

**Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Zentrumsdirektor: Prof. Dr. Stefan Ehlers**

**Programmbereich Infektionen
Direktor: Prof. Dr. Ulrich E. Schaible**

Bildgebungs-basierte Analyse der Schutzwirkung eines neuen Impfstoffs gegen die Tuberkulose

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Natalja Redinger
aus Osch, Kirgisien
Lübeck 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich E. Schaible

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Tamás Laskay

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.04.2015

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

A	Abkürzungsverzeichnis.....	3
1	Einleitung.....	1
1.1	Tuberkulose	1
1.1.1	Krankheit, Epidemiologie	1
1.1.2	Der Erreger der Tuberkulose	2
1.1.3	Der Infektionsverlauf der Tuberkulose	3
1.2	Impfstoffentwicklung gegen TB	14
1.2.1	Unzureichender Impfschutz des BCG Impfstoffes.....	14
1.2.2	Neue Impfstoffansätze gegen TB	15
1.2.3	H56-CAF01 Impfstoff.....	18
1.2.4	Der Impfstoffträger CAF01	19
1.3	Optische Bildgebung.....	21
1.3.1	Fluoreszierende Nanopartikel	24
2	Zielsetzung.....	26
3	Material und Methoden	27
3.1	Materialien	27
3.1.1	Chemikalien.....	27
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	29
3.1.3	Puffer, Lösungen und Medien	30
3.1.4	Antikörper	32
3.1.5	Fluoreszenz- und Biolumineszenzreporter.....	32
3.1.6	Mausstämme.....	33
3.1.7	Geräte.....	33
3.1.8	Software	34
3.2	Methoden	36
3.2.1	Bakterienanzucht	36
3.2.2	Infektion von Versuchstieren	36
3.2.3	Bestimmung der Keimlast in Lungen- und Milzhomogenaten	36
3.2.4	Aufbereitung von Organen für die Herstellung von Kryopräparaten.....	37
3.2.5	Histologische Färbungen	37
3.2.5.1	Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung.....	37
3.2.5.2	Immunfluoreszenz-Färbung	38
3.2.5.3	Färbung von Mykobakterien.....	38
3.2.6	IVIS Bildgebung.....	38
3.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
3.2.8	Western-Blot (Elektrophoretischer Proteintransfer)	40
3.2.9	Immunfärbung von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen	40
3.2.10	Herstellung von Enzelsuspensionen aus den trachealen und inguinalen Lymphknoten	41
3.2.11	Durchflusszytometrie zur phänotypischen Analyse von Immunzellen	41
3.2.12	QDot-Ova-Konjugation.....	42
3.2.13	Kultivieren und Passagieren von RAW 264.7-Zellen	42
3.2.14	Bestimmung der Zellzahl	43
3.2.15	Einfrieren und Auftauen von Zellen	43
3.2.16	Statistik.....	43
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Identifikation optimaler <i>M. tuberculosis</i> Reporterstämme für die bildgebende Darstellung	45
4.1.1	Nutzbarkeit von <i>M. tuberculosis</i> Reporterstämmen in immundefizienten Mäusen für die Bildgebung im lebenden Tier	46
4.1.2	Nutzbarkeit der <i>M. tuberculosis</i> Reporterstämme für die Bildgebung in immunkompetenten Mäusen	48
4.1.3	Nutzbarkeit von <i>M. tuberculosis</i> FFlucRT in immunkompetenten Mäusen.....	52

II Inhaltsverzeichnis

4.2 Analyse der Schutzwirkung des Impfstoffs H56-CAF01 nach subkutaner und intranasaler Impfstoffverabreichung im Mausmodell der Tuberkulose	55
4.2.1 Analyse der Schutzwirkung von H56-CAF01 als Prime-Impfstoff.....	55
4.2.2 Analyse der Schutzimpfung des Impfstoffs H56-CAF01 im Mausmodell der Tuberkulose nach Grundimmunisierung mit BCG	59
4.3 Zeitliche und räumliche Verteilung des Impfstoffträgers CAF01	65
4.3.1 Herstellung und Analyse des fluoreszierenden CAF01.....	65
4.3.2 Verteilung des fluoreszenzmarkierten Impfstoffträgers CAF01 in der Maus nach intranasaler Applikation	68
4.3.3 Verteilung des mit fluoreszenzmarkierten Impfstoffträgers CAF01 in der Maus nach subkutaner Applikation	74
4.4 Verteilung von fluoreszenzmarkierten Impfstoffen in der Maus	79
4.4.1 Herstellung und Analyse des fluoreszierenden CAF01.....	79
4.5 Myeloide Zellen in drainierenden Lymphknoten nach der Impfung mit QDot-Ova-CAF01.....	87
4.5.1 Analyse impfstofftragender APZ in Abhängigkeit vom Applikationsweg	89
5 Diskussion	95
5.1 Anwendungsbereiche und Reporter in der optischen Bildgebung	96
5.2 Das rekombinante Spaltvakzin H56-CAF01 zeigt eine schützende Wirkung nach der intranasalen Verabreichung	103
5.3 Verteilung von Impfstoffen im Mausekörper.....	108
5.4 Antigenaufnahme durch myeloide Zellen nach Impfung.....	112
5.5 Ausblick	114
5.6 Zusammenfassung.....	115
6 Abstract.....	117
7 Literaturverzeichnis.....	119
B Tabellenverzeichnis	VII
C Abbildungsverzeichnis.....	VII
Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	XI
Lebenslauf.....
Danksagung	XV

A Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A. dest	<i>Aqua destillata</i>
Abb.	Abbildung
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BM-DZ	<i>Bone-Marrow-derived Dendritic Cell</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
ca.	circa
CAF01	<i>Cationic Adjuvant Formulation 01</i>
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol</i> , Dilactat
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-Integrin</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
DZ	Dendritische Zelle
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISPOT	<i>Enzyme Linked Immuno Spot Assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
Fc	<i>Crystallisable Fragment</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt3	<i>Fms-like tytosine kinase 3</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
i. LK	inguinaler Lymphknoten
i.n.	intranasal
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

4 Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleukin
IVIS	<i>In Vivo Imaging System</i>
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Mol
min	Minute
MDR	<i>Multidrug-resistant tuberculosis</i>
MHC	<i>Major Histo Compatibility Complex</i>
ml	Milliliter
NK	natürliche Killerzelle
NKT	natürliche T-Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
NLR	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain Receptors</i>
OADC	<i>Oleic Albumin Dextrose Catalase</i>
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
Ova	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pDZ	plasmazytoide Dendritische Zelle
PFA	Paraformaldehyd
PMN	polymorphonuclear neutrophil leucocytes
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
QDot	Quantum Dot
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
sog.	sogenannt
sp.	<i>species</i>
SSC	<i>side scatter</i>
ssp.	<i>subspecies</i>
Tab.	Tabelle
TB	Tuberkulose

TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris Buffered Saline</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TPBS	Tween-PBS
tr. LK	trachealer Lymphknoten
Treg	regulatorischer T-Lymphozyt
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
TZR	T-Zell Rezeptor
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
vol.	<i>volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
WTA	Wasser/Tween/A. dest
XDR	<i>Extensively drug-resistant tuberculosis</i>
xg	Mehrfaches der Gravitation

1 Einleitung

1.1 Tuberkulose

1.1.1 Krankheit, Epidemiologie

Die Tuberkulose (TB) ist weltweit eine der bedrohlichsten Infektionskrankheiten des Menschen. Sie wird durch Bakterien der Spezies *Mycobacterium (M.) tuberculosis* ausgelöst und befällt vor allem die Lungen. Die Lungentuberkulose ist die häufigste und epidemiologisch am weitesten verbreitete Form der humanen TB. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist ungefähr ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem Erreger infiziert. Diese Personen gelten als latente Träger des Tuberkuloseerregers, ca. 10 % dieser Menschen entwickeln im Laufe ihres Lebens eine aktive Tuberkulose. Im Jahre 2012 erkrankten weltweit 8,7 Millionen Menschen an der Tuberkulose und ca. 1,4 Millionen starben an dieser Erkrankung [1]. 80% der TB Fälle kommen hauptsächlich in den Schwellen- und Entwicklungsländern vor. Die Infektionsrate ist in diesen Ländern aufgrund von Armut, Mangelernährung und schlechter oder fehlender medizinischer Infrastruktur besonders hoch. Außerdem erhöhen Koinfektionen mit dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV) das Risiko einer Tuberkuloseerkrankung enorm [2]. Die Therapie ist mit 6-9 Monaten langwierig und erfordert die regelmäßige Einnahme von 2-3 Wirkstoffen gleichzeitig. Die Zahl der verfügbaren Wirkstoffe gegen TB-Erreger ist jedoch begrenzt. Neben den sechs hauptsächlich eingesetzten „first line“ Medikamenten Isoniazid, Rifampizin, Pyrazinamid, Ethambutol, Moxifloxacin und Streptomycin versucht man durch Makrolidantibiotika und Gyrasehemmer neue Wirkstoffe in die Klinik zu bringen [3]. Falsche oder unzureichende Behandlung aufgrund wirtschaftlicher Engpässe, schlechter medizinischer Infrastruktur und fehlender Bereitschaft oder Erreichbarkeit erkrankter Personen führt zu einem Anstieg von multiresistenten (MDR) und sogar extrem resistenten (XDR) Stämmen des Erregers, gegen die es zurzeit kaum alternative Wirkstoffe gibt. Die Verbreitung dieser resistenten Stämme wird zusätzlich durch zunehmende Mobilität der Bevölkerungen ermöglicht und stellt ein weltweit zunehmendes Gesundheitsproblem dar. Die Zunahme der TB-Fälle und die wachsende Zahl resistenter Bakterienstämme erfordern die Entwicklung neuer und besserer Wirkstoffe, aber auch wirksamerer Impfstoffe zur Prophylaxe der Infektion. Die Entwicklung neuer wirkungsvoller Impfstoffe ist daher für ein weltweites, dauerhaftes Zurückdrängen dieser gefährlichen Bakterieninfektion unverzichtbar.

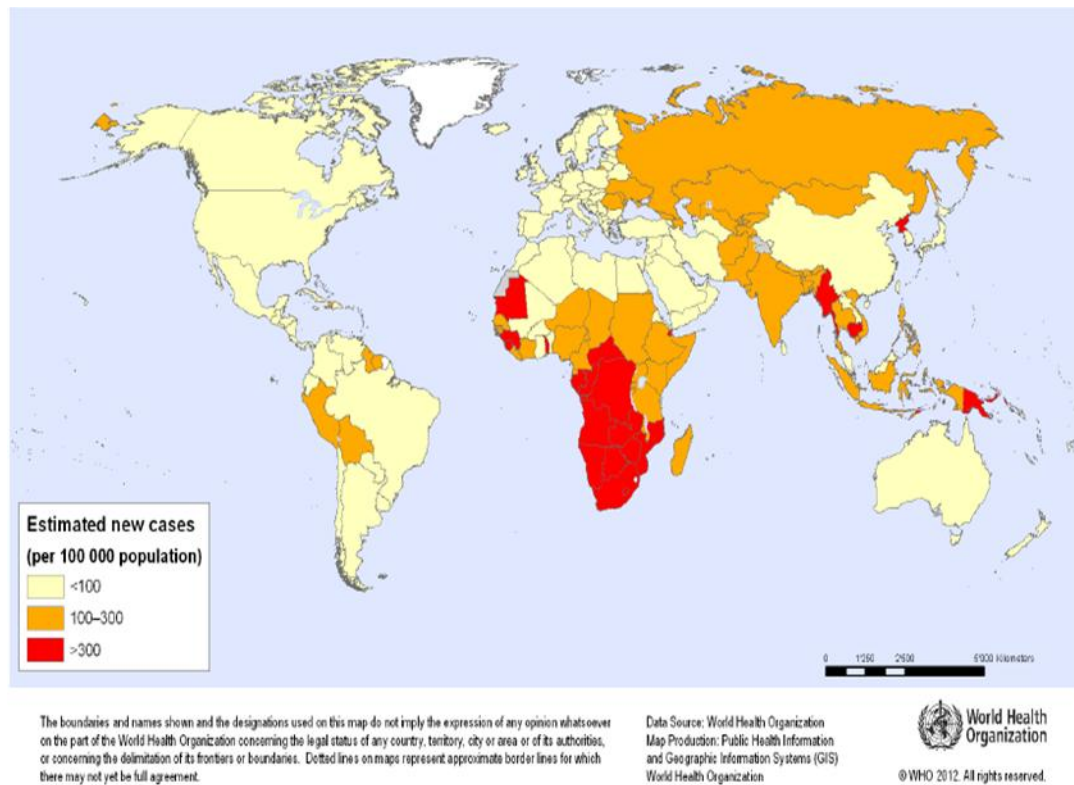


Abbildung 1.1: Geschätzte Inzidenzraten der Tuberkulose 2010 weltweit (Quelle: WHO Report 2012).

