abb. 13d-f).



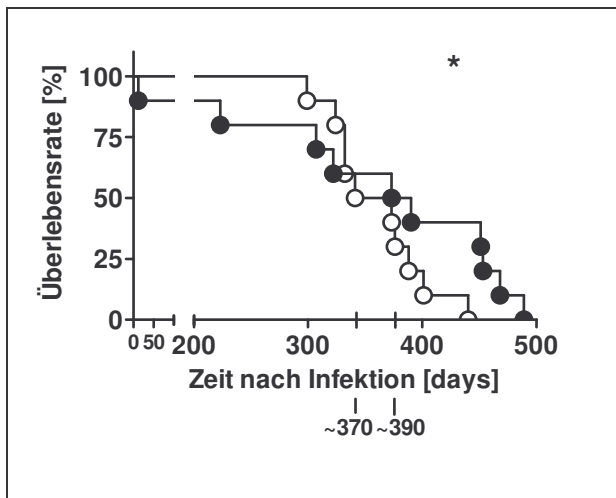
**Abb. 14. Expression von IFN- $\gamma$  in C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen nach einer Infektion mit *M. tuberculosis*.**

C57BL/6- (weiße Kreise) und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (schwarze Kreise) Mäuse wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Expression von IFN- $\gamma$  in der Lunge mittels quantitativer LightCycler-PCR relativ zur Expression von HPRT analysiert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Mäusen aus einem durchgeführten Experiment. (Student's-t-Test: nicht signifikant)

Die mittels quantitativer PCR ermittelte IFN- $\gamma$ -Expression in den Lungen infizierter C57BL/6-Mäuse zeigte einen Anstieg bis auf ein Plateau ab Tag 42 im Verlaufe der Infektion mit *M. tuberculosis*. Im Vergleich zu den CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen konnte kein Unterschied in der Expression von IFN- $\gamma$  detektiert werden (Abb. 14).

#### C.2.1.5. Langzeit-Überleben

Für die Darstellung der Überlebensrate wurden jeweils 10 C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse mit 100 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. Die Rate an überlebenden Tieren wurde täglich dokumentiert und die Mäuse, sobald sie gegenüber Kontrollmäusen 25% des Gewichtes verloren hatten, euthanasiert (Abb. 15).



**Abb. 15. Überlebensrate von C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- Mäusen nach einer Infektion mit 100 KBE *M. tuberculosis*.**

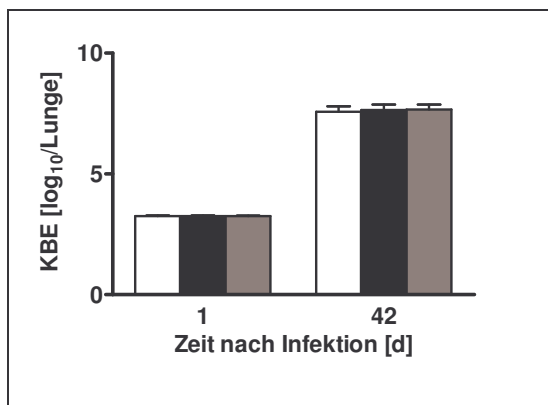
C57BL/6-(weiße Kreise) und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-(schwarze Kreise) Mäuse wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. Jede Gruppe bestand aus 10 Tieren, die täglich beobachtet wurden. (Log Rank-Test; \*,  $p < 0,05$ )

Bis ungefähr bis Tag 300 überlebten alle Tiere. Bis Tag 370 nach Infektion waren 50% aller C57BL/6-Mäuse verstorben. Im Gegensatz lag die mittlere Sterberate der CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse an Tag 390 nach Infektion. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse hinsichtlich des Langzeit-Überlebens beobachtet werden.

### C.2.2. Infektion mit 2000 KBE *M. tuberculosis* H37Rv

Um die Funktionen insbesondere des angeborenen Immunsystems maximal zu stimulieren, wurden C57BL/6-, CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- und die inzwischen zur Verfügung stehenden BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse mit 2000 KBE *M. tuberculosis* H37Rv über den Aerosolweg infiziert. In diesem Experiment wurde aufgrund der begrenzten Anzahl an Mäusen nur an einem Zeitpunkt (Tag 42) der Einfluss auf den Infektionsverlauf untersucht.

### C.2.2.1. Keimzahlentwicklung



**Abb. 16. Keimlast von C57BL/6- und hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen nach Infektion mit 2000 KBE *M. tuberculosis*.**

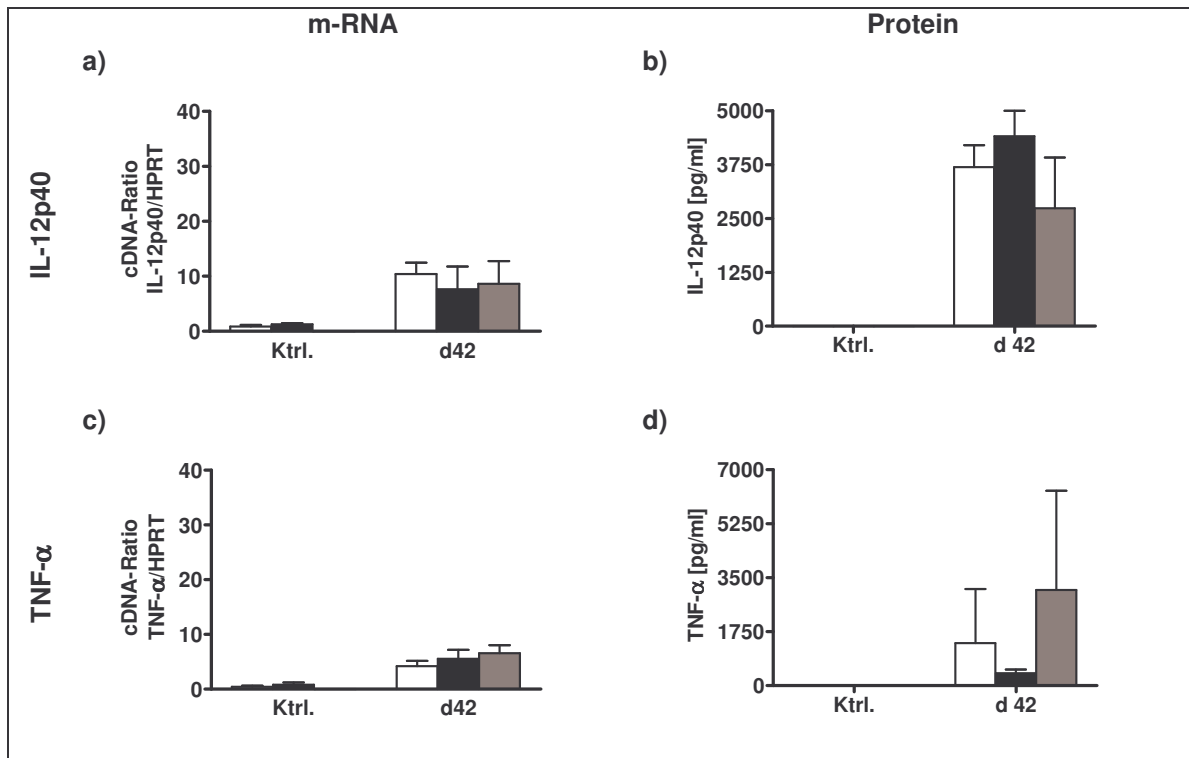
C57BL/6- (weiße Balken), CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (schwarze Balken) und BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (graue Balken) Mäuse wurden mit 2000 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. Dargestellt ist die Keimlast in den Lungen von C57BL/6- und hDC-SIGN-transgenen Mäusen an Tag 42 nach Infektion. Die Daten entsprechen dem Mittelwert der Keimzahlen mit Standardabweichung von jeweils fünf Mäusen. (Student's-t-Test: nicht signifikant)

An Tag 42 war in den C57BL/6-Mäusen die Keimlast von 2000 Keimen pro Lunge auf ca.  $10^8$  gestiegen. Die gleiche Keimzahlerhöhung ließ sich sowohl in den CD11c-, als auch in den unabhängig generierten BAC-hDC-SIGN-transgenen Mäusen zeigen (Abb. 16).

### C.2.2.2. Zytokinexpression

Eine Analyse des proinflammatorischen Zytokins IL-12p40 in den Lungen *M. tuberculosis* infizierter Mäuse zeigte in der IL-12p40-mRNA-Expression in CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- oder in BAC-hDCSIGN<sup>tg</sup>-Mäusen im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen keine Unterschiede (Abb. 17a). Im Hinblick auf die Ausschüttung des Zytokins IL-12p40 im Lungenhomogenat konnte zwar eine deutliche Produktion in allen drei Mausstämmen dokumentiert werden, allerdings zeigten sich keine Unterschiede zwischen den transgenen Mausstämmen und den C57BL/6-Mäusen (Abb. 17b).

Eine Untersuchung auf die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression sowie die Präsenz im Lungenhomogenat zeigte ebenso keine Unterschiede zwischen den transgenen Mausstämmen im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen (Abb. 17c-d).

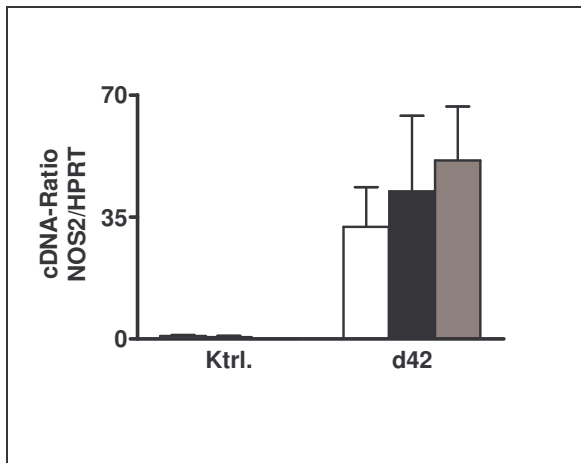


**Abb. 17. Expression von IL-12p40 und TNF- $\alpha$  in Lungenhomogenaten aus C57BL/6- und hDC-SIGN<sup>tg</sup>- Mäusen nach Infektion mit 2000 KBE *M. tuberculosis*.**

C57BL/6- (weiße Balken), CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (schwarze Balken) und BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- Mäuse (graue Balken) wurden mit 2000 KBE *M. tuberculosis* H37Rv via Aerosol infiziert. Die Expression von IL-12p40- (a) und TNF- $\alpha$ - (c) mRNA wurde an Tag 42 in der Lunge mittels quantitativer PCR am LightCycler, auf die HPRT-Expression normalisiert, analysiert. Gleichzeitig wurde die IL-12p40- (b) und die TNF- $\alpha$ - (d) Produktion im Lungenhomogenat mittels ELISA ermittelt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Mäusen pro Gruppe aus einem durchgeführten Experiment. (Student's-t-Test: nicht signifikant)

### C.2.2.3. Makrophagenaktivierung

Nach einer Infektion mit 2000 KBE *M. tuberculosis* wurden C57BL/6-, CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- und BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- Mäuse an Tag 42 auf die Expression von NOS2 untersucht.

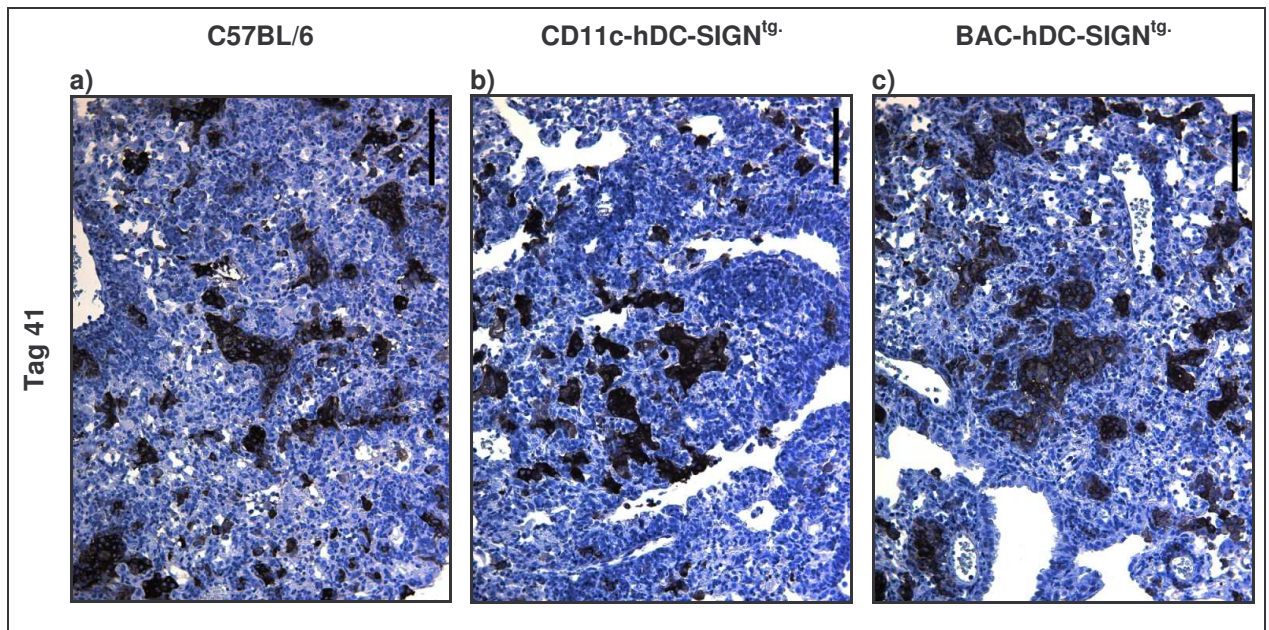


**Abb. 18. Expression von NOS2-mRNA in C57BL/6- und hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen nach Infektion mit 2000 KBE *M. tuberculosis*.**

C57BL/6- (weiße Balken), CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (schwarze Balken) und BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse (graue Balken) wurden mit 2000 KBE *M. tuberculosis* H37Rv via Aerosol infiziert. Die Expression von NOS2-mRNA wurde an Tag 42 in der Lunge mittels quantitativer LightCycler PCR, auf die HPRT-Expression normalisiert, analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Mäusen pro Gruppe aus einem durchgeführten Experiment. (Student's-t-Test: nicht signifikant)

An Tag 42 nach Infektion ließ sich im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollmäusen eine deutliche Expression von NOS2-mRNA aus Lungen infizierter C57BL/6-Mäuse nachweisen. In den Lungen infizierter CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse konnte kein Unterschied im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen in der Expression von NOS2-mRNA gezeigt werden (Abb. 18). Auch in den Lungen BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse konnten keine Unterschiede in der Expression von NOS2-mRNA im Vergleich zu den Lungen der C57BL/6-Mäuse gezeigt werden.

Die Peroxidase-vermittelte immunhistochemische Färbung von NOS2 zeigte in formalin-fixierten Paraffinschnitten von Lungen infizierter C57BL/6-Mäuse eine deutliche Expression in myeloiden Zellen. Jedoch konnten auch bei diesem Nachweis keine Unterschiede zwischen C57BL/6- und hDC-SIGN-transgenen Mäusen detektiert werden (Abb. 19).