1.1.2 Der Erreger der Tuberkulose

Der Erreger der Tuberkulose *M. tuberculosis* gehört zur Bakterienfamilie der *Mycobacteriaceae* und dort dem Genus *Mycobacterium* an [4]. Der Genus *Mycobacterium* umfasst zahlreiche Arten, wobei die Erreger der klassischen Tuberkulose aufgrund genetischer und biochemischer Gemeinsamkeiten zum *M. tuberculosis*-Komplex zusammengefasst werden. Zu diesem zählen *M. tuberculosis* und Subspezies wie *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* und *M. canetti*.

Mykobakterien sind ca. 0,4 µm breite und 3-4 µm lange, aerob wachsende, stäbchenförmige, unbewegliche Bakterien. Sie besitzen eine lipidreiche, säurefeste Zellwand, d.h. mit Karbofuchsin angefärbte Bakterien lassen sich nicht mehr durch sauren (HCl) Alkohol entfärben. Diese Eigenschaft wird für diagnostische Zwecke ausgenutzt, da sie für Mykobakterien und verwandte Arten spezifisch ist. Die Generationszeit von *M. tuberculosis* beträgt 16-36 Stunden. Aufgrund dieses langsamen Wachstums ist die Tuberkulose eine langsam fortschreitende Erkrankung.

1.1.3 Der Infektionsverlauf der Tuberkulose

Induktion der Immunantwort und rezeptorvermittelte Phagozytose.

Die Lungentuberkulose wird durch Tröpfcheninfektion übertragen. Mit dem Atemstrom gelangen die vor allem beim Husten, aber auch beim Niesen oder Sprechen einer erkrankten Person ausgestoßenen Mykobakterien-haltigen Aerosole in die Bronchien und Alveolen. Dort treffen sie zuerst auf Zellen des angeborenen Immunsystems, alveoläre Makrophagen und dendritische Zellen (DZ), die auf dem Lungenepithel der Alveolen patrouillieren. Diese Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) sind in der Lage die Erreger aufzunehmen und zu drainierenden Lymphknoten zu transportieren, um die spezifische Immunantwort einzuleiten [5]. Eine effiziente Immunabwehr gegen *M. tuberculosis* ist von der schnellen Erkennung des Pathogens durch das angeborene System und der Aktivierung des adaptiven Systems abhängig. Die Erkennung der Pathogene erfolgt über phylogenetisch hoch konservierte Mustererkennungsezeptoren, sog. PRR (*Pattern Recognition Receptors*). Diese Rezeptoren erkennen bestimmte Pathogen-assoziierte Strukturen (PAMP, *Pathogen Associated Molecular Patterns*). Durch die Aktivierung von PRR werden unterschiedliche Signaltransduktionsprozesse in Gang gesetzt, die für die Antigenaufnahme, Produktion von Zytokinen und Abwehrstoffen der Wirtszellen zuständig sind. Toll-like Rezeptoren (TLR, *Toll-like Receptors*) und C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLR, *C-Typ Lectin Receptors*) sind zwei Hauptgruppen der Mustererkennungsrezeptoren, die auf der Plasmamembran der APZ vorkommen und die Phagozytose von Pathogenen induzieren. Für die Erkennung von *M. tuberculosis* spielen TLR2, und TLR9 eine wichtige Rolle [6-11]. Mit Hilfe TLR2 werden mykobakterielle Lipoproteine, z.B. das 19 kDa Lipoprotein bzw. STF (*Soluble Tuberculosis Factor*, hat Ähnlichkeit mit dem 19 kDa Lipoprotein). TLR9 interagiert mit CpG (Cytosin-Guanin-Dinukleotiden) der mykobakteriellen DNA. Durch die Bindung von PAMPs an diese Rezeptoren werden in der Interaktion mit dem myeloiden Differenzierungsprotein (MyD88) intrazelluläre Signalmechanismen zur Produktion von IL-12 induziert [12]. Somit besitzen die TLR eine wichtige Rolle bei der Initiation einer Immunantwort gegen Mykobakterien und stellen eine direkte Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr dar. Makrophagen erkennen durch weitere Rezeptoren wirtseigene opsonisierende Moleküle, die zuvor auf der Oberfläche der Mykobakterien gebunden haben, z.B. Surfactant-Proteine, Komplement-Bestandteile und spezifische Antikörper (insbesondere IgG) [7, 13-16].

Die Wahl des Rezeptors für die Phagozytose beeinflusst die intrazelluläre Aktivierung. Fc-Rezeptor-vermittelte Aufnahme von IgG-opsonierten Mykobakterien aktiviert die antimikrobiellen Abwehrsysteme der Makrophagen [17]. Durch die Aufnahme über den Komplementrezeptor 3 (CR3) wird das schnellere Einschleusen der Erreger in die Wirtszelle ermöglicht, ohne antimikrobielle Effektoren auszulösen [18]. Die Interaktion von *M. tuberculosis* und Makrophagen wird vom

4 Einleitung

mykobakteriellen Zellwandbestandteil Cholesterol begünstigt. Außerdem trägt es zum Einbau des tryptophanaspartathaltigen Hüllproteins (TACO, *Tryptophan-Aspartate-Containing Coat Protein*) in die Phagosomenmembran bei, das seinerseits die Reifung zum Phagolysosom verhindert [19]. CLR, wie z.B. der Mannoserezeptor und DZ-spezifisches intrazelluläres Adhäsionsmolekül DC-SIGN (DC (*Dendritic Cell*)-spezifisches ICAM3-greifendes Non-integrin, CD209) spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Phagozytose von Mykobakterien durch Antigen-präsentierende Zellen [20, 21]. Als Liganden für diese Rezeptoren fungieren u.a. Lipoarabinomannan (LAM) und Phosphatidylinositolmannoside [22, 23]. Die C-Typ-Lektin-Rezeptoren Mincle (*Macrophage inducible Ca²⁺-dependent (C-type) Lectin*) und MCL (*Macrophage C-type Lectin*) sind Rezeptoren für das mykobakterielle Zellwandlipid TDM (*Cord Factor-Trehalose 6;6'-Dimycolate*) sowie sein synthetisches Analogon TDB (*Trehalose 6,6'-Dibehenate*), das in dieser Studie als Adjuvant-Bestandteil des Impfstoffträgers benutzt wird. TDM-Mincle/MCL Interaktion aktiviert die APZ über die Syk-Card9 Signalkaskade [24, 25].

NOD-like Rezeptoren (NLR, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain Receptors*) sind ebenfalls bei der Erkennung von *M. tuberculosis* beteiligt [26]. NOD2 ist ein Mitglied einer zytosolischen NLR-Familie und erkennt Zellwandbestandteile (Muramyl-Dipeptide) von Mykobakterien. Die induzierten Signalkaskaden münden in der Aktivierung von NF κ B und der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , IL-12 und IL-1 β [27].

Nach der Phagozytose von Bakterien kommt es normalerweise zur Fusion von Phagosomen mit intrazellulären Lysosomen. Durch die Einwirkung von im Lysosom vorkommenden Hydrolasen und anderen anti-mikrobiellen Effektormolekülen, wie z.B. sauren Phosphatasen, Cathepsinen, Lysozymen, β -Glucuronidasen, β -Galaktosidasen, Arylsulphatasen, sauren Ribonukleasen und Phospholipasen werden Bakterien abgetötet und abgebaut [28-30]. Das Wachstum von Mykobakterien wird in den aktivierten Makrophagen zusätzlich durch Autophagie, toxische Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen und antibakterielle Peptide gehemmt [31]. Mykobakterien sind jedoch in der Lage, diesen Prozess zu umgehen und intrazelluläre Transportsysteme der Makrophagen zu ihren Gunsten zu manipulieren. So schaffen sie es in nichtaktivierten Makrophagen die Reifung des Phagosoms und die Fusion mit Lysosomen zu verhindern und so im Phagosom zu überleben und sich zu vermehren [5].

In der frühen Infektion mit *M. tuberculosis* bieten die Makrophagen einen gewissen Widerstand. Es kann aber auch zum vermehrten, exponentiellen Wachstum der Bakterien im Makrophagen kommen. Das führt zum Tod der Wirtszelle und zur Freilassung der Bakterien [32]. Außerdem werden apoptotische Vesikel abgeschnürt, die durch neu eingewanderte Makrophagen und DZ aufgenommen werden [33, 34]. DZ spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der adaptiven

Immunität. Nach der Aufnahme von Pathogenen bzw. deren Antigene im peripheren Gewebe wandern DZ in die regionalen Lymphknoten. Dort werden die prozessierten Antigene mithilfe von Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) Molekülen der Klasse I oder II entsprechend den CD8⁺ und CD4⁺ Lymphozyten, sowie mittels CD1 (*Cluster of Differentiation*) a, b und c Molekülen und kostimulatorischer Moleküle CD80 und CD86, präsentiert [23, 35, 36]. Die gleichzeitige Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IL-18 durch DZ und Makrophagen führt zur Ausbildung einer T_H1-polarisierten Antwort [37]. Im nächsten Schritt exprimieren T-Zellen im Zuge der Differenzierung bestimmte Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche, verlassen den Lymphknoten und wandern über den Blutstrom entlang eines Chemokingradienten zum Infektionsort. Die Einwanderung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in das infizierte Gewebe wird über Adhäsionsmoleküle der Endothelzellen, wie ICAM (*Intercellular Adhesion Molecule*)-1 und VLA (*Very Late Activation Antigen*)-4 auf der Zelloberfläche der T-Zellen ermöglicht [34]. Das IFN- γ , das von T-Zellen und NK (Natürliche Killerzellen)-Zellen produziert wird, begünstigt die Rekrutierung von weiteren Immunzellen in das infizierte Gewebe, da hierdurch die Expression dieser Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen und die Migration weiterer Immunzellen verstärkt wird [34, 38].

Die Rolle der T-Zellen in der Tuberkulose

CD4⁺ T-Helfer-Zellen

CD4⁺ T_H-Zellen sind für die Immunabwehr von Infektionskrankheiten wie TB unabdingbar. Zahlreiche Tierexperimente und HIV-Infektionen beim Menschen unterstreichen eine zentrale Rolle der CD4⁺ T_H-Zellen als Schutzvermittler in mykobakteriellen Infektionen. Gleichzeitig sind sie für die Pathologie der TB in den Lungenläsionen verantwortlich [39]. Die Rolle von CD4⁺ T_H-Zellen ist bei der Entwicklung der antimikrobiellen Effektormechanismen am besten untersucht. Nach deren Aktivierung im infizierten Lungengewebe produzieren sie infolge einer Wechselwirkung mit Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) IFN- γ , das gemeinsam mit TNF- α die Makrophagen aktiviert und so die Abtötung intrazellulärer Mykobakterien einleitet [40].

T_H17-Zellen

Neben den CD4⁺ T_H1-Zellen tragen auch die CD4⁺ T_H17-Zellen zur antimikrobiellen Immunität gegen *M. tuberculosis* bei [41]. Diese Zellen produzieren IL-17A, IL-17F, in vielen Fällen IL-22 und TNF- α . Die exakten Mechanismen der Aktivierung der T_H17-Zellen sind im Vergleich zu T_H1-Zellen noch nicht genau erforscht. Einige Studien zeigen, dass die Aktivierung von T_H17-Zellen durch IL-1 β , IL-6 und TGF- β (*Transforming Growth Factor-beta*), die von Phagozyten produziert werden, erfolgt. Andere

Studien heben die Bedeutung von IL-22 bei der Aktivierung und Expansion der T_H17-Zellen bzw. der Generierung von T_H17-Gedächtniszellen hervor [42-44]. Studien von Cooper und Khader *et al.* zeigen eine wichtige Rolle von T_H17-Zellen für die Entwicklung der Schutzmechanismen gegen *M. tuberculosis* [35]. T_H17-Zellen entwickeln ihre Wirkung in der frühen Phase der Ausbildung der adaptiven Immunität gegen *M. tuberculosis*. Außerdem sind die T_H17-Zellen an der Ausbildung der Lungengranuloma nach Infektion mit Mykobakterien beteiligt [45, 46]. Ihre Rolle bei der chronischen und latenten Infektion ist weniger bekannt. Studien von Cruz *et al.* und Torrado *et al.* zeigen eine schädliche Rolle von T_H17-Zellen in Tieren, die zuerst mit *M. tuberculosis* infiziert und anschließend mit Tuberkulose-Impfstoff BCG immunisiert wurden. Hier war eine erhöhte Pathologie infolge der IL-17-MIP (*anti-macrophage inflammatory protein*)-2-abhängigen Einwanderung von Neutrophilen festzustellen [45, 47]. Studien von Okamoto und Torrado zeigen, dass IL-17 nicht nur von T_H17-Zellen produziert wird, sondern auch von $\gamma\delta$ -T-Zellen, T-Zellen, die als Rezeptor (TZR) anstatt der $\alpha\beta$ -Ketten ein $\gamma\delta$ -Heterodimer als TZR exprimieren [41, 45].

CD8⁺ T-Zellen

Die weiteren Zellen, die bei der Entwicklung einer zellulären Immunantwort gegen *M. tuberculosis* eine Rolle spielen, sind die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. Die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen erfolgt durch die Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle. Die Bedingung dafür ist der zytoplasmatische Antigen-Prozessierungsweg, der überwiegend für virale Infektionen beschrieben ist [33]. Wie mykobakterielle Antigene ins Zytosol gelangen, ist noch nicht hinreichend untersucht. Zum einen können sie durch die Membranporen des mykobakterienhaltigen Phagolysosoms ins Zytosol gelangen [33, 48]. Zum anderen können durch DZ nach der Aufnahme und Prozessierung von abgeschnürten apoptotischen Vesikeln der absterbenden infizierten Makrophagen die Antigene durch MHC-Klasse-I-Moleküle an CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden („*cross priming*“) [34, 49]. Nach Erkennung dieser Antigen-MHC-Klasse-I-Molekül-Komplexe entwickeln CD8⁺ T-Zellen durch die Sekretion von Perforin, Granzym und Granulysin ihr zytotoxisches Potential. Perforin bildet in den Zielzellen Poren aus, wodurch Granzyme und Granulysin in die Zellen gelangen. Durch Granzyme wird der programmierte Zelltod, die Apoptose, ausgelöst. Granulysin dagegen kann zur Zerstörung intrazellulärer Erreger, wie z.B. *M. tuberculosis* führen [34, 50, 51]. Da CD8⁺ T-Zellen ebenfalls IFN- γ bilden, sind auch diese Zellen in der Lage Makrophagen zu aktivieren, die ihrerseits Effektorfunktionen ausüben, die zum Abtöten intrazellulärer Pathogene beitragen [52].

Neben der spezifischen Abwehr von Pathogenen ist die gegenseitige Regulation eine wesentliche Eigenschaft von T_H1- und T_H2-Zellen. Durch die Sekretion von IFN- γ sind die T_H1-Zellen in der Lage die T_H2-Zellproliferation zu hemmen. Die vermehrte Produktion von IL-4 und IL-6 durch T_H2-Zellen inhibiert hingegen die Generierung von T_H1-Zellen [53].

$\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen

Neben der Aktivierung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, die meistens über einen $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor ($\alpha\beta$ -TZR) verfügen, sind auch $\gamma\delta$ -TZR-exprimierende Zellen vor allem in der frühen Phase der Immunantwort gegen TB relevant [54, 55]. Beim Menschen erkennen $V\gamma9\delta2$ -T-Zellen mit hoher Affinität Phospholiganden, wie z.B. Isopentenylpyrophosphat. Diese T-Zellen kommen in Primaten, jedoch nicht in der Maus vor [56].

CD1-restringierte T-Zellen

Neben $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen werden auch unkonventionelle T-Zellen wie z.B. CD1-restringierte T-Zellen aktiviert. CD1-Moleküle, die auf der Oberfläche von DZ exprimiert werden, stellen ein weiteres Antigenpräsentationssystem dar [57, 58]. Sie sind mit MHC-Klasse I-Molekülen verwandt, werden jedoch in einer anderen Genregion kodiert (Chromosom 1) und sind hochkonserviert. Im Unterschied zum MHC-Klasse I-Molekül verfügt CD1-Molekül über eine viel engere und hydrophobere Bindungstasche für ihre Liganden. Im Menschen vorkommende Isoformen der CD1-Moleküle lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Gruppe-I-CD1-Moleküle (CD1a, b und c, sie fehlen bei Mäusen und Ratten, sind aber auch in Meerschweinchen vorhanden) und Gruppe-II-CD1-Moleküle (CD1d). Gruppe-I-CD1-Moleküle werden auf professionellen APZ exprimiert und durch die Zytokine GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) und IL-4 induziert. Diese Moleküle präsentieren mykobakterielle Lipide und Glykolipide. Gruppe-II-CD1-Moleküle werden vor allem von DZ exprimiert. Gruppe-II-CD1-restringierte T-Zellen, die sog. NKT-Zellen, stehen zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort und sind wenn, dann in der frühen mykobakteriellen Infektion von Bedeutung. Sie verfügen über ein eingeschränktes TZR-Repertoire und werden deshalb rasch über Gruppe-II-CD1-Moleküle aktiviert und produzieren sowohl IFN- γ , als auch IL-4 [59]. Sie können auch regulatorische Funktionen für die nachfolgende Aktivierung konventioneller T-Zellen übernehmen.

Regulatorische T-Zellen

Weitere T-Zellen, die die protektiven Mechanismen gegen *M. tuberculosis* beeinflussen, sind die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Zu diesen gehören natürliche $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T_{reg} , die eine breite Wirkung haben, und Antigen-spezifische $CD4^+$ T_{reg} [60, 61]. Erst kürzlich wurden $CD8^+$ T_{reg} identifiziert, die in der humanen Immunität eine Rolle zu spielen scheinen [62, 63]. T_{reg} besitzen verschiedene inhibitorische Funktionen [64-67]. Zum einen sind sie in der Lage, die Wirkung von $CD4^+$ T_H -Zellen durch die Sekretion von IL-10 und CCL 4 bzw. durch die Expression von Membran-gebundenem TGF- β zu beeinträchtigen. Zum anderen können sie die Aktivierung von APZ hemmen und somit insgesamt TH^+ Zell-Antworten negativ beeinflussen [68]. Darüber hinaus sind sie in der Lage die Einwanderung von $CD4^+$ T-Zellen in die drainierenden Lymphknoten bzw. ihre Proliferation zu verhindern, das

wiederum hat einen negativen Einfluss auf die Ausbildung einer Schutzwirkung gegen *M. tuberculosis*. Gleichzeitig verhindern sie eine verstärkte Immunpathologie [69].

B-Zellen

Neben den T-Zellen tragen auch B-Zellen zur Entwicklung der protektiven Wirkung gegen *M. tuberculosis* bei [70, 71]. In Maus- und Primaten-Tuberkulosemodellen wurde gezeigt, dass B-Zellen an der Granulombildung beteiligt sind [72, 73]. In B-Zell-defizienten Mäusen wurde eine erhöhte Suszeptibilität im Vergleich zu den parentalen C57BL/6 Wildtyp-Mäusen gezeigt [74]. Dabei wurde eine erhöhte Bakterienzahl und Mortalität der B-Zell-defizienten Tiere beobachtet. In den Lungen dieser Tiere wurde eine erhöhte IL-10 Expression sowie eine Infiltration von Neutrophilen mit einer einhergehenden Entzündung festgestellt [75, 76]. Die Rolle von B-Zellen bei der Entwicklung von Schutzmechanismen nach einer Impfung aufgrund der Produktion Mykobakterien-spezifischer Antikörper, mit deren Hilfe antimikrobische Funktionen der Effektorzellen (Makrophagen und DZ) unterstützt werden, ist denkbar. Die Mitwirkung von B-Zellen in der TB-Infektion und Ausbildung der Schutzmechanismen gegen TB ist derzeit noch unzureichend untersucht. Antigenspezifische Gedächtniszellen - T- und B-Zellen - stellen das immunologische Kompartiment, das durch eine Impfung gebildet werden soll, dar.

Die Rolle der Zytokine in der Tuberkulose.

Die Entwicklung einer funktionellen T_H1 Antwort führt durch die Sekretion von IFN- γ gemeinsam mit dem mikrobiellen Stimulus, wie *M. tuberculosis*, zur klassischen Aktivierung von Makrophagen. Dadurch werden die Zellmorphologie und das sekretorische Profil von Makrophagen geändert [77]. Es werden proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 und TNF- α sezerniert. TNF- α und IFN- γ wirken synergistisch in der Aktivierung der Makrophagen, toxische Sauerstoff- und Stickstoff-Metabolite zu bilden, die die intrazellulären Mykobakterien angreifen [78, 79]. TNF- α reguliert darüber hinaus die Expression von Chemokinrezeptoren und Chemokinen, wie z.B. MIP1- α , MIP1- β , MCP-1 und RANTES, die maßgeblich an der Rekrutierung von Immunzellen aus dem Blut zum Ort der lokalen Infektion in der Lunge beteiligt sind [80]. Neben den Makrophagen produzieren auch die DZ IL-12 und IL-18. Diese sind die entscheidenden Zytokine, die bei der Immunaktivierung die Richtung hin zu einer T_H1 -Antwort, d.h. der verstärkten Produktion von IFN- γ durch aktivierte T-Zellen und einer verminderten Produktion der T_H2 -Zytokine IL-4 und IL-10 bestimmen [12, 23]. Weitere Zytokine, wie TNF- α , TGF- β und Lymphotoxin α_3 (LT α_3) werden ebenfalls gebildet und spielen eine Rolle bei der Granulombildung [38, 81].

Die Ausbildung einer T_H2 -Immunantwort führt durch die Sekretion von IL-4, IL-10 und IL-13 alternativ zur Aktivierung von Makrophagen. So führt die Ausschüttung von IL-10 zur Differenzierung eines suppressiven Makrophagenphänotyps, welcher durch die Herunterregulierung von MHC-Klasse-II

und kostimulatorischen Molekülen charakterisiert ist [77, 82, 83]. Makrophagen dieses Typs sind nicht in der Lage, antimikrobielle Effektorfunktionen auszuüben, und wirken durch die verringerte Expression von MHC-Klasse-II Molekülen und die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine, vor allem durch Arginase, suppressiv auf andere Immunzellen [77].

Granulom

Das Granulom ist zum einen ein Zeichen des Immunschutzes und der Abkapselung der Erreger, zum anderen aber ein Ort der Persistenz für die Mykobakterien. Im Fall, dass die Erreger nicht vollständig eliminiert werden, wird eine granulomatöse Reaktion am Ort der Infektion ausgelöst, die vom spezifischen Immunsystem vermittelt wird und charakteristisch aufgebaut ist (Granulom = Tuberkel, anatomische Beschreibung kleiner Knötchen, Abb. 1.2).