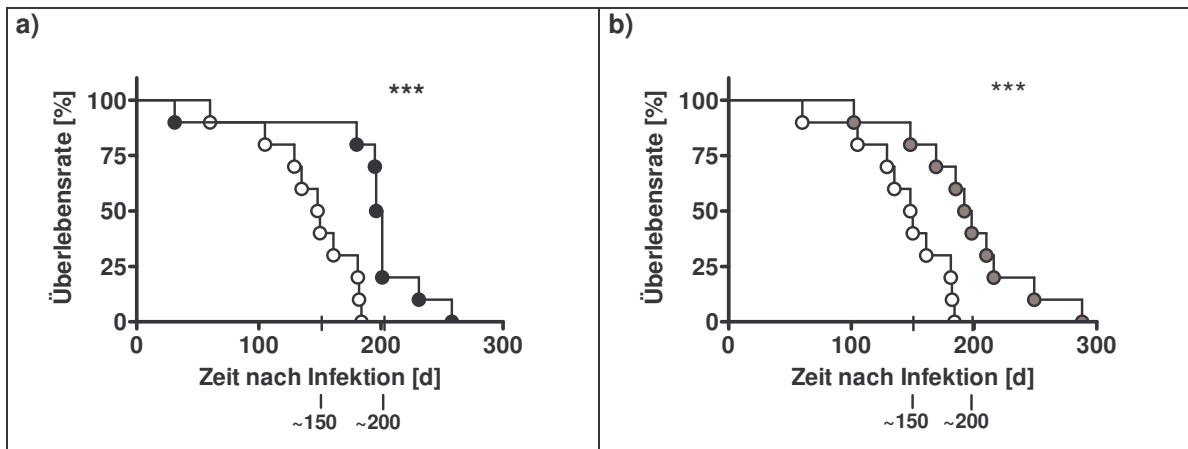
**Abb. 19. Immunhistologische Analyse von NOS2 im Lungengewebe von *M. tuberculosis*-infizierten C57BL/6- und hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen.**

C57BL/6- und CD11c-hDCSIGN<sup>tg</sup>- und BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse wurden mit 2000 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. Zur lichtmikroskopischen Betrachtung von aktivierten myeloiden Zellen wurden 2 µm dünne Paraffinschnitte von Formalin-fixierten Lungengeweben an Tag 42 von C57BL/6- (a), CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (b) und BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (c) Mäusen angefertigt und die NOS2-Expression immunhistochemisch nachgewiesen (Braunfärbung). Balken = 100µm

#### C.2.2.4. Langzeit-Überleben

Pro Mausstamm wurden 10 Mäuse mit 2000 KBE *M. tuberculosis* infiziert. Bis Tag 100 überleben alle infizierten Mäuse. Die mittlere Überlebensrate der C57BL/6-Mäuse lag ungefähr bei Tag 150 nach Infektion. Betrachtet man die mittlere Überlebensrate der CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse, so zeigte sich, dass diese Mäuse nach einer Infektion mit 2000 KBE *M. tuberculosis* mit ca. 200 Tagen nach Infektion um 50 Tage länger überlebten. Dieser Effekt konnte so auch mit den BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen gezeigt werden (Abb. 20).





**Abb. 20. Überlebensrate von hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen nach Infektion mit 2000 KBE *M. tuberculosis*.**

C57BL/6- (weiße Kreise), CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (schwarze Kreise) und BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (graue Kreise) Mäuse wurden mit 2000 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. Jede Gruppe bestand aus 10 Tieren, die täglich beobachtet wurden. (Log-Rank-Test: \*\*\*,  $p < 0,001$ )

### Ergebnisse C.2.

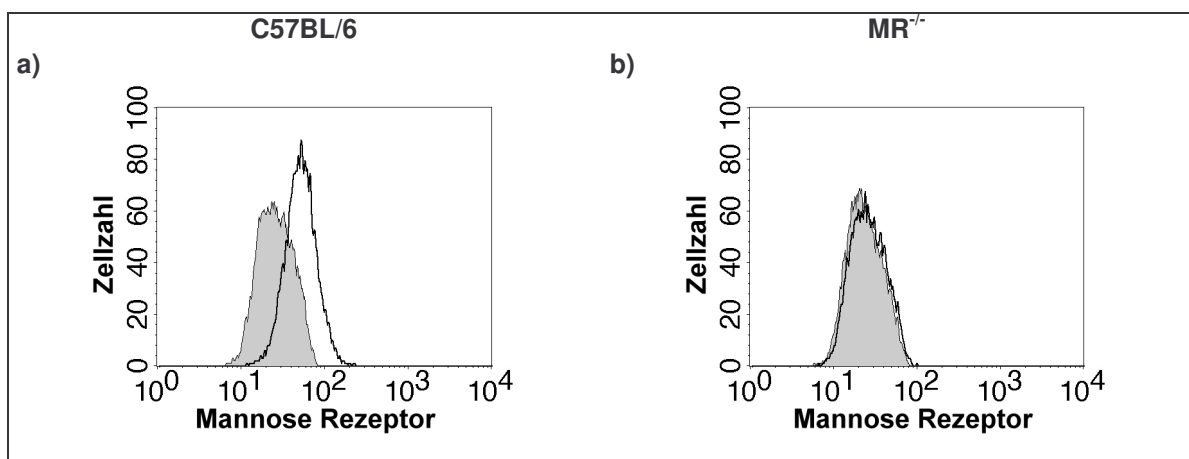
Unter *in vivo*-Bedingungen zeigten sich sowohl bei einer Infektionsdosis von 100 Mykobakterien je Maus als auch bei 2000 Mykobakterien pro Maus sowohl bei C57BL/6 als auch bei human DC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen keine Unterschiede in der Keimzahl- und der Granulomentwicklung, der myeloiden Zellaktivierung und der Produktion von Zytokinen (IL-12p40, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ). Überraschenderweise zeigten jedoch Analysen der Überlebensrate in beiden Infektionsansätzen, dass die h-DC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse nach einer Infektion mit *M. tuberculosis* signifikant später verstarben als die C57BL/6-Mäuse.

### C.3. Die Rolle des MR *in vitro* bei Infektion mit *M. tuberculosis*

Der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MR) gehört ebenso wie DC-SIGN zur Gruppe der C-Typ-Lektine. Er wird als ein wichtiges Molekül in der Aufnahme von Pathogenen und der Hemmung der zellulären Immunantwort diskutiert.

#### C.3.1. Expression des MR auf murinen Makropagen

Murine Makrophagen wurden mit Antikörpern gegen Mac3 und MR inkubiert und mit PI gegengefärbt. Als Kontrolle wurden Makrophagen beider Mausstämme mit Antikörpern gegen Mac3 und Ratte-IgG<sub>2a</sub> (Isotypkontrolle) gefärbt. Es erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der PI-negativen, Mac3-positiven Zellen auf die Expression der MR.



**Abb. 21. Expression des Mannose-Rezeptors auf murinen Makrophagen.**

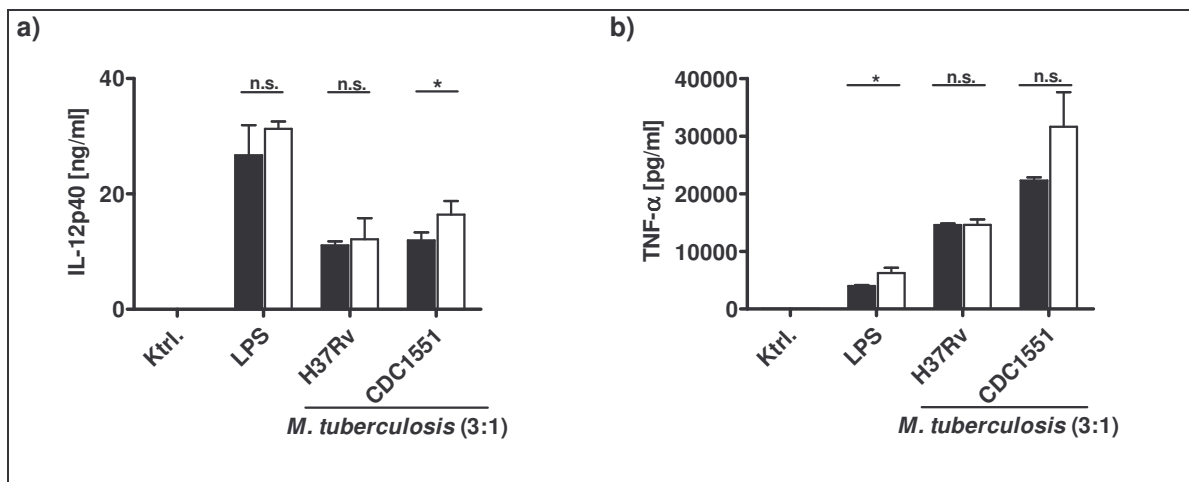
Murine Makrophagen wurden mit einem Antikörpergemisch aus  $\alpha$ -Mac3 und  $\alpha$ -MR für 15 min inkubiert. Dargestellt sind Histogramme der Färbung Isotyp (graue Fläche) gegen Mannose Rezeptor (schwarze Linie) auf Mac3-positiven, PI-negativen Makrophagen der C57BL/6-Mäuse (a) und MR<sup>-/-</sup>-Mäuse (b). Es ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Die Mac3-positiven Makrophagen der C57BL/6-Mäuse zeigten keine Reaktion mit der Isotypkontrolle. Allerdings konnte eine Expression des MR auf diesen Zellen nachgewiesen werden. So zeigt die Expressionskurve des MR im Histogramm eine Verschiebung der Population nach rechts (Abb. 21a).

In den zu Kontrollzwecken eingesetzten Makrophagen der MR<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte im Vergleich zur Isotypkontrolle keine Reaktivität mit dem Antikörper gegen den MR gezeigt werden (Abb. 21b).

### C.3.2. Stimulation von Makrophagen mit *M. tuberculosis*

Murine Makrophagen aus C57BL/6-Wildtyp- und MR-defizienten (MR<sup>-/-</sup>)- Mäusen wurden mit *M. tuberculosis* (H37Rv und CDC1551) mit einer Infektionsrate von drei Keimen pro Zelle stimuliert. Nach acht Stunden wurden die Überstände der Zellkulturen abgenommen und auf IL-12p40 und TNF- $\alpha$  untersucht.



**Abb. 22. Zytokinproduktion in Makrophagen aus C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

Murine Makrophagen aus C57BL/6- (schwarze Balken) und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen (weiße Balken) wurden mit verschiedenen *M. tuberculosis*-Stämmen in einer Dosis von 3 Keimen pro Zelle stimuliert. Als Kontrollen dienten unstimulierte Zellen sowie mit 10 ng/ml LPS stimulierte Zellen. Analysiert wurden die Zytokine TNF- $\alpha$  (a) und IL-12p40 (b). Es wurde in Triplikaten stimuliert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von einem repräsentativen Experiment von drei durchgeführten Experimenten. (Student's-t-Test: \*, p<0,01; \*\*, p<0,01; n.s., nicht signifikant).

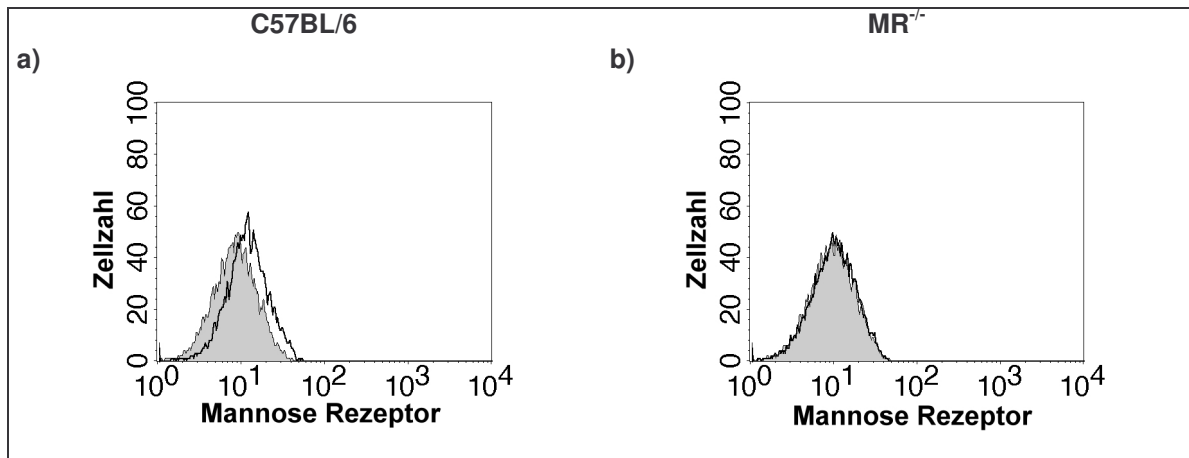
Die Makrophagen reagierten nach acht Stunden auf die Inkubation mit LPS und *M. tuberculosis* (H37Rv und CDC1551) mit einer Freisetzung von IL-12p40. Eine Analyse der Produktion von IL-12p40 der Makrophagen aus MR-defizienten Mäusen zeigte verglichen mit den Makrophagen der C57BL/6-Mäuse keine deutlichen Unterschiede nach Inkubation mit den Mykobakterienstämmen (Abb. 22a).

Die Untersuchung der Kulturüberstände auf TNF- $\alpha$  nach Inkubation mit LPS bzw. beiden *M. tuberculosis*-Stämmen zeigte eine vermehrte Ausschüttung von TNF- $\alpha$ . Allerdings wurden auch in der Analyse der Freisetzung von TNF- $\alpha$  in Makrophagen aus MR-defizienten Mäusen keine Unterschiede in der Produktion von TNF- $\alpha$  festgestellt (Abb. 22b).

### **C.3.3. Expression des MR auf dendritischen Zellen**

Dendritische Zellen aus C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden mit einem Antikörpern gegen CD11c und MR bzw. Ratte-IgG<sub>2a</sub> (Isotypkontrolle) inkubiert und mit PI gegengefärbt. Es erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der PI-negativen, CD11c-positiven Zellen auf die Expression des MR.

Die dendritischen Zellen der C57BL/6-Mäuse exprimierten im Vergleich zur Isotypkontrolle den MR in geringem Ausmaß. So war in den Zellen der C57BL/6-Mäuse nur eine geringe Verschiebung der Population im Histogramm zu beobachten (Abb. 23a). Auf den zu Kontrollzwecken eingesetzten dendritischen Zellen der MR<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte dagegen keine Reaktion mit dem Antikörper gegen den Mannose-Rezeptor gezeigt werden (Abb. 23b).



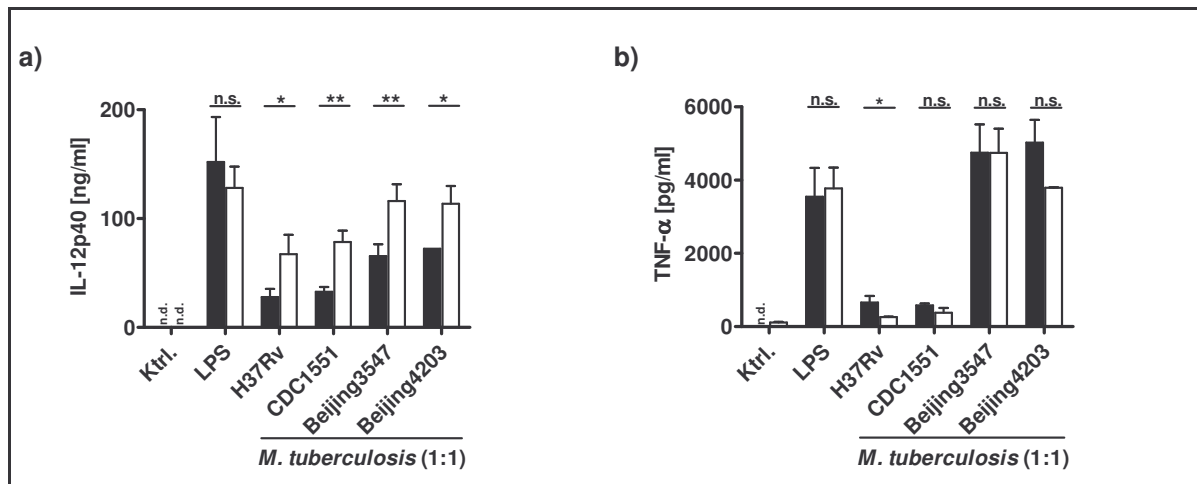
**Abb. 23. Expression des Mannose-Rezeptors auf dendritischen Zellen.**

Murine dendritische Zellen wurden mit einem Antikörpergemisch aus  $\alpha$ -CD11c und  $\alpha$ -MR für 15 min inkubiert. Dargestellt sind Histogramme der Färbung Isotyp (graue Fläche) gegen Mannose Rezeptor (schwarze Linie) auf CD11c-positiven, PI-negativen dendritischen Zellen der C57BL/6-Mäuse (a) und MR<sup>-/-</sup>-Mäuse (b). Es ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

#### C.3.4. Stimulation dendritischer Zellen mit *M. tuberculosis*

Murine dendritische Zellen aus C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden mit 10 ng/ml LPS und verschiedenen *M. tuberculosis*-Stämmen (H37Rv, CDC1551, Beijing3547 und Beijing4203) stimuliert. Nach 24 h wurden die Kulturüberstände abgenommen und auf IL-12p40 und TNF- $\alpha$  mittels ELISA untersucht.