Wenn das Immungleichgewicht im Granulom außer Kontrolle gerät, kann dies zu Immunpathologie und Gewebszerstörung und zusammen mit dem ungehemmten Wachstum von Mykobakterien in der Folge zur Öffnung der Herde in den Atemraum und so zur Übertragung der Erreger durch Aushusten führen. Mit *M. tuberculosis* beladene DZ wandern in die regionalen Lymphknoten und aktivieren spezifische T-Zellen, die wiederum zum Infektionsort rezirkulieren. Dort sezernieren sie eine Reihe von Zytokinen vom Typ T_H1 . Diese stimulieren die APZ, den Erreger abzutöten, oder aktivieren zytotoxische T-Zellen, den Erreger zu eliminieren. Bei der Ausbildung der Immunantwort kommt es zur Sekretion von Chemokinen und Zytokinen, die eine Rekrutierung weiterer Immunzellen aus den peripheren Blutgefäßen in das infizierte Gewebe einleiten [23, 84]. Zusätzlich verstärkt die Sekretion von $TNF-\alpha$ die Wirkung von Chemokinen. $TNF-\alpha$ stimuliert lokale Entzündungsreaktionen in der Lunge. So kommt es infolge einer Gefäßerweiterung und durch vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen zur Einwanderung von Makrophagen und Lymphozyten in die infizierten Regionen der Lunge. Somit ist $TNF-\alpha$ maßgeblich an der Entstehung der Granulome beteiligt [32, 85]. Die eingewanderten Zellen bilden zusammen mit Alveolarmakrophagen die erste zelluläre Akkumulation, die von T-Zellen gesäumt wird. Infizierte Makrophagen differenzieren sich dabei in verschiedene Formen, wie Epitheloidzellen oder vielkernige Langhans-Zellen aus. Ein typisches Merkmal eines Granuloms ist die Ausbildung eines nekrotischen Zentrums, das abgetötete Makrophagen, fusionierte lipidhaltige („foamy“) Makrophagen, Zelltrümmer und Mykobakterien bzw. mit Mykobakterien infizierte Zellen enthält. $TNF-\alpha$ und $LT-\alpha_3$ sind für die äußere Abkapselung des Granuloms notwendig [86, 87]. Eine weitere Wirkung von $TNF-\alpha$ ist die Induktion einer Nekrose, welche zur Gewebsschädigung führt. Andererseits kann es in Abwesenheit von $TNF-\alpha$ (z.B. bei anti- $TNF-\alpha$ behandelten Patienten mit rheumatoider Arthritis) zum Aufbrechen von Granulomen und der Reaktivierung einer latenten Tuberkulose kommen [88, 89]. In TNF -defizienten Mäusen blieb die Ausbildung von Granulomen aus und es kam zu einer Disseminierung von Bakterien. Wenn diese

Balance, die durch das Zusammenwirken verschiedener Immunzellen gehalten wird, gestört wird, können sich die Erreger stark vermehren und das Granulom brechen. Durch Anschluss des Granuloms an das Bronchialsystem wird der Patient offen tuberkulös. Mykobakterien sind dann im Sputum nachweisbar. Durch die Arrosion von Blutgefäßen können die Mykobakterien in weitere Bereiche des Körpers gestreut werden [90].

Tiermodelle sind für die Erforschung der grundsätzlichen Mechanismen bei der TB unerlässlich. Das Immunsystem der Maus ist zwar relativ gut erforscht, doch unterscheidet sich das murine Granulom deutlich vom menschlichen Granulom. Das Meerschweinchenmodell ist dem Menschen ähnlicher, leider ist sein Immunsystem nicht so gut untersucht, da die entsprechenden Werkzeuge wie spezifische Antikörper gegen wichtige Immunmoleküle und transgene bzw. Knockout-Tiere nicht zur Verfügung stehen. Außerdem ist die Haltung von Meerschweinchen im Vergleich zu den Mäusen um einiges teurer. Das Primatenmodell käme am ehesten für TB-Studien in Frage. Aus ethischen und finanziellen Gründen ist dieses Modell jedoch nur für ausgewählte Experimente einsetzbar [90].

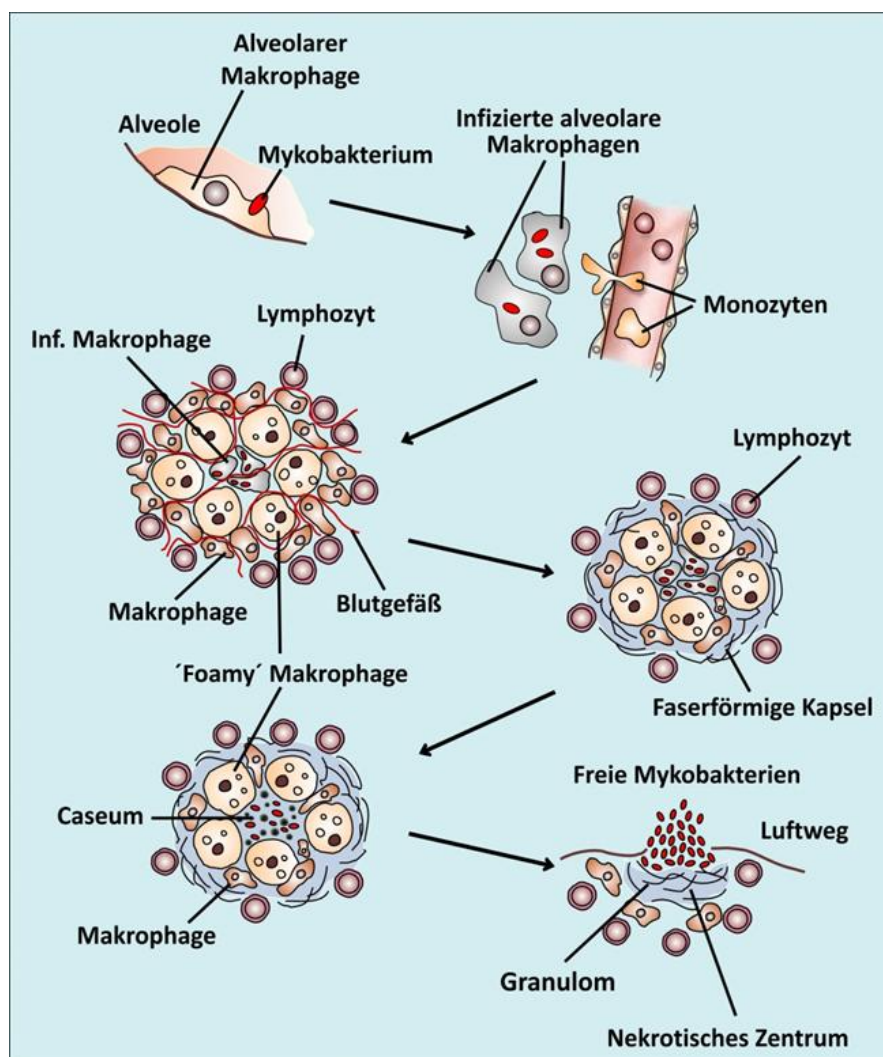


Abbildung 1.2: Granulomausbildung und - Nekrose (modifiziert nach [91]).

Beschreibung s. Text, Seiten 9, 10.

Persistenz, Reaktivierung und Reinfektion

Das Immunsystem ist oft in der Lage die Erreger in Schach zu halten. Durch diese effiziente Immunantwort werden die Stoffwechselaktivität und die Replikationsrate des Erregers stark reduziert. Dieser Zustand wird Dormanz genannt. Klinisch wird dieser Zustand als inapparent bezeichnet, d.h. es finden sich keine diagnostischen Zeichen einer Erkrankung. Die Lunge enthält aber lebende, persistierende *M. tuberculosis*. Der Wirt befindet sich in einem Zustand, der als Latenz bezeichnet wird.

Eine aktive Tuberkulose kann auf zwei Weisen entstehen: durch endogene Reaktivierung und/oder exogene Reinfektion. Die exogene Reinfektion bei bestehender persistenter mykobakterieller Infektion zeigt eindrücklich, dass ein möglicher neuer Impfstoff das Immunsystem besser aktivieren muss als die natürliche Infektion mit dem Erreger selbst, um den Ausbruch der Erkrankung sicher zu verhindern [92].

IFN- γ als Korrelat einer schützenden Immunantwort

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass IFN- γ und CD4⁺ T-Zellen die wichtigsten Schlüsselkomponenten bei der Ausbildung der Immunantwort gegen *M. tuberculosis* sind und somit zur Etablierung der zentralen IFN- γ Theorie beitragen. In vielen anderen Studien (Maus und Mensch) wurde dagegen gezeigt, dass die Produktion von IFN- γ durch CD4⁺ T-Zellen für die schützende Wirkung gegen *M. tuberculosis* unzureichend ist [93, 94]. Eine weitere Studie zeigte, dass durch transgene, für das mykobakterielle Antigen ESAT-6 (6 kDa *Early Secretory Antigenic Target*) spezifische CD4⁺ T-Zellen, eine Schutzwirkung gegen *M. tuberculosis* erreicht wurde, obwohl sie unfähig waren, IFN- γ zu produzieren. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Ausbildung einer Schutzwirkung mithilfe von IFN- γ -null Gedächtniszellen (IFN- γ -0 *memory cells*) im Vergleich zu Wildtyp Gedächtniszellen kaum beeinträchtigt war. Diese Befunde legen nahe, dass neben den T_H1-Zell-Funktionen weitere Mechanismen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Immunschutzes gegen *M. tuberculosis* spielen können [95]. Dazu sollen die Prozesse in der inflammatorischen Umgebung, in der IFN- γ produziert wird, bei der Schutzausbildung gegen *M. tuberculosis* berücksichtigt werden, wie z.B. das Gleichgewicht zwischen IFN- γ und anti-entzündlichen Zytokinen, wie IL-10 und anderen T_H2 Zytokinen, die die Etablierung der mykobakteriellen Infektion begünstigen können [96]. In einigen humanen Studien zu HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) und MSMD (*Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease*, eine genetisch bedingte, erhöhte Anfälligkeit für Infektionen durch opportunistische, niedrig virulente Mykobakterien) wurde gezeigt, dass T-Zellen und die Produktion von IFN- γ für die Immunität gegen *M. tuberculosis* zwar wichtig sind, aber unzureichend sind, um die aktive TB zu verhindern. Es wurde gezeigt, dass im ersten Jahr nach der

HIV-Infektion, das Risiko eine TB zu entwickeln, sehr hoch ist, obwohl die Zahl der CD4⁺ T-Zellen nicht stark verringert ist [97]. Zwei weitere Studien zeigten, dass die Progression zu AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*), die durch eine beträchtliche Verminderung der Zahl der CD4⁺ T-Zellen charakterisiert ist, nicht mit der Entwicklung von aktiver TB korreliert [98, 99]. So können die Veränderungen in der Wirkung von T-Helfer-Zellen sowie andere noch ungeklärte Mechanismen bei der HIV-Infektion eine Rolle bei der Empfindlichkeit gegen TB spielen, die nicht mit der reduzierten Zahl der CD4⁺ T-Zellen zusammenhängt. Weiterhin wurde beschrieben, dass bei mehr als 300 Fällen von MSMD nur in vier Fällen eine Infektion mit *M. tuberculosis* vorlag, in restlichen Fällen aber waren die Infektionen durch BCG- bzw. mit NTM (*Nontuberculous Mycobacterium*) Spezies verursacht. Diese Daten könnten die Hypothese unterstützen, dass IFN- γ eine größere Rolle bei Infektionen mit BCG und NTM spielt. So zeigen diese wenigen Fälle, dass Menschen, die keine eindeutigen Defekte in T-Zellen aufweisen und in der IFN- γ Produktion nicht gehindert sind, trotzdem in der Lage sind, eine aktive TB zu entwickeln. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Patienten mit höheren IFN- γ Titern eher eine TB entwickelten, als Patienten mit niedrigeren IFN- γ Werten. Diese Daten führen zu einer Abweichung vom IFN- γ -Dogma und unterstützen mehr die Idee, dass IFN- γ Mengen eher mit der bakteriellen Last in Verbindung gebracht werden können als mit dem Schutz gegen *M. tuberculosis*.

Die Annahme, dass IFN- γ nicht ausreichend für die Kontrolle der mykobakteriellen Infektion ist, wird von weiteren Untersuchungen im murinen Modell unterstützt. So konnte in mehreren Knockout-Modellen (TNF- α , GM-CSF, IL-1 und IL-6) gezeigt werden, dass die Mäuse genau so schnell starben, wie IFN- γ -defiziente Mäuse, obwohl diese Mäuse zur Produktion von IFN- γ fähig waren. Somit wurde gezeigt, dass neben IFN- γ weitere Immunmechanismen für den Schutz gegen TB essentiell sind. Weitere Studien haben herausgefunden, dass IFN- γ die Vermehrung von *M. tuberculosis* in Mausmakrophagen hemmt [81]. Stickstoffmonoxid (NO) kann *M. tuberculosis* in murinen Makrophagen töten. In humanen Makrophagen reichte die Wirkung von IFN- γ nicht aus, um das Wachstum von Mykobakterien zu verhindern [100, 101]. Die Rolle von NO in mykobakteriellen Infektionen ist derzeit umstritten [102, 103] und wird weiter diskutiert. Diese Beobachtungen zeigen die Notwendigkeit, die Suche nach weiteren potentiellen immunologischen Mechanismen, die für den Schutz gegen *M. tuberculosis* relevant sind, voranzutreiben und die IFN- γ Theorie zu erweitern.

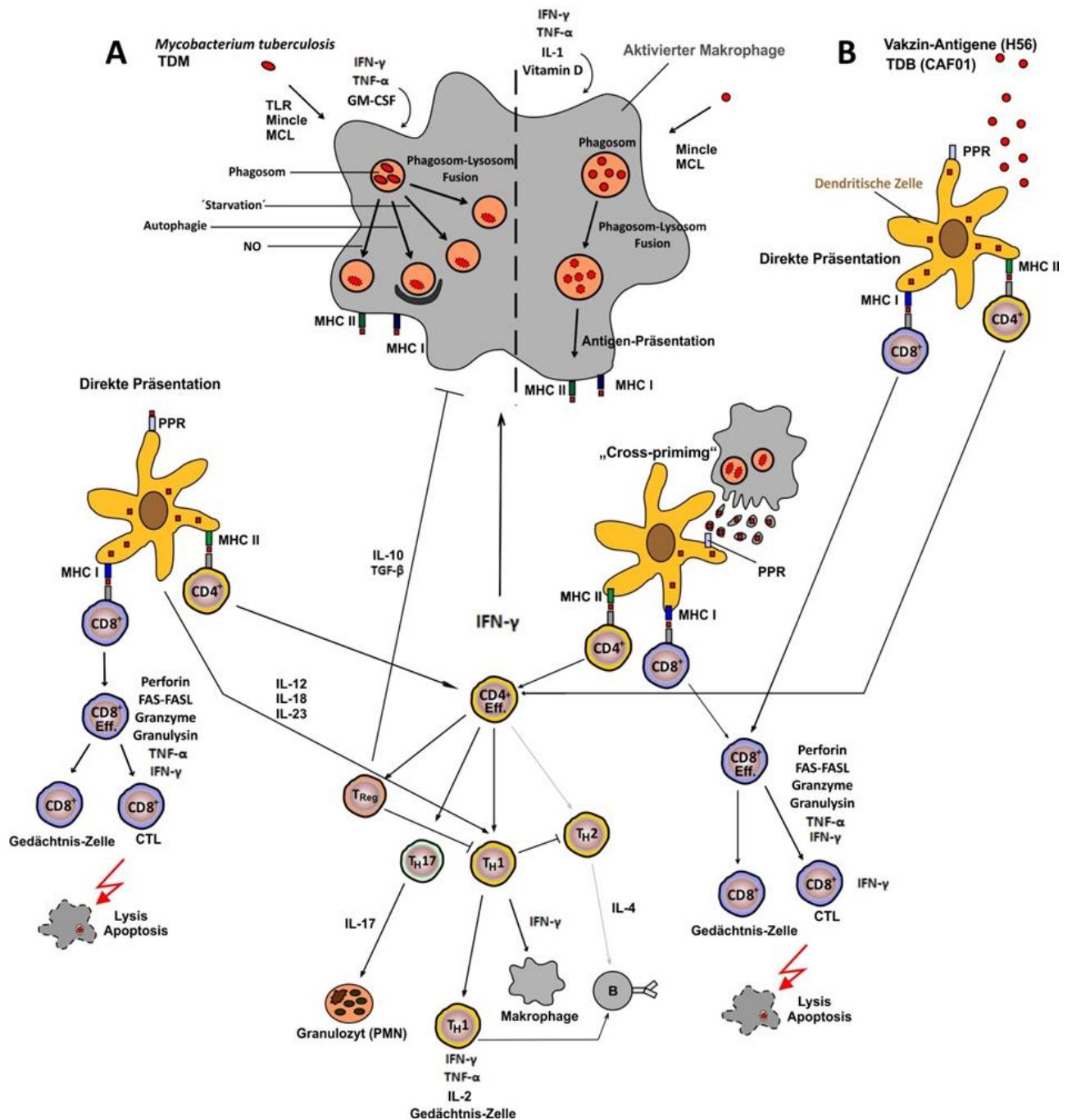


Abbildung 1.3: Schematischer Vergleich der Immunantwort gegen *M. tuberculosis* und der hypothetischen Immunantwort gegen das Adjuvans-assoziierte Spaltvakzin H56-CAF01 gegen TB.

Diese Abbildung stellt die durch *M. tuberculosis* (A) bzw. H56-CAF01 (B) induzierte Immunantworten dar. Nach Inhalieren in die Lungen werden die Erreger/Antigen-Adjuvans-Komplexe von den Makrophagen bzw. dendritischen Zellen aufgenommen. Während der Phagozytose werden über verschiedene PRR Signale an die Phagozyten vermittelt: TLR, Mincle und MCL. Das mykobakterielle Zellwandlipid TDM bindet ebenso an Mincle und MCL wie auch sein synthetisches Analogon und Adjuvans-Bestandteil TDB. Dabei werden unterschiedliche Immunprozesse induziert. Nach der Aufnahme von APZ werden die aufgenommenen Antigene prozessiert und mittels MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle entsprechenden CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen präsentiert. Diese frühen Interaktionen führen zur Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Effektormolekülen.

TDM: *Cord factor -trehalose 6;6'-dimycolate*. TDB: *Trehalose 6;6'-dibehenate*. Mincle (*Macrophage inducible Ca²⁺-dependent (C-type) Lectin*) und MCL (*Macrophage C-type Lectin*) sind C-Typ Lektin Rezeptoren für TDM und TDB.

1.2 Impfstoffentwicklung gegen TB

1.2.1 Unzureichender Impfschutz des BCG Impfstoffes

Derzeit gibt es keinen wirksamen Impfschutz gegen die Lungentuberkulose des erwachsenen Menschen. Der bisher einzige verfügbare Impfstoff gegen die Tuberkulose ist der attenuierte Lebendimpfstoff *M. bovis* Bacille Calmette-Guerin (BCG), entstanden aus dem Erreger der Rindertuberkulose *M. bovis*. Er wurde von den französischen Wissenschaftlern Albert Calmette und Camille Guérin 1908 durch Langzeitkultivierung der *M. bovis* Keime entwickelt [104, 105].

Die BCG-Impfung wurde weltweit seit mehr als 70 Jahren bei über 3 Milliarden Menschen eingesetzt. Dieser Impfstoff schützt verlässlich gegen die schwere tuberkulöse Hirnhautentzündung des Kleinkindes, jedoch ist der Schutz gegen die weitaus gängige Form, die Lungentuberkulose des Erwachsenen, gering und schwankt je nach Bevölkerung und geographischer Lage erheblich [106-110]. Mögliche Ursachen dafür sind:

- genetische Variabilität der geimpften Personen
- Alter des Menschen bei der Impfung
- immunologische Kreuzreaktivität zwischen BCG und diversen harmlosen Mykobakterien, die in Boden und Wasser vorkommen und keine Erkrankung auslösen
- Bestehen einer latenten *M. tuberculosis* Infektion (keine weitere Erhöhung der Immunität)

BCG unterscheidet sich von *M. tuberculosis* und von anderen Mykobakterien durch das Fehlen bestimmter immunogener Antigene, die für eine protektive Wirkung als wichtig erachtet werden. Sie könnten durch die Attenuierung von *M. bovis* verlorengegangen sein. Untersuchungen zu den deletierten Bereichen im BCG-Genom der klinischen *M. tuberculosis* Isolate sowie des Laborstamm H37Rv bekräftigen diese Annahme [111, 112]. Der Vergleich der Genome von *M. tuberculosis* H37Rv und verschiedenen BCG-Stämmen zeigte, dass 129 ORF (*Open Reading Frames*) aus 16 Genombereichen bei fast allen BCG-Stämmen fehlten [112]. Darüber hinaus sind mangelhafte Kontrollmechanismen bei der Genexpression während der Infektion und der intrazellulären Persistenz, wodurch mögliche protektive Antigene im BCG negativ reguliert werden könnten, könnten den unzureichenden Schutz von BCG erklären [111].

Auf der immunologischen Ebene besteht eine Hauptschwäche von BCG in der ungenügenden Induktion von CD8⁺ T-Zellen, wie Studien in CD8⁺ T-zelldefizienten Mäusen zeigen. Dabei reichten die CD4⁺ T-Zellen zur Kontrolle von BCG aus, während für die Kontrolle von *M. tuberculosis* CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erforderlich waren, wenn auch erst in einer späteren Phase der Infektion [113, 114].

1.2.2 Neue Impfstoffansätze gegen TB

In letzter Zeit wurden verschiedene Bemühungen in der Vakzinforschung unternommen, um einen im Vergleich zu BCG wirksameren Impfstoff gegen Tuberkulose zu entwickeln. Die Schutzwirkung von 12 Impfstoffen gegen TB wird derzeit in klinischen Studien untersucht (Tab. 1, Übersichtsliteratur [92, 115, 131]). Die Vakzinkandidaten kann man in drei Hauptgruppen unterteilen. Zu der ersten gehören rekombinante BCG ((r)BCG) sowie lebende abgeschwächte *M. tuberculosis*. Zu der zweiten werden rekombinante Viruspartikel gezählt. Die dritte Gruppe bilden Spaltvakzine, die aus Protein und Adjuvans bestehen.

Die Erwartungen, die man mit einem effektiven Vakzin verbindet, sind vielfältig. Ein wirksamer Wirkstoff sollte im Idealfall:

- einen langanhaltenden Schutz bieten,
- einen Schutz gegen hoch virulente *M. tuberculosis* Stämme, wie *M. tuberculosis* Beijing Stamm sowie gegen MDR, XDR und TDR *M. tuberculosis* Stämme bieten.
- sicherer und immunogener als BCG sein,
- geringe Produktionskosten haben.

Das wichtigste Ziel eines wirksamen Vakzins ist es, die pandemische Verbreitung von TB einzudämmen. Einige Vakzine sollten präventiv in der latenten Tuberkulose wirken, d.h. eine Entwicklung einer aktiven TB verhindern.

Die vollständige Entschlüsselung der Genomsequenz des Laborstamms *M. tuberculosis* H37Rv, BCG und anderer Isolate, ebenso wie deren Proteome, ermöglicht eine effektivere Suche nach neuen potentiell protektiven Antigenen [111, 112]. Dazu werden die exprimierten Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese und darauffolgender Massenspektrometrie detektiert und differenziert [116]. Darüber hinaus können differentiell exprimierte Gene von *M. tuberculosis* und BCG anhand von vergleichenden RT-PCR Analysen nachgewiesen werden [117]. Anschließend werden die ausgewählten Antigene mittels Vakzinierung auf ihre Schutzwirkung in verschiedenen TB-Tiermodellen sowie im Menschen getestet:

- Modelle der pulmonalen TB in der Maus und im Meerschweinchen
- Ein nicht-humanes Primaten-TB-Modell, das die TB-Erkrankung beim Menschen am ehesten nachahmt [121].
- T-Zell-Stimulationen durch rekombinant hergestellte Proteine bei Tuberkulin-positiven und –negativen Probanden.

Für das nicht sezernierte Hitzeschockprotein Hsp65 von *M. tuberculosis*, das sezernierte Protein Ag85A und das membranassoziierte Lipoprotein PstS3 (*Periplasmic Phosphate-binding Lipoprotein*) konnte eine protektive Wirkung in der Maus nach DNA-Vakzinierung nachgewiesen werden [118-120]. Bei diesen Analysen konnte jedoch kein besserer Schutz im Vergleich zu BCG erzielt werden.

In letzter Zeit wurden gentechnologische, auf einer homologen Rekombination und Transposon-Mutagenese bei *M. tuberculosis* beruhende Methoden entwickelt, die eine zufällige oder gezielte Abschwächung der mykobakteriellen Virulenz hervorrufen. So wurden nicht überlebensfähige *M. tuberculosis* Derivate mit definierten Gendefekten hergestellt [122-124]. Derzeit liegen zu diesen attenuierten *M. tuberculosis* Impfstoffen keine Daten zur Schutzwirkung im Tiermodell vor.

Durch genetische Rekombination kann der BCG Impfstoff weiter abgeschwächt werden. Somit könnte die Anwendung dieses Impfstoffes bei immungeschwächten Menschen möglich werden [125]. Durch gleichzeitige Expression von IL-2 oder IFN- γ in rekombinanten BCG-Stämmen können die immunstimulatorischen Eigenschaften dieser Zytokine genutzt werden, um die Immunantwort gegen TB zu verstärken [126]. Weiterhin wurden rekombinante BCG-Stämme konstruiert, die ein biologisch aktives Listeriolysin sezernieren. Der Virulenzfaktor Listeriolysin ermöglicht als porenbildendes Hämolysin das Entweichen der Bakterien aus dem Phagosom ins Zytoplasma des Makrophagen und kann so die Verfügbarkeit vom mykobakteriellen Antigen für den zytoplasmatischen MHC-Klasse-I-abhängigen Präsentationsweg verbessern und damit die schützende Wirkung dieser BCG-Vakzine gegen TB erhöhen [127]. Dieses rekombinante Vakzin hat eine gute Schutzwirkung im TB-Mausmodell. Daten zum Schutz im Menschen liegen noch nicht vor.