Eine Stimulation mit den unterschiedlichen *M. tuberculosis*-Stämmen induzierte eine Produktion von 30-70 ng/ml IL-12p40. Es ließ sich feststellen, dass die beiden Beijing-Stämme gegenüber den Stämmen H37Rv und CDC1551 fast doppelt so viel IL-12p40 produzierten. Die Analyse der IL-12p40-Produktion in dendritischen Zellen der MR<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigte eine um ca. 2,5-fach erhöhte Produktion von IL-12p40 bei Inkubation mit H37Rv und CDC1551 gegenüber den dendritischen Zellen der C57BL/6-Mäuse. Nach Inkubation mit beiden Beijing-Stämmen konnte noch eine 1,5-fach erhöhte Produktion von IL-12p40 in dendritischen Zellen der MR<sup>-/-</sup>-Mäuse gegenüber den Zellen der C57BL/6-Mäuse detektiert werden (Abb. 24a).



**Abb. 24. Zytokinproduktion von dendritischen Zellen aus C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen bei Stimulation mit *M. tuberculosis*.**

Murine dendritische Zellen aus C57BL/6- (schwarze Balken) und MR<sup>-/-</sup>- (weiße Balken) Mäusen wurden mit verschiedenen Stämmen von *M. tuberculosis* in einer Dosis von einem Keimen pro Zelle in Triplikaten stimuliert. Als Kontrollen dienten unstimulierte Zellen sowie mit 10 ng/ml LPS stimulierte Zellen. Gemessen wurden die Zytokine IL-12p40 (a) und TNF-α (b). Es sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von einem repräsentativen Experiment aus drei durchgeführten Experimenten dargestellt (Student's-t-Test: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; n.s., nicht signifikant)

Die Analyse der TNF-α-Produktion dendritischer Zellen aus C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten nach 24 h Inkubation mit LPS eine deutliche Freisetzung von 4000 pg/ml TNF-α. Die Inkubation mit *M. tuberculosis* H37Rv und CDC1551 zeigte eine verminderte Ausschüttung von TNF-α, wohingegen beide Beijing-Stämme eine um das ca. sechsfache erhöhte Produktion von TNF-α im Vergleich zu H37Rv und CDC1551 induzierten.

Eine Stimulation dendritischer Zellen der MR<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigte verglichen mit den Zellen der C57BL/6-Mäuse keine Unterschiede in der Freisetzung von TNF-α in den Kulturüberstand (Abb. 24b).

### Ergebnisse C.3.

In murinen dendritischen Zellen aus MR<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte eine im Gegensatz zu dendritischen Zellen aus C57BL/6-Mäusen gesteigerte IL-12p40-Produktion nach Stimulation mit verschiedenen *M. tuberculosis*-Stämmen gezeigt werden. Unterschiede in der Produktion von TNF- $\alpha$  wurden hingegen nicht detektiert.

Trotz höherer Expression des Makrophagen-Mannose-Rezeptors in Makrophagen aus C57BL/6-Mäusen im Gegensatz zu dendritischen Zellen dieser Mäuse konnten im Vergleich mit den Makrophagen der MR<sup>-/-</sup>-Mäuse keine Unterschiede in der Produktion von IL-12p40 und TNF- $\alpha$  nach Stimulation mit verschiedenen Stämmen von *M. tuberculosis* gefunden werden.

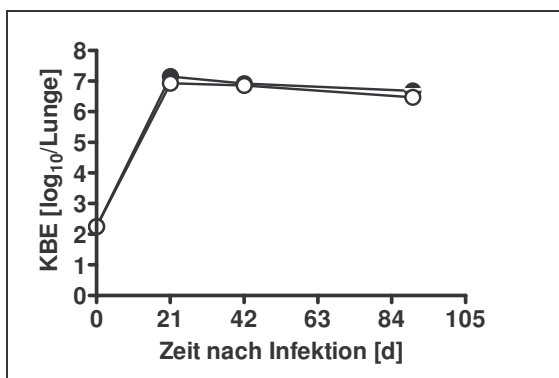
## C.4. Die Rolle des MR *in vivo* bei Infektion mit *M. tuberculosis*

### C.4.1. Infektion mit 100 KBE *M. tuberculosis* H37Rv

Um die Bedeutung des Makrophagen-Mannose-Rezeptors in der Infektion *in vivo* mit *M. tuberculosis* zu untersuchen, wurden MR<sup>-/-</sup>-Mäuse mit 100 Keimen pro Lunge H37Rv über den Aerosolweg infiziert. Anschließend wurde der Verlauf der Infektion an den Tagen 21, 42 und 90 detailliert charakterisiert.

#### C.4.1.1. Keimzahlentwicklung

Die Analyse der Keimlast in den Lungen zeigt, dass in der C57BL/6-Wildtyp-Mause ein deutliches Wachstum auf 10<sup>7</sup> Keime pro Mauslunge an Tag 21 zu verzeichnen war.



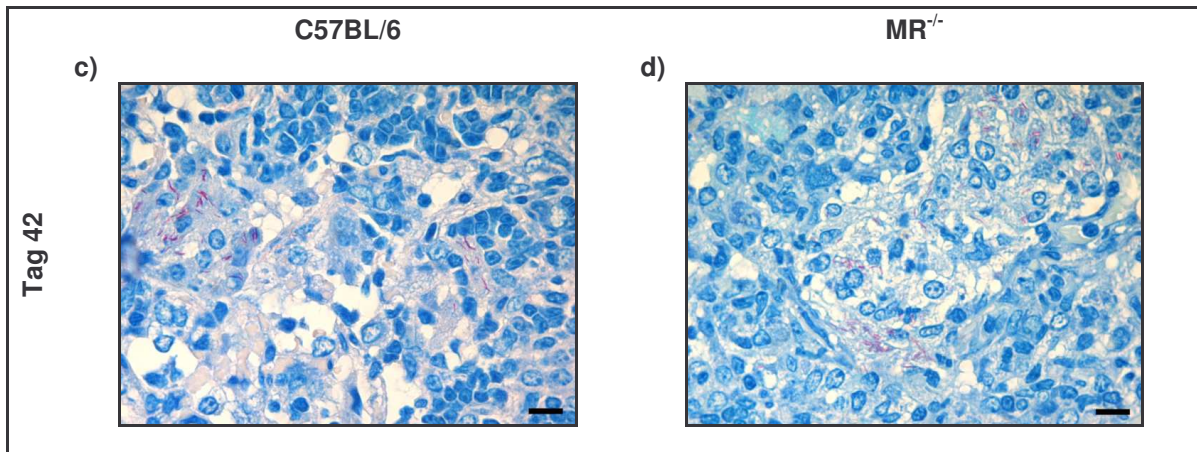
**Abb. 25. Keimlast von *M. tuberculosis* infizierten C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

C57BL/6-Wildtyp- (schwarze Kreise) und MR<sup>-/-</sup>- (weiße Kreise) Mäuse wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. An den Tagen 21, 42 und 90 wurde die Keimlast in den Lungen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Tieren pro Gruppe aus einem Experiment. (Student's-t-Test: nicht signifikant)

Zwischen Tag 42 und Tag 90 verblieb die Keimlast auf gleich bleibend hohem Niveau. Ein Unterschied zwischen C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen im Hinblick auf die Keimzahlentwicklung wurde nicht beobachtet (Abb. 25).



In den Lungen mykobakteriell infizierter Mäuse ließen sich über die Ziehl-Neelsen-Färbung Mykobakterien darstellen. An Tag 42 nach Infektion mit 100 Keimen *M. tuberculosis* zeigten sich in den Granulomen vereinzelt Mykobakterien. Zwischen den Lungenschnitten von C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen waren keine Unterschiede erkennbar (Abb. 26).

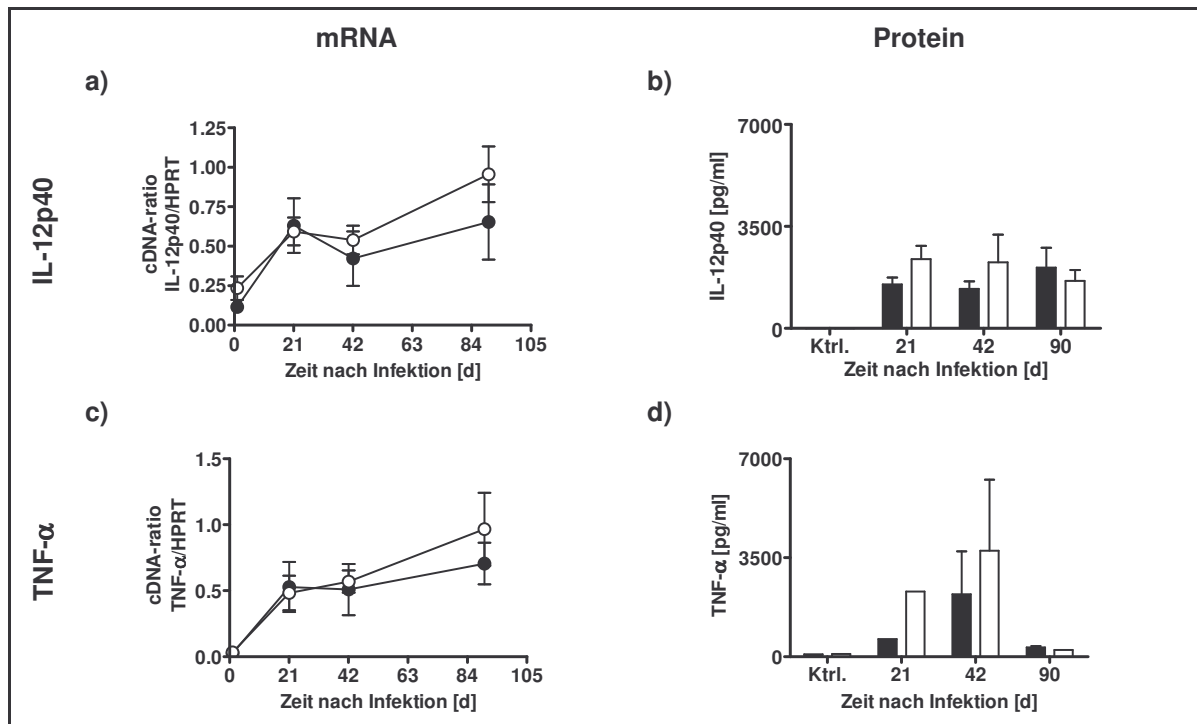


**Abb. 26. Nachweis von *M. tuberculosis*-in Lungengewebe infizierter C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäuse.**

C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. Zur lichtmikroskopischen Analyse von säurefesten Stäbchen wurden 2 µm dünne Paraffinschnitte von Formalin-fixierten Lungengewebe am Tag 42 nach Infektion von C57BL/6- (a) und MR<sup>-/-</sup>- (b) Mäusen angefertigt und nach Ziehl-Neelsen gefärbt. Balken = 10µm

### C.4.1.2. Zytokinexpression

Um eine Aussage über die Aktivierung des Immunsystems im Verlauf der Infektion mit *M. tuberculosis* in der Antwort der MR<sup>-/-</sup>-Mäuse treffen zu können, wurden die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-12p40 in den Lungen der infizierten C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäuse analysiert.



**Abb. 27. Expression von TNF- $\alpha$  und IL-12p40 in C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen nach Infektion mit *M. tuberculosis*.**

C57BL/6- (schwarze Symbole, Balken) und MR<sup>-/-</sup>- (weiße Symbole, Balken) Mäuse wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* H37Rv via Aerosol infiziert. Die Expression von TNF- $\alpha$  (a) und IL-12p40 (c) wurden zu den dargestellten Zeitpunkten in der Lunge mittels quantitativer PCR am LightCycler auf die HPRT-Expression normalisiert. Gleichzeitig wurde der Gehalt an TNF- $\alpha$  (b) sowie IL-12p40- (d) im Lungenhomogenat mittels ELISA ermittelt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Mäusen pro Gruppe aus einem durchgeführten Experiment. (Student's-t-Test: nicht signifikant)

Die mRNA-Expression von IL-12p40 stieg in den Lungen der C57BL/6-Mäuse bis Tag 90 stetig an. Auch in den Lungen der MR<sup>-/-</sup>-Mäuse war ein steter Anstieg der IL-12p40-mRNA-Expression zu detektieren. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 27a). Eine Analyse der Produktion von IL-12p40 im Lungenhomogenat auf Proteinebene zeigte ein

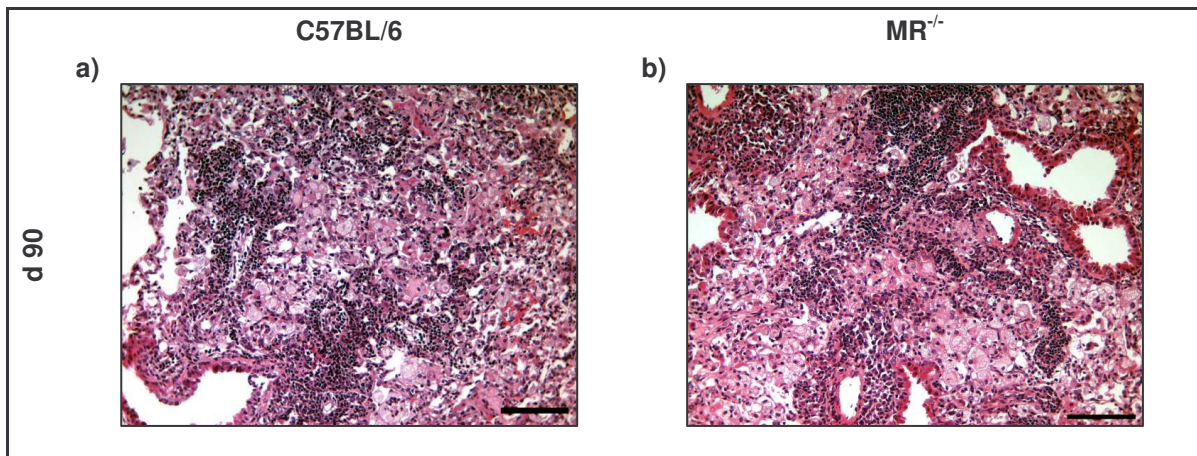
Plateau über den gesamten Zeitraum bis Tag 90 sowohl in C57BL/6- als auch in MR<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 27b).

Die Expression von TNF- $\alpha$ -mRNA in den Lungen der C57BL/6-Mäusen stieg während des Verlaufs der Infektion bis Tag 90 an. In den Lungen MR<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigte sich in etwa der gleiche Verlauf des Anstieges ohne signifikanten Unterschied (Abb. 27c). Auch auf Proteinebene konnte ein Anstieg der TNF- $\alpha$ -Produktion in den Lungenhomogenaten der C57BL/6-Mäuse dargestellt werden. Allerdings fiel an Tag 90 ein rapides Absinken der TNF- $\alpha$ -Produktion auf (Abb. 27d). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt werden.

#### **C.4.1.3. Granulomentwicklung**

Inwieweit ein möglicher Unterschied in der Granulomentwicklung in den Lungen infizierter C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen besteht, wurde mit Hilfe einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung in formalin-fixierten Paraffinschnitten über den gesamten Untersuchungszeitraum (d 21 - d 90) mikroskopisch untersucht.

Bereits drei Wochen nach Infektion der Tiere zeigten sich in den Lungen erste mononukleäre Infiltrationen in den Alveolen und dem Interstitialraum. Weitere 21 Tage später lagen Granulome sowohl in den Lungen von C57BL/6- als auch in den Lungen von MR<sup>-/-</sup>-Mäusen vor. An Tag 90 nach Infektion war der größte Teil des Alveolarraumes sowohl bei C57BL/6- als auch bei den MR<sup>-/-</sup>-Mäusen mit myeloiden Zellen und Lymphozyten gefüllt (Abb. 28). Es konnten keine Unterschiede in der Granulomentwicklung im Lungengewebe infizierter C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäuse dargestellt werden.