Mutmaßliche protektive mykobakterielle Antigene können in bakteriellen bzw. viralen Trägersystemen exprimiert und somit als Impfstoffe genutzt werden. Attenuierte *Salmonella typhimurium* Bakterien und Vacciniaviren als heterologe Antigen-träger für das Ag85B-Protein, ein 19kDa sowie ein 38kDa Lipoprotein wurden bereits konstruiert [128, 129].

Die Mehrheit der Impfstoffe gegen TB, die zurzeit in klinischen Studien untersucht werden, ist eher für den prophylaktischen Einsatz ausgelegt. Sie basieren auf Antigenen, die hauptsächlich in der frühen Phase der Tuberkuloseinfektion produziert werden, wie z. B. Ag85A, Ag85B und ESAT-6. Im Allgemeinen werden zwei Typen von TB-Impfstoffen benötigt: ein Impfstoff zum Schutz der Personen, die keinen Kontakt mit *M. tuberculosis* hatten (Prime-Impfstoff) und einer für die Personen, die bereits mit dem Erreger infiziert sind (therapeutischer Impfstoff). Die Hauptaufgabe des Prime-Impfstoffes ist, eine Infektion vorzubeugen. Der Erreger soll nach dem Eintreten in die Atemwege des Menschen so schnell wie möglich erkannt und bekämpft werden (Infektionsprävention). Daher eignen sich Antigene, die in der frühen Phase der Tuberkuloseinfektion in großen Mengen produziert werden, am besten als Bestandteile solcher präventiven Impfstoffe.

Die Erkennung solcher Antigene soll das Immunsystem möglichst schnell dazu bringen, den Erreger zu eliminieren, bevor er sich in den Alveolarmakrophagen stabil einnistet. Die Aufgabe therapeutischer Impfstoffe ist es, Immunzellen zu induzieren, die persistierende dormante Keime, deren Stoffwechsel reduziert ist, aufspüren und eliminieren können (Infektionstherapie). Hierzu muss das Immunsystem mit hoher Sensitivität somatische und sezernierte Proteine erkennen und unterscheiden, die in kleinen Mengen produziert werden. Außerdem sollte der Impfstoff dazu beitragen, unter Umständen die Granulome in der Lunge aufzulösen [70]. Das Ziel der TB-Impfstoffentwicklung ist im Idealfall, einen Impfstoff herzustellen, der bessere Schutzmechanismen als die natürliche Immunität des Wirtes aufweist und eine sterile Eradikation der Keime bewerkstelligen kann [130].

Tabelle 1.1: Neue Impfstoffkandidaten derzeit in klinischen Studien

Impfstofftyp	Kandidat	Beschreibung	Klinische Phase
Rekombinantes BCG / pre exposure Prime Impfstoff (Rekombinant)	VPM 1002	rBCG:Listeriolysin und Urease Deletion	2a
	rBCG30	rBCG: Überexpression von Ag85B	1, abgeschlossen
	Aeras-422	rBCG Expression von Perfringolysin, Ag85A, 85B, Rv3407	1, wird aufgrund unvorteilhafter Nebenwirkungen nicht weiter untersucht
Virale Vektoren pre-exposure Boost-Impfstoff	Oxford MVA85A/Aeras-485	Modified vaccinia Ankara(MVA): Expression von Ag85	2b, keine schützende Wirkung in Kleinkindern
	Crucell Ad35/Aeras-402	Replication-deficient adenovirus 35: Expression von Ag85A, Ag85B, TB10.4	2b
	AdAg85A	Replication-deficient adenovirus 5: Expression von Ag85A	1
Rekombinante Proteine in verschiedenen Adjuvantien (Subunit)	Hybrid 1 + IC31	Ag85B und ESAT6 im Adjuvans IC31	1, abgeschlossen
	Hybrid 56 + IC31	Ag85B, ESAT6 und Rv2660c im Adjuvant IC31	1
	Hybrid 1 + CAF01	Ag85B und ESAT6 im Adjuvans CAF01	1
	M72 + AS01 od. AS02	Rv1196 und Rv0125 im Adjuvans AS01 od. AS02	2a
	Aeras-404: HyVac4 + IC31	Ag85B und TB10.4 im Adjuvans IC31	1
Ganze, modifizierte Bakterien für therapeutische Impfung	RUTI	Modifizierte, abgeschwächte <i>M. tuberculosis</i> in Liposomen	2a
	<i>M. vaccae</i>	Abgeschwächte <i>M. vaccae</i>	3, abgeschlossen
	<i>M. smegmatis</i>	Inaktivierte <i>M. smegmatis</i>	1
	MIP (<i>M.indus pranii</i>)	Abgeschwächte saprophytische <i>M. indus pranii</i>	3

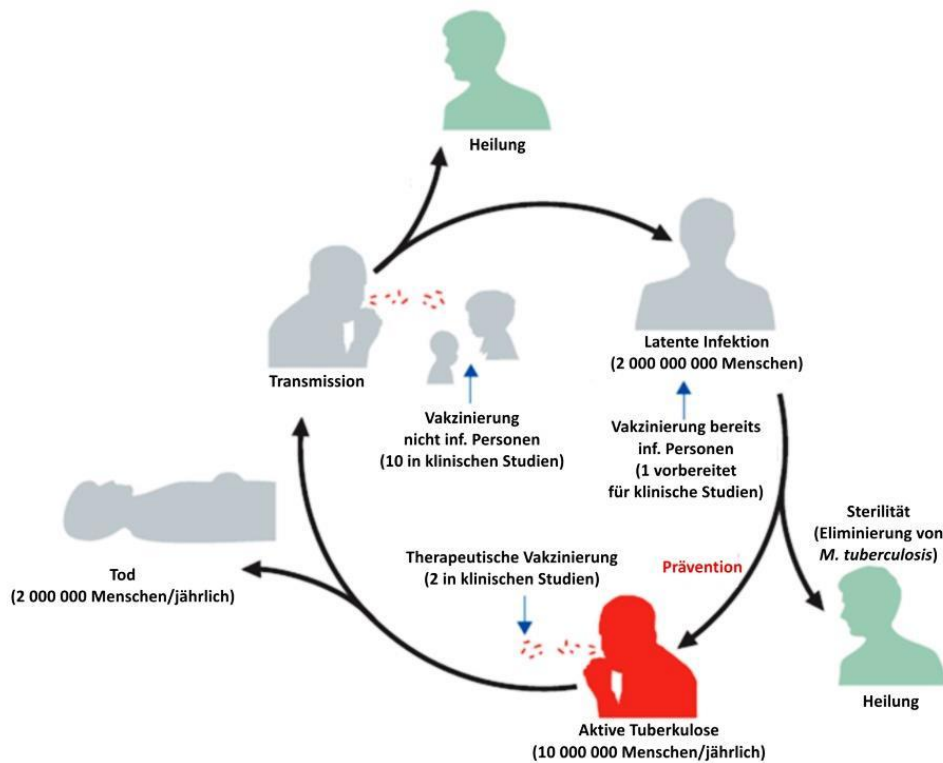


Abbildung 1.4: Vakzinierungsstrategien gegen TB.

Das Ziel der Vakzine, die sich derzeit in klinischen Studien befinden ist, eine aktive TB vorzubeugen, wobei zukünftige Impfstoffe eine *M. tuberculosis* Infektion verhindern bzw. eine vollständige Eradikation der Erreger bewirken sollten [92].

1.2.3 H56-CAF01 Impfstoff

In dieser Arbeit sollte im Rahmen einer Kooperation mit dem Statens Serum Institut (Kopenhagen, Dänemark) das neu entwickelte rekombinante Spaltvakzin H56 in einem Mausmodell der Tuberkulose auf seine Schutzwirkung mittels Bildgebung getestet werden. Dieses Vakzin besteht aus dem Proteinkomplex Ag85B-ESAT-6-Rv2660c. Ag85B und ESAT6 sind sekretorische mykobakterielle Schutzproteine, die in der frühen Phase der *M. tuberculosis* Infektion vermehrt exprimiert werden. Ag85 wird von *M. tuberculosis* sowie von BCG exprimiert und eignet sich deshalb sehr gut als Boost-Antigen, um die Schutzwirkung von BCG zu verstärken. ESAT-6 kommt dagegen nur in *M. tuberculosis* vor und kann daher nicht wirkungsvoll zur Verstärkung des BCG-Impfeffekts eingesetzt werden. Die Wirkung des mykobakteriellen Proteins Rv2660c, das auch in BCG vorkommt, ist noch nicht ausreichend erforscht. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Protein in der latenten Infektion vermehrt exprimiert wird [132, 133]. Nach der Re-Stimulation von CD4⁺ T-Zellen zeigte Rv2660c im Vergleich zu einzelnen Komponenten von H56, Ag85 und ESAT6 die schwächste IFN- γ -Antwort. Das beweist, dass Rv2660c eine unzureichende Immunogenität besitzt, jedoch in Kombination mit Ag85 und ESAT6 eine schützende Wirkung erzeugen kann. Dieser Effekt könnte an seinem kleinen

molekularen Gewicht liegen. Als Trägervesikel (Adjuvans) dienen positiv geladene Liposomen (CAF01, cationic adjuvant formulations) [134] (s. 1.2.4). H56-CAF01 befindet sich derzeit in der klinischen Phase 1.

H56-CAF01 zeigt eine signifikante schützende und langanhaltende Wirkung [133] und verhindert eine Reaktivierung der latenten Tuberkulose in murinen TB-Modellen [133]. Zudem wurde eine protektive Wirkung von H56-CAF01 in einem nicht-humanen Primaten-TB Modell festgestellt [135]. Dieses Vakzin soll deutliche Vorteile gegenüber dem derzeit effektivsten, wenn auch verbesserungswürdigen, Impfstoff BCG aufweisen und vor allem Schutzwirkung bei latent infizierten Personen induzieren. Im Vergleich zu BCG führte die Impfung mit H56-CAF01 zur Differenzierung und Vermehrung von multifunktionellen T-Zellen [136, 137].

1.2.4 Der Impfstoffträger CAF01

Zur Verstärkung der Immunantwort von H56 wurde der vom Statens Serum Institut (Kopenhagen, Dänemark) Impfstoffträger CAF01 (cationic adjuvant formulation 01) entwickelt [138]. Bei diesem Adjuvans handelt es sich um positiv geladene Liposomen, die aus synthetischen amphiphilen *Dimethyldioctadecylammonium* (DDA)- und *Trehalose 6;6'-dibehenate* (TDB)-Molekülen zusammengesetzt sind (Gewichtsverhältnis 5:1). TDB ist ein synthetisches Analog des mykobakteriellen Cord Faktors - *Trehalose 6;6'-dimycolate* (TDM). TDB bindet an den Mincle-Rezeptor und aktiviert die Syk-Card9 Signalkaskade in APZ [25, 139, 140]. Liposomen sind seit ihrer Entdeckung Mitte der 60er Jahre auf ihre Eignung als Transportsysteme für verschiedene Arzneimittel und Impfstoffantigene untersucht worden. In den letzten Jahren hat die Nutzung von kationischen Liposomen in der Medizin und vor allem in der Impfstoffentwicklung rapide an Bedeutung gewonnen. Sie werden in zahlreichen klinischen Anwendungen, in der Diagnostik sowie in der Therapie von verschiedenen Erkrankungen angewendet [141-145]. Dabei werden sie vor allem als potentielle Transportsysteme, sog. Drug-Carrier-Systeme verwendet [146, 147]. Vorteil dieser liposomalen Verpackung ist, dass sie durch entsprechende Modifikationen in ihrer Lipidzusammensetzung bzw. über sog. Funktionalisierung mittels Liganden eine gezielte Einschleusung der Wirkstoffe in die Zielzellen ermöglichen. Als Liganden können unterschiedliche Proteine und Kohlenhydrate eingesetzt werden, die eine spezifische Bindung an bestimmte Oberflächenstrukturen der Zielzellen, z.B. geeignete Endozytoserezeptoren, bewirken. Außerdem sind liposomenverkapselten Wirkstoffe vor äußeren, wirkungsmindernden Einflüssen geschützt. Schließlich ermöglichen sie einen Übertritt von Wirkstoffen in das Zellinnere, in welches sie unverkapselt, aufgrund ihrerer Hydrophilität, nicht penetrieren könnten. Sie bieten eine Alternative

zu viralen Vektoren, die ihre Anwendung u.a. in der Gen-Therapie finden [148]. Im Vergleich zu den neutralen Liposomen sind kationische Liposomen in der Lage, DNA effizient zu komplexieren und die Bindung dieser sog. Lipoplexe an Zellen zu fördern [149].

Kationische Liposomen können sich in ihrer Wirkung abhängig von ihrer Zusammensetzung (Art der verwendeten Lipide, Anzahl der positiven Ladungen, Anzahl der Doppelbindungen der Fettsäuren) unterscheiden. Sie sind nicht toxisch und beeinflussen die Funktionen anderer Zellen nicht. In *in vitro* Studien wurde gezeigt, dass sie hinsichtlich der Expression der MHCII, CD40, CD80 und CD86 Moleküle keinen Effekt auf die Differenzierung von BM-DZ (*Bone-Marrow-derived Dendritic Cells*) hatten. CAF01 ist in der Lage T_H1 , T_H17 und humorale Antworten zu unterstützen.

Liposomen sind sphärische, abgeschlossene Strukturen, die von einer oder mehreren konzentrischen Lipid-Doppelschichten (Bilayer) gebildet werden und eine wässrige Phase im Inneren und zwischen Bilayern besitzen [150]. Die einzelnen Lipid-Moleküle in der Doppelschicht sind so angeordnet, dass die hydrophilen polaren Kopfgruppen nach außen, zum wässrigen Suspensionsmedium, bzw. nach innen zum wässrigen Kern des Liposoms orientiert sind. Die lipophilen Bereiche der Lipide, vor allem die Fettsäuren der Phospholipide, zeigen in das Innere der Doppelmembran und bilden eine lipophile Phase. Dieser Aufbau ähnelt sehr stark den biologischen Zellmembranen. Je nach Zahl der Bilayer und Durchmesser der Vesikel werden Liposomen als kleine unilamellare (small unilamellar vesicles = SUV; 20-100 nm Durchmesser), große unilamellare (large unilamellar vesicles = LUV; 100 nm) und multilamellare (multilamellar vesicles = MLV; 100 nm bis mehrere μm) Liposomen bezeichnet [151, 152]. Die Oberflächenladung der Liposomen wird durch die Ladung der einzelnen Lipidbestandteile bestimmt. Es werden neutrale, anionische und kationische Liposomen unterschieden [152, 153]. Dank ihrer Struktur eignen sich Liposomen als Trägersysteme für hydrophile als auch lipophile Substanzen. Liposomen besitzen eine geringe Toxizität, da sie aus natürlichen Bestandteilen der Säugerzellen zusammengesetzt sind und werden von den Zellen vollständig abgebaut [153]. Durch die liposomale Verpackung kann die Menge des applizierten Wirkstoffs erhöht werden [154, 155].

Liposomen können auf verschiedene Weise, z.B. durch Fusion mit der äußeren Plasmamembran oder durch Phagozytose bzw. Endozytose in die Zielzellen gelangen. Endozytose ist der am häufigsten beschriebene Weg der Aufnahme der Liposomen in die Zelle [142, 154, 156, 157]. Aus der Krebsforschung ist es bekannt, dass kationische Liposomen nach deren Verabreichung vor allem von angiogenen Endothelzellen der Blutgefäße in Tumoren bzw. im chronisch entzündlichen Gewebe mittels clathrin-vermittelter Endozytose aufgenommen werden. [158, 159]. Bei der Anwendung neutraler bzw. anionischer Liposomen konnte keine effiziente Internalisierung festgestellt werden. Bisher bleibt der genaue Ablauf dieser ladungsvermittelten Aufnahme unzureichend untersucht.

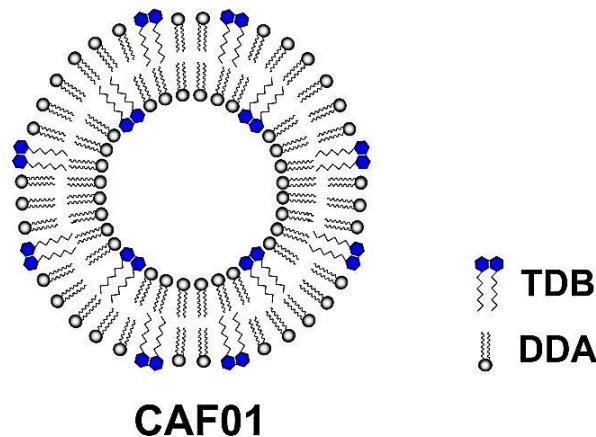


Abbildung 1.5: Aufbau des Liposoms CAF01.

Liposomen bestehen aus einer oder mehreren konzentrisch angeordneten Lipiddoppelmembranen, die in ihrer Struktur den Zellmembranen sehr ähnlich sind. Die Größe der CAF01 Liposomen beträgt durchschnittlich 100-200 nm. DDA: *Dimethyldioctadecylammonium*, TDB: *Trehalose 6;6'-dibehenate*.

1.3 Optische Bildgebung

Nichtinvasive optische Verfahren finden in letzter Zeit neben der Anwendung anderer Bildgebungsverfahren, wie z.B. Positronen-Emissions-Tomographie (PET), Magnetresonanz-Imaging (MRI), Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT), Einzelphotonen(Single-Photon)-Emissions-Computertomographie (SPECT) und Sonographie eine zunehmend breite Verwendung nicht nur in der Krebsforschung. Optische Bildgebung (Biophotonisches Imaging (BPI)) basiert auf Verfahren, bei denen das Licht des sichtbaren (VIS, 400 nm - 700 nm) bis nahinfraroten (NIR, 700 nm – 850 nm) Spektrums verwendet wird. Dieser Spektralbereich wird als „optisches Fenster“ bezeichnet. Sichtbares Licht durchdringt das Gewebe nur wenige Millimeter [160]. Das Licht des NIR-Spektrums erlaubt dagegen eine Gewebepenetration von mehreren Zentimetern [161, 162]. Der Grund dafür ist eine vergleichsweise geringe Absorption von Gewebe, Wasser und Hämoglobin im langwelligen Bereich des NIR-Spektrums.

Als Lichtquellen dienen entweder Fluoreszenz- und Biolumineszenz-erzeugende Proteine oder Farbstoffe. Solche Proteine können von Zellen oder Erregern exprimiert werden [163, 164]. Durch genetische Modifikationen werden die Zellen so verändert, dass sie die entsprechenden Gene zur Synthese fluoreszierender oder lumineszierender Proteine tragen. Fluoreszierende Proteine sind Abkömmlinge des grün-fluoreszierenden Proteins GFP (*Green Fluorescent Protein*) aus der Qualle *Aequorea Victoria* [165-168] bzw. eines rot-fluoreszierenden Proteins *DsRed* (*Discosoma red fluorescent protein*) aus einer Koralle der Gattung *Discosoma sp.* [169, 170]. Der Hauptvorteil von *DsRed* gegenüber GFP ist die Emission im roten Bereich des Lichtspektrums. Diese Eigenschaft eignet sich besonders gut für die Messungen mittels nichtinvasiver bildgebender Verfahren, da das Licht

längerer Wellenlängen besser durch das Gewebe durchdringen kann. Aus diesem Grund ist die Anwendung von Proteinen wie DsRed und seinen Derivaten (mCherry, tdTomato, tdKatushka, Turbo-635 und weiteren [171, 172]), die das Licht im roten Bereich des Lichtspektrums emittieren und sich deshalb für die Bildgebung im Gewebe bzw. im Tier besser eignen zu bevorzugen. Ein weiterer Vorteil im Gebrauch von Fluoreszenz-Reportern ist, dass sie in Kombination mit anderen fluoreszenzbasierenden Methoden wie Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie angewendet werden können.

Zur Lumineszenz-Erzeugung werden meistens Luziferasen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*, des Flohkrebsschens *Gaussia princeps*, des Tintenfischsymbionten *Vibrio fischeri* oder anderer Bakterien, wie z.B. marinen *Photobakterium* sp. und terrestrischen *Photorhabdus luminescens* verwendet [173-175]. Luziferasen gehören zu einer großen Familie von Enzymen, die die Oxidation eines Substrats (D-Luziferin, Luzigenin, bzw. Coelenterazin) in Gegenwart von Sauerstoff und ATP zu Oxyluziferin katalysieren. Bei Rückkehr des angeregten Oxyluziferins in seinen Ausgangszustand wird Licht mit den Wellenlängen (λ_{\max}) 610-560 nm emittiert [176]. Die höchste Effizienz der Oxidationsreaktion (Quantumeffizienz: Verhältnis der Menge des erzeugten Lichts zur Menge des Anregungslichts) wird durch das Luziferin-Luziferase-System des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* mit der Quantumeffizienz von 41% erreicht [177]. Nicht-bakterielle Luziferasen erfordern eine exogene Verabreichung des Substrats, das meistens intraperitoneal injiziert wird. Im Gegensatz dazu enthalten bakterielle Luziferasen substratkodierende Gene (*luxCDE*), die synchron mit den Luziferase kodierenden Genen (*luxAB*), die sich im selben Operon befinden, exprimiert werden. Das Substrat muss nicht extra zugegeben werden.

Zur Bildgebung wird das emittierte schwache Licht der fluoreszierenden bzw. lumineszierenden Reporter von einer hochsensitiven, gekühlten „Charge-Coupled Device“ (CCD)-Kamera, die oben in einem dunklen Gehäuse des IVIS Imaging Geräts eingebaut ist, erfasst und als planares (zweidimensionales) Bild aufgezeichnet.

Optische Bildgebungsmethoden sind verbreitet zur Visualisierung verschiedener bakterieller Infektionsprozesse und werden zum Testen diverser Antibiotika angewendet. Contag *et al.* benutzten diese Methoden, um die Wirkung von Ciprofloxacin in *S. enterica* serovar Typhimurium-infizierten Mäusen zu verfolgen [178]. Rocchetta *et al.* testeten mittels BPI in murinen *E. coli* Infektions-Modellen die Wirkung der Antibiotika Ceftazidim, Tetracyclin und Ciprofloxacin [179]. Ferner wurden Bildgebungsmethoden für die Analysen von Antibiotika Daptomycin, Vankomycin und Linezolid in der Peritonitis [180] und die Wirkung von Ceftriaxon und Daptomycin in der Pneumococcalen Meningitis [181] eingesetzt. Des Weiteren wurde von der Anwendung von BPI in Antibiotika-Tests in

immunodefizienten Mäusen, die mit *M. bovis* BCG infiziert wurden, berichtet. Dabei wurde die Wirkung von Rifampicin und Isoniazid evaluiert [182]. Ferner wurde gezeigt, dass optische Bildgebungsmethoden erfolgreich bei den Tests von Antibiotika gegen das Biofilm-bildende Bakterium *S. aureus* eingesetzt werden können. So wurde die Wirkung von Tobramycin, Ciprofloxacin und Rifampin in Mäusen analysiert, bei denen *S. aureus*-infizierte Katheter eingepflanzt wurden [183].

In unserer Gruppe wurde bereits das Bildgebungsverfahren (IVIS Imaging) zur Analyse von antimykobakteriellen Antibiotika, wie Moxifloxacin und Isoniazid, in Kombination mit biolumineszierenden und fluoreszierenden Reporterstämmen im Mausmodell der Tuberkulose erfolgreich angewandt [184, 185]. Die rekombinanten fluoreszierenden und biolumineszierenden *M. tuberculosis* Stämme wurden im Rahmen des Imaging Tuberculosis Konsortiums / Bill & Melinda Gates Foundation Drug Accelerator entwickelt [171, 175].

Weitere Studien beschreiben eine simultane Anwendung von fluoreszenz- und biolumineszenzbasierten Reporter-Systemen. Dabei wurden die Stämme benutzt, die Luziferase-Proteine in Tandem mit GFP kodieren [186-188]. Diese Anwendung ermöglicht Parameter, wie Bakterienlast (durch Fluoreszenz) und die metabolische Aktivität (mithilfe von Biolumineszenz) gleichzeitig in einem Experiment zu analysieren.