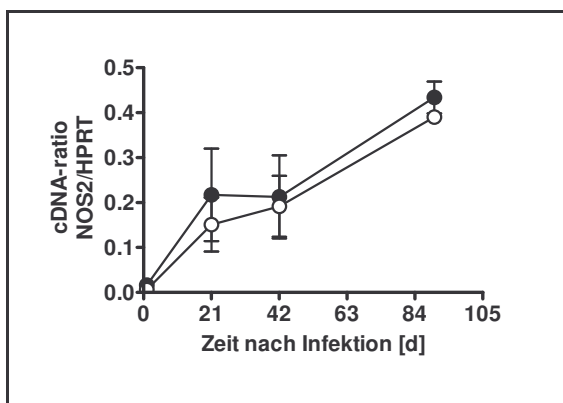


**Abb. 28. Histologische Untersuchungen von Lungen aus *M. tuberculosis*-infizierten C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. Zur lichtmikroskopischen Betrachtung von histologischen Veränderungen wurden 2 μm dünne Paraffinschnitte von Formalin-fixierten Lungengeweben am Tag 90 nach Infektion von C57BL/6- (a) und MR<sup>-/-</sup>- (b) Mäusen angefertigt und mit Hilfe von Hämatoxylin & Eosin gefärbt. Balken = 100 μm

#### C.4.1.4. Makrophagenaktivierung

Um eine Aussage über die Makrophagenaktivierung in MR<sup>-/-</sup>-Mäusen treffen zu können, wurde die Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase NOS2 in den Lungen von C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen mittels quantitativer PCR und immunhistochemischer Färbung analysiert.

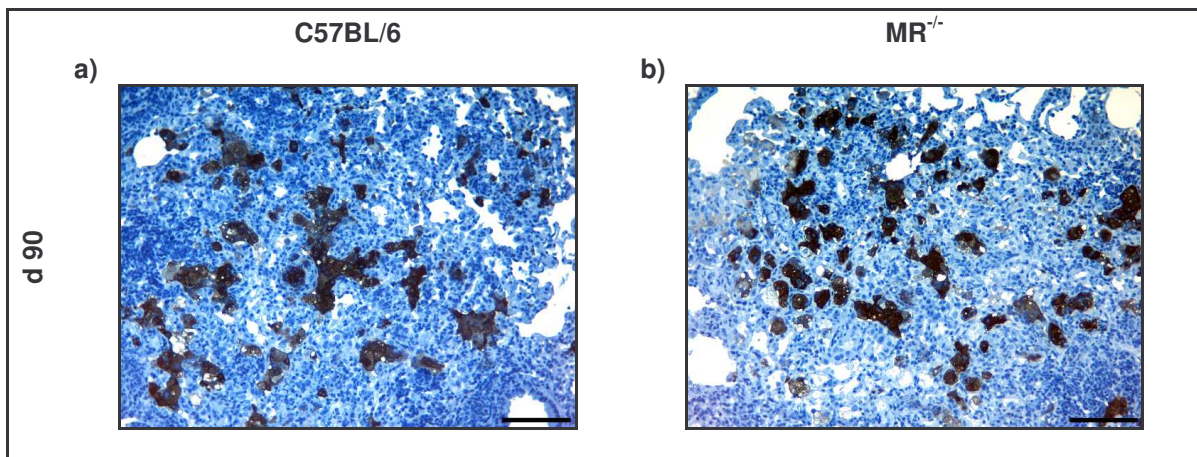


**Abb. 29. Expression von NOS2 in C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen während einer Infektion mit *M. tuberculosis*.**

C57BL/6- (schwarze Kreise) und MR<sup>-/-</sup>-Mäuse (weiße Kreise) wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* H37Rv via Aerosol infiziert. Die Expression von NOS2 wurde an den Tagen 21, 42 und 90 in der Lunge mittels quantitativer PCR am LightCycler relativ zur Expression von HPRT analysiert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Mäusen pro Gruppe aus einem durchgeführten Experiment. (Student's-t-Test: nicht signifikant)

Die quantitative Analyse der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS2) in den Lungen infizierter C57BL/6-Wildtyp-Mäuse zeigte im Verlauf der Infektion mit *M. tuberculosis* einen deutlichen Anstieg der mRNA-Expression von NOS2. Die MR<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten zu allen Infektionszeitpunkten eine vergleichbare NOS2-Expression (Abb. 29).

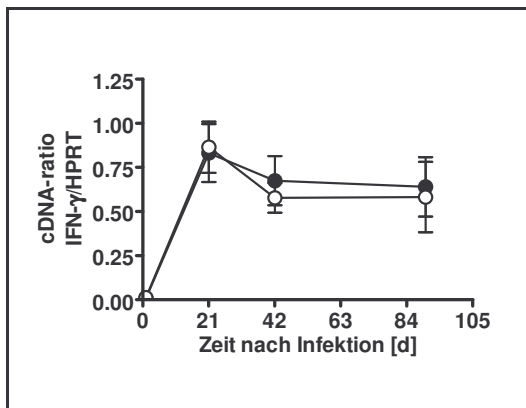
Untersucht man die Expression von NOS2 in formalin-fixierten Paraffinschnitten von Lungen aus C57BL/6-Mäusen ließ sich eine Zunahme der durch die Peroxidase-Reaktion gefärbten Makrophagen darstellen (Abb. 30 zeigt exemplarisch Tag 90). In den MR<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte eine Expression von NOS2 ohne Unterschiede zu den C57BL/6-Mäusen gezeigt werden.



**Abb. 30. Immunhistologische Analyse des Effektormoleküls NOS2 im Lungengewebe von *M. tuberculosis*-infizierten C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. Zur lichtmikroskopischen Betrachtung von aktivierten Makrophagen wurden 2 µm dünne Paraffinschnitte von Formalin-fixierten Lungengeweben an Tag 90 von C57BL/6- (a) und MR<sup>-/-</sup>- (b) Mäusen angefertigt und die NOS2-Expression immunohistochemisch nachgewiesen (Braunfärbung). Balken = 100µm

Die mittels quantitativer RT-PCR ermittelte mRNA-Expression für IFN-γ in den Lungen infizierter C57BL/6-Mäuse zeigte einen Anstieg bis Tag 21 und ein anschließendes leichtes Absinken auf ein Plateau ab Tag 42 im Verlaufe der Infektion mit *M. tuberculosis*. Im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen konnte in den MR<sup>-/-</sup>-Mäusen kein Unterschied in der mRNA-Expression von IFN-γ dargestellt werden (Abb. 31).

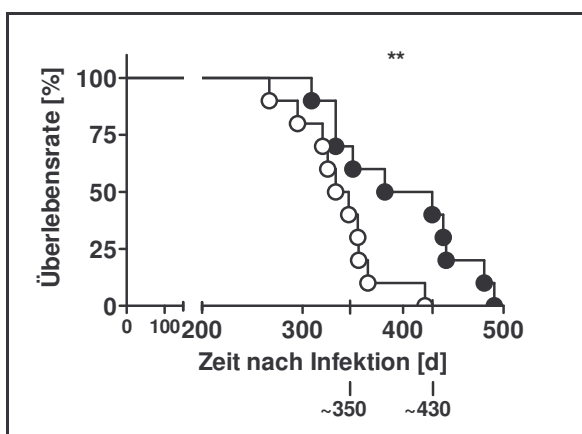


**Abb. 31. Expression von IFN- $\gamma$  in C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach einer Infektion mit *M. tuberculosis*.**

C57BL/6- (schwarze Kreise) und MR<sup>-/-</sup>- (weiße Kreise) Mäuse wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Expression von IFN- $\gamma$  in der Lunge mittels quantitativer LightCycler-PCR analysiert und relativ zur Expression von HPRT betrachtet. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Mäusen aus einem durchgeführten Experiment. (Student's-t-Test: nicht signifikant)

#### C.4.1.5. Langzeit-Überleben

Es wurden jeweils zehn C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäuse nach einer Infektion mit 100 Keimen *M. tuberculosis* H37Rv untersucht. Die mittlere Überlebensrate der C57BL/6-Mäuse lag bei ca. 350 Tagen nach Infektion, während die MR<sup>-/-</sup>-Mäuse ungefähr an Tag 430 zu 50% verstorben waren. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate von C57BL/6-Wildtyp- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach einer Infektion mit *M. tuberculosis* (Abb. 32).



**Abb. 32. Überlebensrate von C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>- Mäusen nach Infektion mit 100 KBE *M. tuberculosis*.**

C57BL/6- (schwarze Kreise) und MR<sup>-/-</sup>-Mäuse (weiße Kreise) wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. Jede Gruppe bestand aus 10 Tieren. (Log-Rank-Test: \*\*,  $p < 0,01$ )

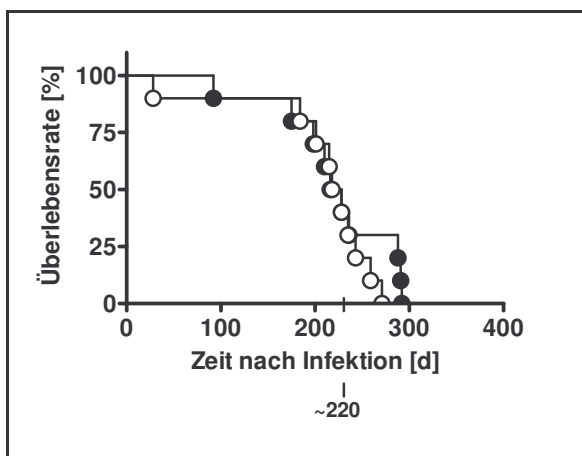
#### C.4.2. Infektion mit 1000 Keimen *M. tuberculosis*

Zur maximalen Stimulation der angeborenen Immunantwort wurden C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäuse mit 1000 KBE *M. tuberculosis* H37Rv über den Aerosolweg infiziert.

Da alle wie in den vorhergegangenen Experimenten beschriebenen Parameter keine Unterschiede zwischen den C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen aufwiesen, wird in diesem Teil nur die Mortalität dieses Versuches dargestellt.

##### C.4.2.1. Langzeit-Überleben

Nach ungefähr 150 Tagen begannen die Mäuse an ihrer Infektion zu versterben. So waren 50% der C57BL/6-Mäuse bereits nach 216 Tagen verstorben. Auch die MR<sup>-/-</sup>-Mäuse waren zu 50% an Tag 218 verstorben. Jedoch bildete sich in diesem Versuchsansatz ähnlich wie bei der Infektion mit 100 KBE *M. tuberculosis* eine Schulter aus. Allerdings zeigte dieses spätere Versterben der C57BL/6-Mäuse keinen signifikanten Unterschied zum Versterben der MR<sup>-/-</sup>-Mäuse (Abb. 33).



**Abb. 33. Überlebensrate von C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>- Mäusen nach einer Infektion mit 1000 KBE *M. tuberculosis*.**

C57BL/6- (schwarze Kreise) und MR<sup>-/-</sup>- (weiße Kreise) Mäuse wurden mit 100 KBE *M. tuberculosis* via Aerosol infiziert. Jede Gruppe bestand aus 10 Tieren, die täglich beobachtet wurden. (Log-Rank-Test: nicht signifikant)

**Ergebnisse C.4.**

Unter *in vivo*-Bedingungen zeigten sich nach aerogener Infektion mit *M. tuberculosis* sowohl bei einer Infektionsdosis von 100 Mykobakterien je Maus als auch bei 1000 Mykobakterien pro Maus im Vergleich von C57BL/6 und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Unterschiede in der Keimzahl- und der Granulomentwicklung, der myeloiden Zellaktivierung und der Produktion von Zytokinen (IL-12p40, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ). Allerdings verstarben bei Infektion mit 100 KBE *M. tuberculosis* die MR<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant früher als die C57BL/6-Mäuse.



## D. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten folgende neue Erkenntnisse über die Bedeutung der C-Typ-Lektine DC-SIGN und Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MR) in mykobakteriellen Infektionen im murinen System erarbeitet werden.

- I. In murinen dendritischen Zellen aus CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen konnte im Gegensatz zu dendritischen Zellen aus C57BL/6-Mäusen eine LPS-induzierte IL-12p40-Antwort durch gleichzeitige Zugabe von ManLAM aus *M. tuberculosis* dosisabhängig reduziert werden.
- II. Die Freisetzung von IL-12p40 (nicht aber TNF- $\alpha$ ) war nach Infektion mit *M. tuberculosis* in dendritischen Zellen aus CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen im Gegensatz zu C57BL/6-Mäusen auf Proteinebene reduziert. In dendritischen Zellen aus MR-defizienten Mäusen konnte im Gegensatz zu C57BL/6-Mäusen eine signifikante Erhöhung der Produktion von IL-12p40 gezeigt werden.
- III. Unter *in vivo*-Bedingungen zeigten sich bei Niedrigdosis (100 Keime pro Maus) sowie Hochdosis (2000 Keime pro Maus) bei *M. tuberculosis*-Infektion von C57BL/6 und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen keine Unterschiede in Keimzahl- und Granulomentwicklung, myeloider Zellaktivierung oder der Produktion von Zytokinen (IL-12p40, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ). Analoge Experimente mit MR-defizienten Mäusen ergaben ebenfalls keine Unterschiede.
- IV. Vergleichende Analysen der Langzeit-Überlebensrate bei Infektion mit *M. tuberculosis* zeigten im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen eine signifikant höhere Überlebensrate der hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse. Im Gegensatz dazu verstarben die MR-defizienten Mäuse bei gleicher Infektionsdosis signifikant früher als die C57BL/6-Mäuse.

Aktuelle Arbeiten zur Funktion von DC-SIGN haben DC-SIGN, neben seiner Funktion im Zusammenhang mit der Adhäsion von Zellen, als einen Rezeptor identifiziert, der mit verschiedenen Pathogenen interagiert (25, 38, 41, Übersicht in 21). Diese Untersuchungen beruhen allerdings ausschließlich auf Experimenten mit humanen dendritischen Zellen. Obwohl im murinen System fünf DC-SIGN-Homologe beschrieben worden sind (49), waren bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine für die murinen DC-SIGN-Homologe defizienten Mäuse verfügbar. Auch ist die funktionelle Bedeutung der murinen Homologe bis dato nur unzureichend untersucht. Durch den Einsatz von CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>- (humanes DC-SIGN an den murinen CD11c-Promotor gekoppelt) und BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen (humanes DC-SIGN an den humanen Promotor gekoppelt (155)), die freundlicherweise von Dr. med. T. Sparwasser (TU München) zur Verfügung gestellt wurden, konnten in der vorliegenden Arbeit funktionelle Analysen von DC-SIGN im murinen System durchgeführt werden.

Unterschiedlichen Arbeitsgruppen beschreiben DC-SIGN als Rezeptor, der mit verschiedensten Pathogenen, wie z.B. Viren (165, 166), Bakterien (167), Parasiten (168) und Pilzen (43) interagiert. In einer der ersten Arbeiten beschreiben Geijtenbeek und Mitarbeiter, dass die Bindung von Mykobakterien an DC-SIGN durch mannosylierte Glykostrukturen wie z.B. mannosyliertes Lipoarabinomannan (manLAM), einem Zellwandbestandteil von *M. tuberculosis*, gehemmt werden kann. Dieser Effekt scheint von terminal mannosylierten Strukturen abhängig zu sein und konnte nicht mit LAM aus schnellwachsenden Mykobakterienspezies (sog. AraLAM aus *Mycobacterium smegmatis* und *Mycobacterium chelonae*) gezeigt werden (150, 169). Die Interaktion von manLAM mit DC-SIGN hat auch einen funktionellen Einfluss auf die Immunantwort dendritischer Zellen: So hemmt manLAM bei gleichzeitiger Inkubation mit LPS in humanen dendritischen Zellen die Freisetzung von IL-12 (149, Übersicht in 170). Da bisherige Analysen zu DC-SIGN ausschließlich in humanen Zellen durchgeführt wurden, sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht werden, inwiefern auf murinen dendritischen Zellen exprimiertes humanes

DC-SIGN einen Einfluss auf die Produktion von IL-12p40 hat. In der vorliegenden Arbeit konnte in dendritischen Zellen der CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse durch manLAM die LPS-induzierten Ausschüttung von IL-12p40 dosisabhängig inhibiert werden. Untersuchungen mit dendritischen Zellen einer zweiten, unabhängig generierten BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Maus zeigten zwar keine signifikante Hemmung durch manLAM, ließen aber bei Einsatz hoher Konzentrationen von manLAM eine dahin gehende Tendenz vermuten. Die Tatsache, dass die dendritischen Zellen der BAC<sup>tg</sup>-Mäuse nur zu 12% DC-SIGN exprimieren, deutet möglicherweise darauf hin, dass die Hemmung der IL-12p40-Freisetzung von der Expressionsdichte von humanem DC-SIGN auf dendritischen Zellen abhängen könnte.

Überraschend ist, dass in dendritischen Zellen der C57BL/6-Mäuse keinerlei Hemmung der LPS-induzierten IL-12p40-Antwort durch manLAM zu messen war. Unter der Annahme, dass murines DC-SIGN auf dendritischen Zellen exprimiert ist (49), deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass dieses keinen Einfluss auf die Freisetzung von Zytokinen nach Stimulation mit mykobakteriellen Strukturen hat. Die vorliegende Arbeit bestätigt damit die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die mDC-SIGN zwar als ein Homolog zu humanem DC-SIGN beschreiben, dem Molekül jedoch eine andere Funktion zuweisen (49, 171). Im Gegensatz zu mDC-SIGN zeigt murines SIGNR1 ähnliche funktionelle Aspekte wie humanes DC-SIGN, allerdings wird mSIGNR1 nicht auf dendritischen Zellen exprimiert (49, 171).

Dendritische Zellen sind zwar nicht das primäre Habitat von Mykobakterien *in vivo* (149), sie haben jedoch eine zentrale Bedeutung für die Induktion einer Immunantwort. Wie von Geijtenbeek und Mitarbeitern durch Interaktion von *Mycobacterium bovis* BCG mit DC-SIGN und durch inhibitorische Antikörper gegen DC-SIGN gezeigt werden konnte, interagieren Mykobakterien auf humanen dendritischen Zellen primär mit DC-SIGN (150). Da in der vorliegenden Arbeit mit Strukturen der Zellwand von *M. tuberculosis* (manLAM) eine hDC-SIGN-abhängige Verminderung der Produktion von IL-12p40 in murinen dendritischen Zellen gezeigt werden konnte, wurde nachfolgend untersucht, ob sich die

Produktion von IL-12p40 in dendritischen Zellen aus C57BL/6- und hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen auch nach Kontakt mit intakten *M. tuberculosis*-Bakterien unterscheidet. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Expression von hDC-SIGN auf murinen dendritischen Zellen zu einer signifikanten Verminderung der IL-12p40-Produktion nach Kontakt mit *M. tuberculosis* führt. Im Rahmen dieser Arbeit kamen verschiedene *M. tuberculosis*-Stämme zum Einsatz. Unter anderem wurden Stämme des Beijing-Genotyps, eines weltweit zunehmenden Vertreters und derzeit epidemiologisch besonders relevanten Stammes (Beijing-Typ) verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Beijing-Stämme wiesen allerdings keine Multiresistenz auf. Die Hemmung der IL-12p40-Produktion dendritischer Zellen aus CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen nach Inkubation mit *M. tuberculosis* betrug im Vergleich zu den DC's der C57BL/6-Mäuse bei allen vier untersuchten Stämmen 40-50%. Analysen der IL-12p40-mRNA-Expression vier Stunden nach Infektion zeigten bereits eine Reduktion der Transkription. Dieser inhibitorische Effekt war allerdings nicht so ausgeprägt, wie auf Proteinebene. Somit hat DC-SIGN einen Einfluss sowohl auf die IL-12p40-Transkription als auch Translation nach Stimulation mit Mykobakterien. Allerdings sind weitere Experimente für die Untersuchung der zugrundeliegenden Signaltransduktionsmechanismen erforderlich.

Die Verminderung der Zytokinproduktion scheint davon abzuhängen, wie stark DC-SIGN auf den Zellen exprimiert wird. So zeigten auch bei Stimulation mit intakten Mykobakterien die dendritischen Zellen der BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse, die hDC-SIGN in deutlich geringerem Maße exprimieren, keine signifikanten Unterschiede in der Produktion von IL-12p40 gegenüber den Zellen der C57BL/6-Mäuse wie die Zellen der CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse. Nigou und Mitarbeiter haben postuliert, dass spezifische Mannose-bindende Mustererkennungs-Rezeptoren die Antwort auf Pathogene, die über die TLR-Moleküle induziert wird, behindern und so die zelluläre Immunantwort modulieren können (149). Diese Hypothese wird von Geijtenbeek und Mitarbeitern für DC-SIGN bestätigt (150). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass dem auf murinen dendritischen Zellen exprimierten humanen DC-SIGN ebenfalls diese Funktion zukommt. Die Daten deuten ferner

darauf hin, dass es in humanen und murinen dendritischen Zellen sehr ähnliche, DC-SIGN nachgeschaltete Signalkaskaden geben muss.

Reed und Mitarbeiter beschreiben durch Mykobakterien exprimierte Polyketide als Virulenzfaktoren, die einen inhibierenden Einfluss auf die Freisetzung von verschiedenen Zytokinen bewirken (172). Im Vergleich zu HN878, einem virulenten *M. tuberculosis*-Stamm, welcher der Beijing-Familie zugeordnet wird und Polyketide exprimiert (172), induziert der weniger virulente Stamm CDC1551 deutlich mehr IL-12p40 (173). Der Einsatz der beiden verwendeten Beijing-Stämme führte zu einer verminderten IL-12p40-Produktion im Vergleich zu H37Rv und CDC1551 in C57BL/6-Mäusen, was auf das Vorhandensein von Polyketiden hin zu weisen scheint. Mykobakterielle Polyketide scheinen jedoch keinen Einfluss auf die Inhibierung der IL-12p40-Produktion muriner dendritischer Zellen zu haben. Die im Allgemeinen erreichte Inhibitionsrate lag auch bei dieser Induktion immer bei max. 50%.

Analysen der TNF- $\alpha$ -mRNA, wie auch der Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand zeigten hingegen keine Unterschiede zwischen den dendritischen Zellen der C57BL/6- und der hDC-SIGN-transgenen Mäuse. Aus diesen Daten geht hervor, dass der durch hDC-SIGN induzierte inhibitorische Effekt in dendritischen Zellen spezifisch für die Freisetzung IL-12p40 zu sein scheint. Jedoch deutet die nicht vollständige Hemmung der IL-12p40-Freisetzung auch darauf hin, dass es noch weitere durch DC-SIGN nicht beeinflusste Wege der IL-12-Induktion auf dendritischen Zellen geben muss.

Unreife dendritische Zellen exprimieren neben DC-SIGN ebenfalls den Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MR), welcher ursprünglich als ein Rezeptor für die Bindung von Mykobakterien beschrieben wurde (85, 174, 175). Um neben DC-SIGN die Bedeutung eines weiteren C-Typ-Lektins im murinen System in mykobakteriellen Infektionen zu analysieren, wurden dendritische Zellen aus MR-defizienten Mäusen generiert und mit *M. tuberculosis* inkubiert. In vergleichenden Untersuchungen der IL-12p40-Antwort dendritischer Zellen nach Inkubation mit den vier *M. tuberculosis*-Stämmen zeigten dendritische Zellen aus MR-defizienten Mäusen gegenüber C57BL/6-Mäusen eine drastisch erhöhte IL-12p40-

Freisetzung. Bei der Analyse des Zytokins TNF- $\alpha$  konnten hingegen keine Unterschiede zwischen dendritischen Zellen aus C57BL/6- und MR<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt werden. Interessanterweise konnte in Makrophagen kein Effekt auf die Freisetzung von IL-12p40 und TNF- $\alpha$  festgestellt werden, obwohl der Mannose-Rezeptor hier deutlich exprimiert wird. Die Daten legen den Schluss nahe, dass sich die dem MR nachgeschalteten Signalwege in dendritischen Zellen deutlich von denen in Makrophagen unterscheiden.

Damit konnte in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden, dass *in vitro* die C-Typ-Lektine eine wichtige Rolle in der Regulation der Zytokinantwort nach Kontakt mit *M. tuberculosis*, insbesondere der IL-12p40-Produktion von dendritischen Zellen spielen.

Um zu überprüfen, ob hDC-SIGN in Mäusen Einfluss auf den Verlauf einer mykobakteriellen Infektion *in vivo* hat, wurden Mäuse per Aerosol, d.h. über den natürlichen Infektionsweg mit *M. tuberculosis* infiziert. Mit Hilfe dieses Modells konnten bisher wichtige Schlüsselmoleküle wie z.B. TNF- $\alpha$  (147, 152), NOS2 (138), IFN- $\gamma$  (136) identifiziert und der Beitrag von TLR2 und -4 (153) in mykobakteriellen Infektionen geklärt werden. Untersuchungen zur Rolle der C-Typ-Lektine in mykobakteriellen Infektionen unter *in vivo*-Bedingungen lagen zum Zeitpunkt der Arbeit nicht vor.

In den ersten 90 Tagen nach Infektion von C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen ließen sich keine Unterschiede in den pathologischen Veränderungen in der Lunge detektieren. Dies war insofern überraschend, da basierend auf den eigenen *in vitro*-Daten und den Experimenten anderer Arbeitsgruppen (21), Übersicht in 150 und 176) eine möglicherweise weniger ausgeprägte Granulomentwicklung in hDC-SIGN-transgenen Tieren erwartet worden war. Ein zentraler Faktor bei der Bildung von Granulomen und der Abtötung von Mykobakterien ist IFN- $\gamma$  (177). So zeigen IFN- $\gamma$ -defiziente Mäuse eine gestörte Granulombildung, ein ungebremstes Wachstum von Mykobakterien und versterben frühzeitig (135, 178). Myeloide Zellen wie Makrophagen, die Wirtszellen und gleichzeitig Haupteffektorzellen gegen *M. tuberculosis* darstellen

(179, 180), sind nach Aktivierung durch IFN- $\gamma$  in der Lage, die durch *M. tuberculosis* induzierte Blockade der Phagosomenreifung aufzuheben. Durch die Freisetzung von reaktiven Stickoxidintermediaten sind Makrophagen in der Lage, Mykobakterien abzutöten (137). Da DC-SIGN als immunsuppressiver Rezeptor auf dendritischen Zellen beschrieben (Übersicht in 150 und 176) und *in vitro* ein deutlicher Einfluss auf die IL-12p40-Freisetzung gezeigt wurde, ließ sich vermuten, dass es *in vivo* mit der Verminderung der IL-12p40-Produktion dendritischer Zellen transgener Mäuse zu einer Verminderung der Aktivierung von IFN- $\gamma$  und somit auch zu einer Verminderung der myeloiden Zellaktivierung führen könnte. Es konnten jedoch keine Unterschiede in der Expression von IL-12p40, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und NOS2 festgestellt werden.

In Bezug auf die Keimzahlentwicklung in den Lungen infizierter Tiere konnten keine Unterschiede zwischen C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse detektiert werden. Da an Tag 42 nach Infektion ein geringfügiger Unterschied der Bakterienzahl in der Lunge gezeigt werden konnte, wurde ein zweiter Infektionsansatz mit 2000 Keimen pro Mäuselunge gewählt. Diese Dosis sollte zur maximalen Stimulation des angeborenen Immunsystems dienen, um so die Bedeutung von DC-SIGN insbesondere für die frühe Phase der Infektion deutlicher herauszuarbeiten. Zu diesem Zeitpunkt bestand auch die Möglichkeit einen weiteren hDC-SIGN-transgenen Mausstamm (BAC-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse), in denen DC-SIGN unter der Kontrolle des humanen Promotors exprimiert wird, in die Untersuchungen mit einzubeziehen.

Es konnte allerdings auch in diesem Hochdosisexperiment weder in den CD11c- noch in den BAC-transgenen Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen eine Erhöhung der Keimlast detektiert werden. Die vorliegende Arbeit zeigt zwar *in vitro* eine 50%ige Hemmung der IL-12p40-Freisetzung hDC-SIGN-transgener Mäuse, jedoch scheint die Expression von humanem DC-SIGN in murinen dendritischen Zellen *in vivo* für die frühe Phase einer Immunantwort gegen *M. tuberculosis* keinen Einfluss zu haben.

Ein *in vivo* Experiment mit MR-defizienten Mäusen, deren dendritische Zellen nach Inkubation mit verschiedenen *M. tuberculosis*-Stämmen einen drastisch erhöhten Spiegel des proinflammatorischen Zytokins IL-12p40 zeigten, sollte nachweisen, ob sich *in vivo* eine hyperinflammatorische Immunantwort durch eine deutlich ausgeprägte Granulombildung und eventuell erhöhte myeloide Zellaktivierung bestätigen lässt. Nach einer Infektionsdosis von 100 bzw. 1000 Keimen pro Maus konnten jedoch auch in diesen Experimenten keinerlei Unterschiede in der Ausbildung von Granulomen, der Entwicklung der Keimlast, der Zytokinexpression sowie der Expression von NOS2 während der ersten 90 Tage nach Infektion festgestellt werden.

Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten auf eine bedeutsame Funktion der C-Typ-Lektine in der Spätphase der Infektion hin. So zeigten erstaunlicherweise die CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse eine um 20 Tage verlängerte mittlere Überlebensrate der mykobakteriellen Infektion im Niedrigdosis-Modell. Dieser Unterschied in der Reaktion von C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen konnte im Hochdosismodell mit 2000 Keimen pro Lunge bestätigt werden. Diese Beobachtung mit einer unabhängig generierten hDC-SIGN-transgenen Maus unterstreicht die Bedeutung von DC-SIGN zu einem sehr späten Zeitpunkt der Infektion. Aktuell sind jedoch die molekularen Grundlagen für das verlängerte Überleben der DC-SIGN-transgenen Mäuse unverstanden.

In allen Infektionsexperimenten wurden am letzten Analysezeitpunkt in den histologischen Untersuchungen der Lunge hoch vakuolisierte histiozytäre Schaumzellen gefunden. Diese Zellen sind ein typisches Merkmal von Granulomen in chronisch mit *M. tuberculosis* infizierten Mäusen (181). Die Entstehung und Funktion dieser Zellen während der granulomatösen Antwort ist bis dato unklar. Jedoch ist DEC-205, ein dendritischer Zellmarker, auf diesen Zellen exprimiert, ebenso exprimieren diese Zellen andere typische Marker für dendritische Zellen, so z.B. CD11b, CD11c, MHC II und CD40 (182). Es gibt neuere Studien, welche die Expression von DC-SIGN nicht nur auf dendritische Zellen festlegen sondern auch auf Makrophagen in ähnlicher Expressionsdichte beschreiben (183). Ob eine DC-SIGN-Expression besonders auf diesen Zellen in



Granulomen eine wesentliche Rolle, z.B. in der Mediatorfreisetzung zu späten Zeitpunkten spielt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der C-Typ-Lektine in der späten Phase der *M. tuberculosis*-Infektion sind die Daten der MR-defizienten Mäuse. So konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die MR-defizienten Mäuse wesentlich früher als C57BL/6-Mäuse der Aerosol-Infektion mit 100 *M. tuberculosis* erlagen. Dieser Effekt konnte in der Hochdosisinfektion nicht gezeigt werden. Bei 1000 Keimen pro Maus ist es aber wahrscheinlich, dass diese hohe Dosis zu einer Überreaktion des Immunsystems führt, die eventuelle Unterschiede überdecken könnte.

Aufgrund des signifikant späteren Versterbens der hDC-SIGN<sup>tg</sup>- Mäuse und des signifikant früheren Versterbens der MR<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen, stellt sich die Frage, inwieweit die Mediatorfreisetzung, z.B. IL-12 zu späteren Zeitpunkten der Infektion von Bedeutung ist, was in weiteren Experimenten genauer untersucht werden müsste.

Somit kann aus den in dieser Arbeit erfolgten Analysen abgeleitet werden, dass C-Typ-Lektine *in vivo* während der frühen Phase der Infektion mit *M. tuberculosis* keine Auswirkungen auf wichtige Parameter der Immunantwort und den Infektionsverlauf hDC-SIGN-transgener und MR-defizienter Mäuse haben. Die vorliegende Arbeit zeigt in unterschiedlichen Modellen, dass C-Typ-Lektinen jedoch eine noch nicht näher definierte Bedeutung in der finalen Phase der Infektion zukommt.

## E. Literaturverzeichnis

1. Kocourek, J. and V. Horejsi. 1983. In *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. T. C. Bog-Hansen and G. A. Spengler, eds. Walter de Gruyter, Berlin and New York, pp. 3-6.
2. Franz, H. 1988. The ricin story. *Adv.Lectin Res.* 1:10-25.
3. Sharon, N. and H. Lis. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14:53R-62R.
4. Ehrlich, P. 1891. Experimentelle Untersuchungen über Immunität. I. Ueber Ricin. *Dt.Med.Wschr.* 17:976-979.
5. Ehrlich, P. 1891. Experimentelle Untersuchungen über Immunität. II. Ueber Abrin. *Dt.Med.Wschr.* 17:1218-1219.
6. Drickamer, K. 1988. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J.Biol.Chem.* 263:9557-9560.
7. Varki, A. 1999. Discovery and classification of animal lectins. In *Essentials of Glycobiology*. Varki,A.; Cummings,R.D.; Esko,J.; Freeze,H.H.; Hart,G.; Marth,J., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 333-343.
8. Cambi, A. and C. G. Figdor. 2003. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15:539-546.
9. Berg, J. M., J. L. Tymoczko, and L. Stryer. 2003. Kohlenhydrate. In *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg/Berlin, pp. 341-347.
10. Drickamer, K. 1999. C-type lectin-like domains. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 9:585-590.
11. Weis, W. I., R. Kahn, R. Fourme, K. Drickamer, and W. A. Hendrickson. 1991. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science* 254:1608-1615.
12. Cambi, A., M. Koopman, and C. G. Figdor. 2005. How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol.* 7:481-488.
13. Wintergerst, E., H. Manz-Keinke, H. Plattner, and J. Schlepper-Schafer. 1989. The interaction of a lung surfactant protein (SP-A) with macrophages is mannose dependent. *Eur.J.Cell Biol.* 50:291-298.

14. Lu, J., C. Teh, U. Kishore, and K. B. Reid. 2002. Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochim.Biophys.Acta* 1572:387-400.
15. Kawasaki, N., T. Kawasaki, and I. Yamashina. 1983. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *J.Biochem.(Tokyo)* 94:937-947.
16. Weis, W. I. and K. Drickamer. 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu.Rev.Biochem.* 65:441-473.
17. McGreal, E. P., L. Martinez-Pomares, and S. Gordon. 2004. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol.Immunol.* 41:1109-1121.
18. Stahl, P. D., P. H. Schlesinger, E. Sigardson, J. S. Rodman, and Y. C. Lee. 1980. Receptor-mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: characterization and evidence for receptor recycling. *Cell* 19:207-215.
19. Tietze, C., P. Schlesinger, and P. Stahl. 1982. Mannose-specific endocytosis receptor of alveolar macrophages: demonstration of two functionally distinct intracellular pools of receptor and their roles in receptor recycling. *J.Cell Biol.* 92:417-424.
20. Engering, A., T. B. Geijtenbeek, S. J. van Vliet, M. Wijers, E. van Liempt, N. Demarex, A. Lanzavecchia, J. Fransen, C. G. Figdor, V. Piguet, and Y. van Kooyk. 2002. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J.Immunol.* 168:2118-2126.
21. van Kooyk, Y. and T. B. Geijtenbeek. 2003. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat.Rev.Immunol.* 3:697-709.
22. Feinberg, H., D. A. Mitchell, K. Drickamer, and W. I. Weis. 2001. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 294:2163-2166.
23. Mitchell, D. A., A. J. Fadden, and K. Drickamer. 2001. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J.Biol.Chem.* 276:28939-28945.
24. Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk, and C. G. Figdor. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575-585.

25. Appelmelk, B. J., D. van, I, S. J. van Vliet, C. M. Vandenbroucke-Grauls, T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2003. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J.Immunol.* 170:1635-1639.
26. Colmenares, M., A. Puig-Kroger, O. M. Pello, A. L. Corbi, and L. Rivas. 2002. Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania* amastigotes. *J.Biol.Chem.* 277:36766-36769.
27. Alvarez, C. P., F. Lasala, J. Carrillo, O. Muniz, A. L. Corbi, and R. Delgado. 2002. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J.Virol.* 76:6841-6844.
28. Tailleux, L., O. Schwartz, J. L. Herrmann, E. Pivert, M. Jackson, A. Amara, L. Legres, D. Dreher, L. P. Nicod, J. C. Gluckman, P. H. Lagrange, B. Gicquel, and O. Neyrolles. 2003. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J.Exp.Med.* 197:121-127.
29. Halary, F., A. Amara, H. Lortat-Jacob, M. Messerle, T. Delaunay, C. Houles, F. Fieschi, F. Arenzana-Seisdedos, J. F. Moreau, and J. Dechanet-Merville. 2002. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity.* 17:653-664.
30. Tassaneeritthep, B., T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumpfheller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birs, R. M. Steinman, S. Schlesinger, and M. A. Marovich. 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J.Exp.Med.* 197:823-829.
31. Soilleux, E. J. 2003. DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) and DC-SIGN-related (DC-SIGNR): friend or foe? *Clin.Sci.(Lond)* 104:437-446.
32. Geijtenbeek, T. B., D. J. Krooshoop, D. A. Bleijs, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, V. Grabovsky, R. Alon, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat.Immunol.* 1:353-357.
33. van Gisbergen, K. P., M. Sanchez-Hernandez, T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2005. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J.Exp.Med.* 201:1281-1292.

34. van Gisbergen, K. P., I. S. Ludwig, T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2005. Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett.* 579:6159-6168.
35. Feinberg, H., Y. Guo, D. A. Mitchell, K. Drickamer, and W. I. Weis. 2005. Extended neck regions stabilize tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *J.Biol.Chem.* 280:1327-1335.
36. Snyder, G. A., M. Colonna, and P. D. Sun. 2005. The structure of DC-SIGNR with a portion of its repeat domain lends insights to modeling of the receptor tetramer. *J.Mol.Biol.* 347:979-989.
37. Curtis, B. M., S. Scharnowske, and A. J. Watson. 1992. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:8356-8360.
38. Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100:587-597.
39. Simmons, G., J. D. Reeves, C. C. Grogan, L. H. Vandenberghe, F. Baribaud, J. C. Whitbeck, E. Burke, M. J. Buchmeier, E. J. Soilleux, J. L. Riley, R. W. Doms, P. Bates, and S. Pohlmann. 2003. DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology* 305:115-123.
40. Klimstra, W. B., E. M. Nangle, M. S. Smith, A. D. Yurochko, and K. D. Ryman. 2003. DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for alphaviruses and distinguish between mosquito cell- and mammalian cell-derived viruses. *J. Virol.* 77:12022-12032.
41. Lozach, P. Y., H. Lortat-Jacob, d. L. de Lacroix, I. Staropoli, S. Foung, A. Amara, C. Houles, F. Fieschi, O. Schwartz, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and R. Altmeyer. 2003. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J.Biol.Chem.* 278:20358-20366.
42. Bergman, M. P., A. Engering, H. H. Smits, S. J. van Vliet, A. A. van Bodegraven, H. P. Wirth, M. L. Kapsenberg, C. M. Vandenbroucke-Grauls, Y. van Kooyk, and B. J. Appelmek. 2004. *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J.Exp.Med.* 200:979-990.

43. Cambi, A., K. Gijzen, J. M. de Vries, R. Torensma, B. Joosten, G. J. Adema, M. G. Netea, B. J. Kullberg, L. Romani, and C. G. Figdor. 2003. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 33:532-538.
44. van Die, I., S. J. van Vliet, A. K. Nyame, R. D. Cummings, C. M. Bank, B. Appelmelk, T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2003. The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. *Glycobiology* 13:471-478.
45. Meyer, S., E. van Liempt, A. Imberty, Y. van Kooyk, H. Geyer, R. Geyer, and D. van, I. 2005. DC-SIGN mediates binding of dendritic cells to authentic pseudo-Lewis<sup>y</sup> glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae - the first parasite-specific ligand of DC-SIGN. *J.Biol.Chem.*
46. Lee, B., G. Leslie, E. Soilleux, U. O'Doherty, S. Baik, E. Levroney, K. Flummerfelt, W. Swiggard, N. Coleman, M. Malim, and R. W. Doms. 2001. cis Expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and a coreceptor. *J.Virol.* 75:12028-12038.
47. Soilleux, E. J., L. S. Morris, B. Lee, S. Pohlmann, J. Trowsdale, R. W. Doms, and N. Coleman. 2001. Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV. *J.Pathol.* 195:586-592.
48. Soilleux, E. J., L. S. Morris, G. Leslie, J. Chehimi, Q. Luo, E. Levroney, J. Trowsdale, L. J. Montaner, R. W. Doms, D. Weissman, N. Coleman, and B. Lee. 2002. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations *in situ* and *in vitro*. *J.Leukoc.Biol.* 71:445-457.
49. Park, C. G., K. Takahara, E. Umemoto, Y. Yashima, K. Matsubara, Y. Matsuda, B. E. Clausen, K. Inaba, and R. M. Steinman. 2001. Five mouse homologues of the human dendritic cell C-type lectin, DC-SIGN. *Int.Immunol.* 13:1283-1290.
50. Baribaud, F., S. Pohlmann, T. Sparwasser, M. T. Kimata, Y. K. Choi, B. S. Haggarty, N. Ahmad, T. Macfarlan, T. G. Edwards, G. J. Leslie, J. Arnason, T. A. Reinhart, J. T. Kimata, D. R. Littman, J. A. Hoxie, and R. W. Doms. 2001. Functional and antigenic characterization of human, rhesus macaque, pigtailed macaque, and murine DC-SIGN. *J.Virol.* 75:10281-10289.

51. Geijtenbeek, T. B., P. C. Groot, M. A. Nolte, S. J. van Vliet, S. T. Gangaram-Panday, G. C. van Duijnhoven, G. Kraal, A. J. van Oosterhout, and Y. van Kooyk. 2002. Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens *in vivo*. *Blood* 100:2908-2916.
52. Napper, C. E., M. H. Dyson, and M. E. Taylor. 2001. An extended conformation of the macrophage mannose receptor. *J.Biol.Chem.* 276:14759-14766.
53. East, L. and C. M. Isacke. 2002. The mannose receptor family. *Biochim.Biophys.Acta* 1572:364-386.
54. Taylor, M. E., K. Bezouska, and K. Drickamer. 1992. Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor. *J.Biol.Chem.* 267:1719-1726.
55. Wileman, T. E., M. R. Lennartz, and P. D. Stahl. 1986. Identification of the macrophage mannose receptor as a 175-kDa membrane protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:2501-2505.
56. Fiete, D. J., M. C. Beranek, and J. U. Baenziger. 1998. A cysteine-rich domain of the "mannose" receptor mediates GalNAc-4-SO<sub>4</sub> binding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:2089-2093.
57. Simpson, D. Z., P. G. Hitchen, E. L. Elmhirst, and M. E. Taylor. 1999. Multiple interactions between pituitary hormones and the mannose receptor. *Biochem.J.* 343:403-411.
58. Leteux, C., W. Chai, R. W. Loveless, C. T. Yuen, L. Uhlin-Hansen, Y. Combarnous, M. Jankovic, S. C. Maric, Z. Misulovin, M. C. Nussenzweig, and T. Feizi. 2000. The cysteine-rich domain of the macrophage mannose receptor is a multispecific lectin that recognizes chondroitin sulfates A and B and sulfated oligosaccharides of blood group Lewis(a) and Lewis(x) types in addition to the sulfated N-glycans of lutropin. *J.Exp.Med.* 191:1117-1126.
59. Smedsrod, B., J. Melkko, L. Risteli, and J. Risteli. 1990. Circulating C-terminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *Biochem.J.* 271:345-350.
60. Allavena, P., M. Chieppa, P. Monti, and L. Piemonti. 2004. From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor. *Crit Rev.Immunol.* 24:179-192.
61. Young, P. R., C. Karanutilake, and A. P. Zygas. 1991. Binding of cathepsin D to the mannose receptor on rat peritoneal macrophages. *Biochim.Biophys.Acta* 1095:1-4.

62. Shepherd, V. L. and J. R. Hoidal. 1990. Clearance of neutrophil-derived myeloperoxidase by the macrophage mannose receptor. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2:335-340.
63. Gordon, S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111:927-930.
64. Astarie-Dequeker, C., E. N. N'Diaye, C. Le, V. M. G. Rittig, J. Prandi, and I. Maridonneau-Parini. 1999. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect.Immun.* 67:469-477.
65. Fratti, R. A., J. Chua, I. Vergne, and V. Deretic. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:5437-5442.
66. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J.Exp.Med.* 182:389-400.
67. Engering, A. J., M. Cella, D. Fluitsma, M. Brockhaus, E. C. Hoefsmit, A. Lanzavecchia, and J. Pieters. 1997. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 27:2417-2425.
68. Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
69. Hart, D. N. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245-3287.
70. Martinez-Pomares, L., J. A. Mahoney, R. Kaposzta, S. A. Linehan, P. D. Stahl, and S. Gordon. 1998. A functional soluble form of the murine mannose receptor is produced by macrophages in vitro and is present in mouse serum. *J.Biol.Chem.* 273:23376-23380.
71. Fraser, I. P., K. Takahashi, H. Koziel, B. Fardin, A. Harmsen, and R. A. Ezekowitz. 2000. *Pneumocystis carinii* enhances soluble mannose receptor production by macrophages. *Microbes.Infect.* 2:1305-1310.
72. Magnusson, S. and T. Berg. 1993. Endocytosis of ricin by rat liver cells in vivo and in vitro is mainly mediated by mannose receptors on sinusoidal endothelial cells. *Biochem.J.* 291 ( Pt 3):749-755.



73. Biessen, E. A., M. van Teijlingen, H. Vietsch, M. M. Barrett-Bergshoeff, M. K. Bijsterbosch, D. C. Rijken, T. J. van Berkel, and J. Kuiper. 1997. Antagonists of the mannose receptor and the LDL receptor-related protein dramatically delay the clearance of tissue plasminogen activator. *Circulation* 95:46-52.
74. Lee, S. J., S. Evers, D. Roeder, A. F. Parlow, J. Risteli, L. Risteli, Y. C. Lee, T. Feizi, H. Langen, and M. C. Nussenzweig. 2002. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science* 295:1898-1901.
75. Ezekowitz, R. A., D. J. Williams, H. Koziel, M. Y. Armstrong, A. Warner, F. F. Richards, and R. M. Rose. 1991. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 351:155-158.
76. O'Riordan, D. M., J. E. Standing, and A. H. Limper. 1995. *Pneumocystis carinii* glycoprotein A binds macrophage mannose receptors. *Infect.Immun.* 63:779-784.
77. Larkin, M., R. A. Childs, T. J. Matthews, S. Thiel, T. Mizuochi, A. M. Lawson, J. S. Savill, C. Haslett, R. Diaz, and T. Feizi. 1989. Oligosaccharide-mediated interactions of the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition. *AIDS* 3:793-798.
78. Reading, P. C., J. L. Miller, and E. M. Anders. 2000. Involvement of the mannose receptor in infection of macrophages by influenza virus. *J.Virol.* 74:5190-5197.
79. Nguyen, D. G. and J. E. Hildreth. 2003. Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur.J.Immunol.* 33:483-493.
80. Felipe, I., S. Bim, and W. Loyola. 1989. Participation of mannose receptors on the surface of stimulated macrophages in the phagocytosis of glutaraldehyde-fixed *Candida albicans*, in vitro. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 22:1251-1254.
81. Ezekowitz, R. A., K. Sastry, P. Bailly, and A. Warner. 1990. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J.Exp.Med.* 172:1785-1794.
82. McGreal, E. P., J. L. Miller, and S. Gordon. 2005. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 17:18-24.

83. Pacheco-Soares, C., L. C. Gaziri, W. Loyola, and I. Felipe. 1992. Phagocytosis of enteropathogenic *Escherichia coli* and *Candida albicans* by lectin-like receptors. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 25:1015-1024.
84. Bermudez, L. E., L. S. Young, and H. Enkel. 1991. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human macrophages: roles of membrane receptors and serum proteins. *Infect.Immun.* 59:1697-1702.
85. Schlesinger, L. S. 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J.Immunol.* 150:2920-2930.
86. Stahl, P. D. and R. A. Ezekowitz. 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr.Opin.Immunol.* 10:50-55.
87. Liu, Y., H. Liu, B. O. Kim, V. H. Gattone, J. Li, A. Nath, J. Blum, and J. J. He. 2004. CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor. *J.Virol.* 78:4120-4133.
88. Regnier-Vigouroux, A. 2003. The mannose receptor in the brain. *Int.Rev.Cytol.* 226:321-342.
89. Uccini, S., M. C. Sirianni, L. Vincenzi, S. Topino, A. Stoppacciaro, L. P. Lesnori, I. M. Capuano, C. Masini, D. Cerimele, M. Cella, A. Lanzavecchia, P. Allavena, A. Mantovani, C. D. Baroni, and L. P. Ruco. 1997. Kaposi's sarcoma cells express the macrophage-associated antigen mannose receptor and develop in peripheral blood cultures of Kaposi's sarcoma patients. *Am.J.Pathol.* 150:929-938.
90. Harris, N., L. L. Peters, E. M. Eicher, M. Rits, D. Raspberry, Q. G. Eichbaum, M. Super, and R. A. Ezekowitz. 1994. The exon-intron structure and chromosomal localization of the mouse macrophage mannose receptor gene *Mrc1*: identification of a Ricin-like domain at the N-terminus of the receptor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 198:682-692.
91. Takahashi, K., M. J. Donovan, R. A. Rogers, and R. A. Ezekowitz. 1998. Distribution of murine mannose receptor expression from early embryogenesis through to adulthood. *Cell Tissue Res.* 292:311-323.
92. Linehan, S. A., L. Martinez-Pomares, P. D. Stahl, and S. Gordon. 1999. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J.Exp.Med.* 189:1961-1972.

93. Barton, G. M. and R. Medzhitov. 2002. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 14:380-383.
94. Turley, S. J., K. Inaba, W. S. Garrett, M. Ebersold, J. Unternaehrer, R. M. Steinman, and I. Mellman. 2000. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 288:522-527.
95. Inaba, K., S. Turley, T. Iyoda, F. Yamaide, S. Shimoyama, Reis e Sousa, R. N. Germain, I. Mellman, and R. M. Steinman. 2000. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J.Exp.Med.* 191:927-936.
96. Lipscomb, M. F. and B. J. Masten. 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev.* 82:97-130.
97. Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 1:135-145.
98. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 21:335-376.
99. Hashimoto, C., K. L. Hudson, and K. V. Anderson. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.
100. Belvin, M. P. and K. V. Anderson. 1996. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 12:393-416.
101. Akira, S. and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat.Rev.Immunol.* 4:499-511.
102. Dunne, A., M. Ejdeback, P. L. Ludidi, L. A. O'Neill, and N. J. Gay. 2003. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J.Biol.Chem.* 278:41443-41451.
103. Anderson, K. V. 2000. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr.Opin.Immunol.* 12:13-19.
104. Visintin, A., A. Mazzoni, J. H. Spitzer, D. H. Wyllie, S. K. Dower, and D. M. Segal. 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J.Immunol.* 166:249-255.

105. Heufler, C., F. Koch, U. Stanzl, G. Topar, M. Wysocka, G. Trinchieri, A. Enk, R. M. Steinman, N. Romani, and G. Schuler. 1996. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur.J.Immunol.* 26:659-668.
106. Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat.Immunol.* 1:311-316.
107. World Health Organisation. 2005. Global Tuberculosis Programme. In *Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing, WHO Report 2005*. Geneva, Switzerland.
108. Konietzko, N. and R. Loddenkemper. 1999. Tuberkulose. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York.
109. Mardigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker. 1997. Brock - Biology of Microorganisms. Pentrice Hall International, Inc. Upper Saddle River.
110. Ziehl, F. 1882. Zur Färbung des Tuberkelbazillus. *Dt.Med.Wschr.* 8:451.
111. van Soolingen, D., L. Qian, P. E. de Haas, J. T. Douglas, H. Traore, F. Portaels, H. Z. Qing, D. Enkhsaikan, P. Nymadawa, and J. D. van Embden. 1995. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J.Clin.Microbiol.* 33:3234-3238.
112. Zhang, L. X., G. Q. Kan, D. H. Tu, J. S. Li, and X. X. Liu. 1995. Trend of initial drug resistance of tubercle bacilli isolated from new patients with pulmonary tuberculosis and its correlation with the tuberculosis programme in Beijing. *Tuber.Lung Dis.* 76:100-103.
113. Hibbeler, B. 2005. Tuberkulose: Wieder auf dem Vormarsch. *Deutsches Ärzteblatt* 102:A-1024-A-1025.
114. Chan, M. Y., M. Borgdorff, C. W. Yip, P. E. de Haas, W. S. Wong, K. M. Kam, and D. van Soolingen. 2001. Seventy percent of the *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong represent the Beijing genotype. *Epidemiol.Infect.* 127:169-171.
115. Glynn, J. R., J. Whiteley, P. J. Bifani, K. Kremer, and D. van Soolingen. 2002. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg.Infect.Dis.* 8:843-849.
116. Lari, N., L. Rindi, D. Bonanni, E. Tortoli, and C. Garzelli. 2004. Beijing/W *Mycobacterium tuberculosis* in Italy. *Emerg.Infect.Dis.* 10:958-959.

117. Milan, S. J., K. A. Hauge, N. E. Kurepina, K. H. Lofy, S. V. Goldberg, M. Narita, C. M. Nolan, P. D. McElroy, B. N. Kreiswirth, and G. A. Cangelosi. 2004. Expanded geographical distribution of the N family of *Mycobacterium tuberculosis* strains within the United States. *J.Clin.Microbiol.* 42:1064-1068.
118. Flynn, J. L. and J. Chan. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu.Rev.Immunol.* 19:93-129.
119. Ernst, J. D. 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect.Immun.* 66:1277-1281.
120. Herrmann, J. L. and P. H. Lagrange. 2005. Dendritic cells and *Mycobacterium tuberculosis*: which is the Trojan horse? *Pathol.Biol.(Paris)* 53:35-40.
121. Desjardins, M., L. A. Huber, R. G. Parton, and G. Griffiths. 1994. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J.Cell Biol.* 124:677-688.
122. Russell, D. G. 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2:569-577.
123. Stein, M. and S. Gordon. 1991. Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. *Eur.J.Immunol.* 21:431-437.
124. Armstrong, J. A. and P. D. Hart. 1971. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J.Exp.Med.* 134:713-740.
125. Hart, P. D., J. A. Armstrong, C. A. Brown, and P. Draper. 1972. Ultrastructural study of the behavior of macrophages toward parasitic mycobacteria. *Infect.Immun.* 5:803-807.
126. Hart, P. D. and J. A. Armstrong. 1974. Strain virulence and the lysosomal response in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect.Immun.* 10:742-746.
127. Pieters, J. 2001. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes.Infect.* 3:249-255.
128. Brightbill, H. D., D. H. Libraty, S. R. Krutzik, R. B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, P. J. Brennan, B. R. Bloom, P. J. Godowski, and R. L. Modlin. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285:732-736.

129. Hickman, S. P., J. Chan, and P. Salgame. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *J.Immunol.* 168:4636-4642.
130. Appelberg, R. 1996. Immune response to atypical mycobacteria. *Res.Immunol.* 147:560-564.
131. Salgame, P. 2005. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr.Opin.Immunol.* 17:374-380.
132. Cooper, A. M., J. Magram, J. Ferrante, and I. M. Orme. 1997. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Exp.Med.* 186:39-45.
133. Wakeham, J. 1998. Lack of both types 1 and 2 cytokines, tissue inflammatory responses, and immune protection during pulmonary infection by *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin in IL-12-deficient mice. *J.Immunol.* 160:6101-6111.
134. Hölscher, C. 2004. The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. *Med.Microbiol.Immunol.(Berl)* 193:1-17.
135. Flynn, J. L., J. Chan, K. J. Triebold, D. K. Dalton, T. A. Stewart, and B. R. Bloom. 1993. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J.Exp.Med.* 178:2249-2254.
136. Cooper, A. M., D. K. Dalton, T. A. Stewart, J. P. Griffin, D. G. Russell, and I. M. Orme. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J.Exp.Med.* 178:2243-2247.
137. MacMicking, J., Q. W. Xie, and C. Nathan. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu.Rev.Immunol.* 15:323-350.
138. MacMicking, J. D., R. J. North, R. LaCourse, J. S. Mudgett, S. K. Shah, and C. F. Nathan. 1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:5243-5248.
139. Flynn, J. L., C. A. Scanga, K. E. Tanaka, and J. Chan. 1998. Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis. *J.Immunol.* 160:1796-1803.
140. Choi, H. S., P. R. Rai, H. W. Chu, C. Cool, and E. D. Chan. 2002. Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 166:178-186.

141. Nicholson, S., M. G. Bonecini-Almeida, Lapa e Silva JR, C. Nathan, Q. W. Xie, R. Mumford, J. R. Weidner, J. Calaycay, J. Geng, N. Boechat, C. Linhares, W. Rom, and J. L. Ho. 1996. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J.Exp.Med.* 183:2293-2302.
142. Liu, C. Y., C. H. Wang, T. C. Chen, H. C. Lin, C. T. Yu, and H. P. Kuo. 1998. Increased level of exhaled nitric oxide and up-regulation of inducible nitric oxide synthase in patients with primary lung cancer. *Br.J.Cancer* 78:534-541.
143. Cooper, A. M., J. E. Pearl, J. V. Brooks, S. Ehlers, and I. M. Orme. 2000. Expression of the nitric oxide synthase 2 gene is not essential for early control of *Mycobacterium tuberculosis* in the murine lung. *Infect.Immun.* 68:6879-6882.
144. Adams, D. O. 1976. The granulomatous inflammatory response. A review. *Am.J.Pathol.* 84:164-191.
145. Gonzalez-Juarrero, M., O. C. Turner, J. Turner, P. Marietta, J. V. Brooks, and I. M. Orme. 2001. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect.Immun.* 69:1722-1728.
146. Bean, A. G., D. R. Roach, H. Briscoe, M. P. France, H. Korner, J. D. Sedgwick, and W. J. Britton. 1999. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J.Immunol.* 162:3504-3511.
147. Roach, D. R., A. G. Bean, C. Demangel, M. P. France, H. Briscoe, and W. J. Britton. 2002. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J.Immunol.* 168:4620-4627.
148. Ferrero, E., P. Biswas, K. Vettoretto, M. Ferrarini, M. Uguccioni, L. Piali, B. E. Leone, B. Moser, C. Rugarli, and R. Pardi. 2003. Macrophages exposed to *Mycobacterium tuberculosis* release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on gammadelta cells. *Immunology* 108:365-374.
149. Nigou, J., C. Zelle-Rieser, M. Gilleron, M. Thurnher, and G. Puzo. 2001. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J.Immunol.* 166:7477-7485.

150. Geijtenbeek, T. B., S. J. van Vliet, E. A. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C. M. Vandenbroucke-Grauls, B. Appelmelk, and Y. van Kooyk. 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J.Exp.Med.* 197:7-17.
151. North, R. J. and Y. J. Jung. 2004. Immunity to tuberculosis. *Annu.Rev.Immunol.* 22:599-623.
152. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak, and B. R. Bloom. 1995. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 2:561-572.
153. Reiling, N., C. Hölscher, A. Fehrenbach, S. Kröger, C. J. Kirschning, S. Goyert, and S. Ehlers. 2002. Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Immunol.* 169:3480-3484.
154. Valway, S. E., M. P. Sanchez, T. F. Shinnick, I. Orme, T. Agerton, D. Hoy, J. S. Jones, H. Westmoreland, and I. M. Onorato. 1998. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N.Engl.J.Med.* 338:633-639.
155. Sparwasser, T., S. Gong, J. Y. Li, and G. Eberl. 2004. General method for the modification of different BAC types and the rapid generation of BAC transgenic mice. *Genesis.* 38:39-50.
156. Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J.Immunol.Methods* 223:77-92.
157. Sarmiento, A. M. and R. Appelberg. 1995. Relationship between virulence of *Mycobacterium avium* strains and induction of tumor necrosis factor alpha production in infected mice and in in vitro-cultured mouse macrophages. *Infect.Immun.* 63:3759-3764.
158. Reiling, N., K. Klug, U. Krallmann-Wenzel, R. Laves, S. Goyert, M. E. Taylor, T. K. Lindhorst, and S. Ehlers. 2001. Complex encounters at the macrophage-mycobacterium interface: studies on the role of the mannose receptor and CD14 in experimental infection models with *Mycobacterium avium*. *Immunobiology* 204:558-571.
159. Longnecker, D. S. 1966. A program for automated hematoxylin and eosin staining. *Am.J.Clin.Pathol.* 45:229.



160. Taboas, J. O. and R. J. Ceremsak. 1967. A rapid hematoxylin and eosin stain. *Tech.Bull.Regist.Med.Technol.* 37:119-120.
161. Brandt, F. A. and D. L. Lloyd. 1954. Differential staining for *M. tuberculosis* and *M. leprae*; a modification of the Ziehl-Neelsen stain. *Lab Invest* 3:296-302.
162. Cattoretti, G., M. H. Becker, G. Key, M. Duchrow, C. Schluter, J. Galle, and J. Gerdes. 1992. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J.Pathol.* 168:357-363.
163. Krenitsky, T. A., R. Papaioannou, and G. B. Elion. 1969. Human hypoxanthine phosphoribosyltransferase. I. Purification, properties, and specificity. *J.Biol.Chem.* 244:1263-1270.
164. Krenitsky, T. A. and R. Papaioannou. 1969. Human hypoxanthine phosphoribosyltransferase. II. Kinetics and chemical modification. *J.Biol.Chem.* 244:1271-1277.
165. Pöhlmann, S., J. Zhang, F. Baribaud, Z. Chen, G. J. Leslie, G. Lin, A. Granelli-Piperno, R. W. Doms, C. M. Rice, and J. A. McKeating. 2003. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J.Virol.* 77:4070-4080.
166. Kaufmann, S. H. and U. E. Schaible. 2003. A dangerous liaison between two major killers: *Mycobacterium tuberculosis* and HIV target dendritic cells through DC-SIGN. *J.Exp.Med.* 197:1-5.
167. Koppel, E. A., E. Saeland, D. J. de Coquer, Y. van Kooyk, and T. B. Geijtenbeek. 2005. DC-SIGN specifically recognizes *Streptococcus pneumoniae* serotypes 3 and 14. *Immunobiology* 210:203-210.
168. Caparros, E., D. Serrano, A. Puig-Kroger, L. Riol, F. Lasala, I. Martinez, F. Vidal-Vanaclocha, R. Delgado, J. L. Rodriguez-Fernandez, L. Rivas, A. L. Corbi, and M. Colmenares. 2005. Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. *Immunobiology* 210:185-193.
169. Maeda, N., J. Nigou, J. L. Herrmann, M. Jackson, A. Amara, P. H. Lagrange, G. Puzo, B. Gicquel, and O. Neyrolles. 2003. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J.Biol.Chem.* 278:5513-5516.

170. Geijtenbeek, T. B. and Y. van Kooyk. 2003. Pathogens target DC-SIGN to influence their fate DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity. *APMIS* 111:698-714.
171. Takahara, K., Y. Yashima, Y. Omatsu, H. Yoshida, Y. Kimura, Y. S. Kang, R. M. Steinman, C. G. Park, and K. Inaba. 2004. Functional comparison of the mouse DC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3 and Langerin C-type lectins. *Int.Immunol.* 16:819-829.
172. Reed, M. B., P. Domenech, C. Manca, H. Su, A. K. Barczak, B. N. Kreiswirth, G. Kaplan, and C. E. Barry, III. 2004. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 431:84-87.
173. Manca, C., L. Tsenova, C. E. Barry, III, A. Bergtold, S. Freeman, P. A. Haslett, J. M. Musser, V. H. Freedman, and G. Kaplan. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J.Immunol.* 162:6740-6746.
174. Schlesinger, L. S., S. R. Hull, and T. M. Kaufman. 1994. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J.Immunol.* 152:4070-4079.
175. Ehlers, M. R. and M. Daffe. 1998. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol.* 6:328-335.
176. van Kooyk, Y., B. Appelmelk, and T. B. Geijtenbeek. 2003. A fatal attraction: *Mycobacterium tuberculosis* and HIV-1 target DC-SIGN to escape immune surveillance. *Trends Mol.Med.* 9:153-159.
177. Pearl, J. E., B. Saunders, S. Ehlers, I. M. Orme, and A. M. Cooper. 2001. Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon-gamma-deficient mouse. *Cell Immunol.* 211:43-50.
178. Cooper, A. M., D. K. Dalton, T. A. Stewart, J. P. Griffin, D. G. Russell, and I. M. Orme. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J.Exp.Med.* 178:2243-2247.
179. Fenton, M. J. and M. W. Vermeulen. 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect.Immun.* 64:683-690.
180. Fenton, M. J. 1998. Macrophages and tuberculosis. *Curr.Opin.Hematol.* 5:72-78.

181. Cardona, P. J., R. Llatjos, S. Gordillo, J. Diaz, I. Ojanguren, A. Ariza, and V. Ausina. 2000. Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand.J.Immunol.* 52:156-163.
182. Ordway, D., M. Henao-Tamayo, I. M. Orme, and M. Gonzalez-Juarrero. 2005. Foamy acrophages within lung granulomas of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* express molecules characteristic of dendritic cells and antiapoptotic markers of the TNF receptor-associated factor family. *J.Immunol.* 175:3873-3881.
183. Granelli-Piperno, A., A. Pritsker, M. Pack, I. Shimeliovich, J. F. Arrighi, C. G. Park, C. Trumpfheller, V. Piguet, T. M. Moran, and R. M. Steinman. 2005. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *J.Immunol.* 175:4265-4273.

## F. Anhang

### Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Aufbau von DC-SIGN.....	3
Abb. 2 Aufbau des Makrophagen Mannose Rezeptors .....	5
Abb. 3. Expression von CD11c und MHC II auf murinen dendritischen Zellen aus C57BL/6-Mäusen.....	43
Abb. 4. Dosisabhängigkeit der Produktion von TNF- $\alpha$ und IL-12p40 nach Inkubation mit <i>M. tuberculosis</i> und LPS.....	44
Abb. 5. Zeitkinetik der Produktion von TNF- $\alpha$ und IL-12p40 nach Inkubation mit <i>M. tuberculosis</i> und LPS.....	45
Abb. 6. Expression von hDC-SIGN auf murinen dendritischen Zellen aus C57BL/6-, CD11c-DC-SIGN <sup>tg</sup> - und BAC-hDC-SIGN <sup>tg</sup> -Mäusen. ....	47
Abb. 7. Einfluss von manLAM auf die LPS-induzierte IL-12p40- sowie TNF- $\alpha$ -Produktion in murinen dendritischen Zellen.....	49
Abb. 8. Expression von IL-12p40 und TNF- $\alpha$ in murinen dendritischen Zellen nach Inkubation mit Mykobakterien. ....	51
Abb. 9. Keimlast von <i>M. tuberculosis</i> infizierten C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN <sup>tg</sup> -Mäusen. ....	54
Abb. 10. Produktion von IL-12p40 und TNF- $\alpha$ in C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN <sup>tg</sup> -Mäusen nach Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> . ....	55
Abb. 11. Histologische Untersuchungen zur Granulomentwicklung in Lungen aus <i>M. tuberculosis</i> -infizierten C57BL/6- und CD11c hDC-SIGN <sup>tg</sup> -Mäusen...	57
Abb. 12. Expression von NOS2 in C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN <sup>tg</sup> -Mäusen nach einer Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> .....	58
Abb. 13. Immunhistologische Analyse der NOS2-Expression im Lungengewebe von <i>M. tuberculosis</i> -infizierten C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN <sup>tg</sup> -Mäusen. ....	59
Abb. 14. Expression von IFN- $\gamma$ in C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN <sup>tg</sup> -Mäusen nach einer Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> .....	60
Abb. 15. Überlebensrate von C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN <sup>tg</sup> - Mäusen nach einer Infektion mit 100 KBE <i>M. tuberculosis</i> . ....	61
Abb. 16. Keimlast von C57BL/6- und hDC-SIGN <sup>tg</sup> -Mäusen nach Infektion mit 2000 KBE <i>M. tuberculosis</i> . ....	62
Abb. 17. Expression von IL-12p40 und TNF- $\alpha$ in Lungenhomogenaten aus C57BL/6- und hDC-SIGN <sup>tg</sup> Mäusen nach Infektion mit 2000 KBE <i>M. tuberculosis</i> .....	63

Abb. 18. Expression von NOS2-mRNA in C57BL/6- und hDC-SIGN <sup>tg</sup> -Mäusen nach Infektion mit 2000 KBE <i>M. tuberculosis</i> . .....	64
Abb. 19. Immunhistologische Analyse von NOS2 im Lungengewebe von <i>M. tuberculosis</i> -infizierten C57BL/6- und hDC-SIGN <sup>tg</sup> -Mäusen. ....	65
Abb. 20. Überlebensrate von hDC-SIGN <sup>tg</sup> -Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen nach Infektion mit 2000 KBE <i>M. tuberculosis</i> . ....	66
Abb. 21. Expression des Mannose-Rezeptors auf murinen Makrophagen. ....	67
Abb. 22. Zytokinproduktion in Makrophagen aus C57BL/6- und MR <sup>-/-</sup> -Mäusen. ....	68
Abb. 23. Expression des Mannose-Rezeptors auf dendritischen Zellen. ....	70
Abb. 24. Zytokinproduktion von dendritischen Zellen aus C57BL/6- und MR <sup>-/-</sup> -Mäusen bei Stimulation mit <i>M. tuberculosis</i> . ....	71
Abb. 25. Keimlast von <i>M. tuberculosis</i> infizierten C57BL/6- und MR <sup>-/-</sup> -Mäusen. ....	73
Abb. 26. Nachweis von <i>M. tuberculosis</i> -in Lungengewebe infizierter C57BL/6- und MR <sup>-/-</sup> -Mäuse. ....	74
Abb. 27. Expression von TNF- $\alpha$ und IL-12p40 in C57BL/6- und CD11c-hDC-SIGN <sup>tg</sup> -Mäusen nach Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> . ....	75
Abb. 28. Histologische Untersuchungen von Lungen aus <i>M. tuberculosis</i> -infizierten C57BL/6- und MR <sup>-/-</sup> -Mäusen. ....	77
Abb. 29. Expression von NOS2 in C57BL/6- und MR <sup>-/-</sup> -Mäusen während einer Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> . ....	77
Abb. 30. Immunhistologische Analyse des Effektormoleküls NOS2 im Lungengewebe von <i>M. tuberculosis</i> -infizierten C57BL/6- und MR <sup>-/-</sup> -Mäusen. ....	78
Abb. 31. Expression von IFN- $\gamma$ in C57BL/6- und MR <sup>-/-</sup> -Mäusen nach einer Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> . ....	79
Abb. 32. Überlebensrate von C57BL/6- und MR <sup>-/-</sup> - Mäusen nach Infektion mit 100 KBE <i>M. tuberculosis</i> . ....	79
Abb. 33. Überlebensrate von C57BL/6- und MR <sup>-/-</sup> - Mäusen nach einer Infektion mit 1000 KBE <i>M. tuberculosis</i> . ....	80

Tab. 1: Zusammenfassung der C-Typ-Lektine .....	2
Tab. 2: ELISA-Antikörper für die Zytokinanalyse im Kulturüberstand.....	20
Tab. 3: ELISA-Antikörper für die Zytokinanalyse in Seren und Homogenaten .....	20
Tab. 4: Antikörper für immunhistologische Analysen.....	20
Tab. 5: Antikörper für durchflusszytometrische Analysen.....	21
Tab. 6: Verwendete genetisch veränderte Mausstämme .....	26
Tab. 7: Primersequenzen, Fragmentgrößen und Analysetemperaturen.....	38

## Abkürzungsverzeichnis

-/-	defizient
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BAC	engl. „ <i>bacterial artificial chromosome</i> “ (100-300 kb große Fragmente genomischer DNA, die in bakteriellen Vektoren geklont wurden)
cDNA	komplementäre DNA (engl. „ <i>complementary DNA</i> “)
CFH	Kubik Fuß je Stunde
CRD	Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne (engl. „ <i>carbohydrate recognition domain</i> “)
DC	dendritische Zelle
DC-SIGN	engl. „ <i>dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin</i> “
ELISA	engl. „ <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> “
engl.	englisch
FACS	engl. „ <i>fluorescence activated cell sorting</i> “
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat
GUTC	Guanidiniumthiocyanat
HRP	engl. „ <i>Horse radish peroxidase</i> “
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KBE	Kolonie bildende Einheiten
LAM	Lipoarabinomannan
LPS	Lipopolysaccharid
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
manLAM	mannosyliertes Lipoarabinomannan
Mφ	Makrophage
MHC	engl. „ <i>major histocompatibility complex</i> “
MR	Makrophagen-Mannose-Rezeptor
mRNA	messenger RNA
PAMP	Pathogen assoziierte Moleküle (engl. „ <i>pathogen associated molecular patterns</i> “)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PRR	Muster-Erkennung-Rezeptor (engl. „ <i>pattern recognition receptor</i> “)
RCLB	Lysispuffer (engl. „ <i>red cell lysis buffer</i> “)
rh	rekombinant human
rm	rekombinant murin
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS gepufferte Salzlösung
tg.	transgen
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
z.B.	zum Beispiel



### Zusammenfassung

Bislang gibt es keine funktionellen Untersuchungen über die Rolle der C-Typ-Lektine in mykobakteriellen Infektionen. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende neue Erkenntnisse über die Bedeutung der C-Typ-Lektine DC-SIGN und Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MR) im experimentellen Tuberkulosemodell der Maus erarbeitet.

In murinen dendritischen Zellen aus CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen konnte im Gegensatz zu dendritischen Zellen aus C57BL/6-Mäusen eine LPS-induzierte IL-12p40-Antwort durch gleichzeitige Zugabe von manLAM dosisabhängig reduziert werden. Nach Infektion dendritischer Zellen aus CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen mit verschiedenen *M. tuberculosis*-Stämmen war im Gegensatz zu C57BL/6-Mäusen die Freisetzung von IL-12p40 (nicht aber TNF- $\alpha$ ) auf Proteinebene reduziert. Analysen dendritischer Zellen aus MR-defizienten Mäusen wiesen im Gegensatz zu C57BL/6-Mäusen eine signifikante Erhöhung der Produktion von IL-12p40 auf.

Unter *in vivo*-Bedingungen zeigten sich bei Niedrigdosis (100 Keime pro Maus) sowie Hochdosis (2000 Keime pro Maus) bei Infektion mit *M. tuberculosis* von C57BL/6 und CD11c-hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäusen keine Unterschiede in Keimzahl- und Granulomentwicklung, myeloider Zellaktivierung und der Produktion von Zytokinen (IL-12p40, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ). Analoge Experimente mit MR-defizienten Mäusen ergaben ebenfalls keine Unterschiede. Vergleichende Analysen der Langzeit-Überlebensrate bei Infektion mit *M. tuberculosis* zeigten im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen eine signifikant höhere Überlebensrate der hDC-SIGN<sup>tg</sup>-Mäuse. Im Gegensatz dazu verstarben die MR-defizienten Mäuse bei gleicher Infektionsdosis signifikant früher als die C57BL/6-Mäuse.

C-Type-Lektine haben daher im Tiermodell keinen Einfluss auf die frühe Phase einer Infektion mit *M. tuberculosis*, scheinen aber in der finalen Phase der Infektion bedeutsam zu sein für das Überleben der Mäuse.

---

## Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Ehlers und PD Dr. Norbert Reiling für die Überlassung dieses vielseitigen und äußerst spannenden Themas sowie für die sehr guten Arbeitsbedingungen in der Laborgruppe Molekulare Infektiologie.

Herrn Dr. Norbert Reiling möchte ich herzlichst für die intensive Betreuung dieser Arbeit danken. Seine Hilfe, dieses für mich doch sehr neue Gebiet der Biologie zu verstehen, seine stete Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt sein Sinn für Humor haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Dr. h.c. Ernst Th. Rietschel für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Forschungszentrum Borstel.

Für die Bereitstellung der human DC-SIGN transgenen Mäuse möchte ich Dr. med. Tim Sparwasser herzlich danken. Ebenso möchte ich Michel C. Nussenzweig (M.D., Ph.D., New York) für die Überlassung der MR-defizienten Mäuse danken.

Dr. Katja Brandt danke ich herzlich für die Anleitung zur Präparation von dendritischen Zellen, die wesentlich zum Bestand der Arbeit beigetragen hat.

Bei Martin Schäfer möchte ich mich bedanken für seine Bereitschaft nach Borstel zu kommen, um mich in die Tücken der Fluoreszenzmarkierung und durchflusszytometrischen Analyse einzuweisen.

Bei Svenja Kröger bedanke ich mich für die Bereitstellung der Mykobakterien und die Anleitung im Erlernen verschiedenster Methoden.

Manuela Heßman und Christine Keller gilt ein sehr besonderes Dankeschön für das Auffangen in schwierigen Situationen.

Allen Mitarbeitern der Laborgruppe Molekulare Infektiologie möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und die nette Arbeitsatmosphäre danken.

Gudrun Eick danke ich für die Durchsicht dieser Arbeit und den Versuch, in den umständlichsten Sätzen einen Sinn zu erkennen und mich mit den Feinheiten der geänderten Kommasetzung vertraut zu machen.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir alles gegeben und ermöglicht haben, um diesen Weg gehen zu können. Die Selbstverständlichkeit, mit der sie mich unterstützen, gibt mir jederzeit Sicherheit.

Bei Bastian möchte ich mich von Herzen bedanken - für alles.

---

## Präsentationen

### Abstracts

#### **The role of DC-SIGN and the Macrophage Mannose Receptor in aerosol infection with *M. tuberculosis*.**

**C. Kessner**, T. Sparwasser, S. Ehlers, N. Reiling

Joint Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies of Immunology, 21-24. September 2005, Kiel

Immunobiology 210(6-8): 425

#### **DC-SIGN-mediated immune evasion: Probing its role in conventional and BAC transgenic mouse models**

M. Schäfer, **C. Kessner**, I. Taniuchi, R. Lang, E. Wolf, G. Eberl, N. Reiling, H. Wagner, S. Ehlers, T. Sparwasser

Joint Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies of Immunology, 21-24. September 2005, Kiel

Immunobiology 210(6-8): 575

### Vorträge

#### **The role of DC-SIGN and the Macrophage Mannose Receptor in *M. tuberculosis*-infection**

**C. Kessner**, T. Sparwasser, S. Ehlers, N. Reiling

28. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen, 18. November 2005, Borstel

---

## Lebenslauf

Cornelia Keßner  
Diplom Biologin  
geboren am 30.05.1978 in Erfurt

### Schulausbildung

1984-86 Polytechnische Oberschule 55, Erfurt  
1986-91 Polytechnische Oberschule 58, Erfurt  
1991-96 Buchenberg-Gymnasium, Erfurt  
August 1996 Allgemeine Hochschulreife

### Universitäts-Ausbildung

Okt. 1996 - Nov. 2002 Christian-Albrechts-Universität Kiel  
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät  
Biologie-Studium (Diplom)

April 1999 DIPLOM-VORPRÜFUNG in den Fächern  
Zoologie, Botanik, Mathematik und Chemie

April 2001 DIPLOM-HAUPTPRÜFUNG in den Fächern  
Fischereibiologie, Zoologie und Meereschemie

Mai 2001 - Juni 2002 DIPLOMARBEIT: „Fischereibiologische Bedeutung der  
Parasitierung von Fischen im Seegebiet von Marokko“  
INSTITUT FÜR MEERESKUNDE  
Abteilung Fischereibiologie  
Prof. Dr. D. Schnack

Oktober 2002 Abschluss des Studiums als Diplom-Biologin

### Promotionsarbeit

Jan. 2003 - Jan. 2006 „Die Rolle der C-Typ-Lektine DC-SIGN und  
Makrophagen-Mannose-Rezeptor in der  
experimentellen Tuberkulose“  
FORSCHUNGSZENTRUM BORSTEL  
Leibnitz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften  
Abteilung Immunchemie und Biochemische  
Mikrobiologie  
Prof. Dr. Dr. h.c. E. Th. Rietschel

---

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Diese Arbeit wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat darüber hinaus noch nicht zu Prüfungszwecken gedient.

Lübeck, Dezember 2005