Im Vergleich zur Fluoreszenz-Bildgebung ist die Biolumineszenzbildgebung aufgrund eines besseren Signal-Hintergrund-Verhältnisses (*signal-to-noise ratio*) sensitiver. Die Ursache dafür ist der hohe Hintergrund bei *in vivo* Messungen von Fluoreszenz [189]. Dieser Hintergrund wird durch die Autofluoreszenz der im Gewebe vorkommender endogenen Fluorophore, wie z.B. Keratine, Porphyrine, NAD(P)H, Collagen und Elastin erzeugt [190]. Generell vermindert sich die Autofluoreszenz von den meisten Materialien, einschließlich Gewebe, bei Verwendung des Lichts mit höheren Wellenlängen (roter, infraroter-(NIR) Bereich des Spektrums) [191]. Im Gewebe ist die Stärke der Lichtemission im Wesentlichen vom Ausmaß der Lichtabsorption sowie der Streuung des Lichts im Gewebe abhängig. Je nach Art des Gewebes können diese zwei Parameter stark variieren. Die stärksten Lichtabsorber im Körper sind Hämoglobin, Lipide und Wasser. Hämoglobin absorbiert blaues und grünes Licht des sichtbaren Spektrums, während Lipide und Wasser eher infrarotes Licht absorbieren. Licht im Nahinfrarot-Bereich (650-850 nm) wird deutlich weniger vom Gewebe absorbiert. Das Licht längerer Wellenlängen kann demnach tiefer in das Gewebe eindringen, ebenso ist die Autofluoreszenz in diesem Bereich geringer. Für die Quantifizierung biologischer Prozesse über Lichtemission *in vivo* ist demnach das Licht mit längeren Wellenlängen besser geeignet.

Die Durchlässigkeit des Lichtes durch das Gewebe wird auch durch eine weitere Substanz, Melanin, negativ beeinflusst. So werden die Lichtsignale in Tieren mit schwarzem Fell mehr abgeschwächt im Vergleich zu Tieren mit weißem Fell bzw. in haarlosen Tieren.

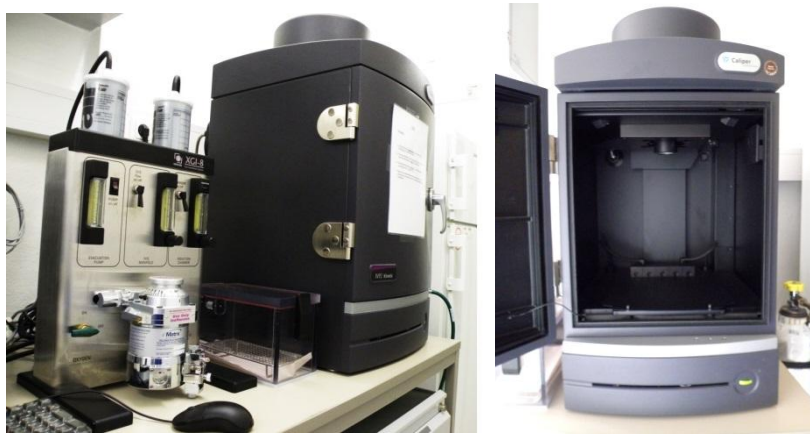


Abbildung 1.6: IVIS Bildgebungssystem (Perkin Elmer Inc.).

1.3.1 Fluoreszierende Nanopartikel

Quantum Dots (Quantenpunkte, QDots) haben in den letzten Jahren eine breite Anwendung in vielen Bereichen der Forschung und Medizin gefunden. QDots sind winzige zwei bis acht Nanometer (Millionstel eines Millimeters) große Halbleiterkristalle, die abhängig von ihrer Größe unter Einwirkung von Licht höherer Energie in verschiedenen Farben aufleuchten können [192]. QDots werden in *in vitro* und *in vivo* Studien als winzige Fluoreszenzmarker benutzt, um einzelne Biomoleküle (u.a. Peptide) sichtbar zu machen [193]. Die QDots sind sehr hell und äußerst stabil, sie sind in der Lage über Monate hinweg nach einer Anregung durch das UV-Licht ihr Fluoreszenzlicht in unterschiedlichen Farben auszusenden. Durch diese Photostabilität haben sie einen unschlagbaren Vorteil gegenüber vielen synthetischen Fluorophoren, z.B. Texas Red sowie fluoreszierenden Proteinen wie GFP, und ermöglichen eine Verfolgung der Verteilung der markierten Substanzen über einen beliebigen Zeitraum in einem lebenden Tier [194, 195]. QDots bleichen nicht aus und sind bezüglich ihrer Fluoreszenzfarbe spezifisch detektierbar. Eine weitere Eigenschaft, die Fähigkeit nicht nur im sichtbaren Bereich, sondern auch im nahinfraroten Spektralbereich zu leuchten, ist für die Anwendung im Gewebe optimal, da das langwellige Licht Gewebe besser durchdringt. Die QDots lassen sich leicht in liposomale Adjuvansformulierungen, wie CAF01, einbauen und ermöglichen

detailliertere Beobachtung der Liposomenverteilung über einen längeren Zeitraum in lebenden Mäusen. Somit eignen sich die fluoreszierenden Nanokristalle hervorragend für eine präzise Lokalisierung im 3-dimensionalen Gewebe markierter Substanzen wie z.B. von Impfstoffträgern mittels bildgebender Verfahren.

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte als **erstes Ziel** die Nutzbarkeit eines speziellen nicht invasiven bildgebenden Verfahrens (IVIS Bildgebung) in Verbindung mit fluoreszierenden und lumineszierenden *M. tuberculosis* Reporterstämmen zur Visualisierung der Schutzwirkung neuer Impfstoffe untersucht werden. Dieses bildgebende Verfahren sollte dazu eingesetzt werden, einen neuen effizienteren Impfstoff gegen die Tuberkulose (H56-CAF01) weiter zu entwickeln.

Ein besseres Verständnis, wie die Impfstoffe im Organismus verteilt werden, kann zur Entwicklung effektiverer Vakzine gegen die Tuberkulose beitragen. Als **zweites Ziel** der vorliegenden Arbeit sollte die Verteilung eines Impfstoffs und seiner Einzelkomponenten in der Maus sowie seinen Transport zu den immunologisch relevanten Organen (Lymphknoten, Milz) analysiert werden. Außerdem sollten die Zellen, bei der Impfstoffaufnahme und dem -transport beteiligt sind, charakterisiert werden. Dabei sollten zwei unterschiedliche Impfwege (subkutan und intranasal) mit Hilfe der IVIS Bildgebung vergleichend untersucht werden.

Die Bestimmung der Keimbelastung mit dem Tuberkuloseerreger ist eine Endpunktbestimmung. Dazu müssen die Tiere in engen Abständen zur detaillierten Keimzahlbestimmung (und nicht nur für histopathologische und Immunanalysen) getötet werden. Die Anwendung der zu etablierenden bildgebenden Verfahren und der dazu entwickelten fluoreszierenden und lumineszierenden Reporterstämmen sollte es im Gegensatz dazu erlauben, eine lückenlose Darstellung des Infektionsverlaufs, der Keimzahlentwicklung und die Dynamik einzelner Infektionsherde im Tier nach einer Impfung zu erlangen, ohne das Tier töten zu müssen. Dieses Verfahren könnte die Zahl der benötigten Versuchstiere reduzieren.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (<i>DAPI</i>), Dilactat	Life Technologies Corporation
Aceton	Merck
Acrylamid/Bis	Biorad
Ammoniumchlorid	Merck
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Aqua dest.	Deionierungsanlage, Forschungszentrum Borstel
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Borsäure	Merck
Buraton	S&M
Confocal-Matrix [®]	Micro-Tech-Lab
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)	Biochrom
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
EDC (<i>N-ethyl-N'-dimethylaminopropyl-carbodiimide</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica
Entellan	Merck
Eosin	Merck
Ethanol (für Molekularbiologie)	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
FKS (Fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert)	Biochrom

Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hämatoxylin	Merck
Hamster-Serum	Jackson Immuno Research
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Immersionsöl für Mikroskopie	Roth
Isofluran	Delta Select
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Karbofuchsin	Merck
Ketamin 10%	WDT
L-Glutamin	Biochrom
Mausserum	PAA Laboratories GmbH
Methanol	Merck
Middlebrook 7H10 Medium	DIFCO
Middlebrook 7H9 Medium	DIFCO
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
OADC (Oleinsäure, Albumin, Dextrose, Katalase)	BD Bioscience
Ovalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
PFA (Paraformaldehyd)	Roth
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Biochrom
Protease Inhibitor Cocktail (Complete Mini)	Roche
QDot®ITK™ Carboxyl Quantum Dots 700	Life Technologies Corporation
Rompun 2%	Bayer Health Care

RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH
Saccharose	Roth
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Biorad
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth
Trypanblau	Roth
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tween-80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Wasser (steril, pyrogenfrei)	BRAUN
Xylol	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Costar Platten 96-well	Corning
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH
Einmalwägeschale	Greiner Bio-One GmbH
Kanülen	BD Bioscience
Mikrotiterplatten (24/96-well Rund- und Flachboden)	NUNC
Neubauer Zählkammer	Brandt
Objektträger (SuperFrost®Plus)	Thermo Fischer Scientific
Petrischalen	Sarstedt AG & Co
Pipettenspitzen (10 µL, 100 µL, 1000 µL)	Sarstedt AG & Co
Reaktionsgefäße (1,5-2 mL)	Sarstedt AG & Co
Reaktionsgefäße (15-50 mL)	Sarstedt AG & Co
Röhrchen (5 mL)	BD Bioscience
Skalpelle	SWANN MORTEN

Zellkulturschalen	Sarstedt AG & Co, NUNC
Zellschaber	Sarstedt AG & Co
Zellsiebe (100 µM)	BD Bioscience

3.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 3.3: Puffer, Lösungen und Medien

Puffer/Lösung/Medium	Substanz
1 x Anästhetikum	PBS 1,25 % Ketamin
Agarosegel-Auftragspuffer (6x):	A. bidest. 0,09 % (w/v) Bromphenolblau 0,09 % (w/v) Xylen Cyanol FF
APS-Stocklösung	A. bidest 10% Ammoniumpersulfat
Boratpuffer	A. bidest 89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA-Na ₂
DMEM-Medium	DMEM-Komplett-Medium supplementiert mit 1% L-Glutamin und 10% FCS
Einfriermedium	DMEM-Komplett-Medium supplementiert mit 20% FCS und 10% DMSO rühren
Formalinlösung	PBS Paraformaldehyd (PFA) 4%
FKS	30 min bei 56°C hitzeaktivieren Lagerung in 50 ml Aliquots bei -20°C
Glucose-Stocklösung	A. bidest 20 % (w/v) α-D-Glucose (wasserfrei) steril filtrieren
Hämalaun nach Mayer	1000 ml A. dest.

	1 g Hämatoxylin 0,2 g Natriumjodat 50 g Kaliumaluminiumsulfat rühren
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	A. dest. 2,7 mM KCl 1,5 mM KH_2PO_4 13,7 mM NaCl 9 mM NaH_2PO_4 pH 7,2-7,4; sterilfiltriert
PAGE-Probenpuffer (4x)	A. dest. 250 mM Tris-HCl, pH 6,8 40 % (v/v) Glycerol 8 % (w/v) SDS 0,004 % (w/v) Bromphenolblau Lagerung bei +4 °C
PAGE-Sammelgel-Puffer (4x)	A. dest. 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS Lagerung bei +4 °C
PAGE-Tankpuffer (5x)	A. dest. 0,125 M Tris-HCl, pH 8,3 0,96 M Glycin 0,5 % (w/v) SDS
PAGE-Trenngel-Puffer (4x)	A. dest. 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
TBS	A. dest. 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TPBS	PBS 0,1 % (v/v) Tween 20
WTA	A. dest. 0,01 % (v/v) Tween 20 0,05% BSA

3.1.4 Antikörper

Tabelle 3.4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Klon	Markierung	Hersteller	Isotyp	Konz.
anti-mouse CD4	GK1.5	PeCy7	eBioscience Inc.	Ratte IgG	2 µg/ml
anti-mouse CD8	53-6.7	APC	Biolegend	Ratte IgG	2 µg/ml
anti-mouse CD11b	M1/70	V450 (Pacific Blue)	Biolegend	Ratte IgG	2 µg/ml
anti-mouse CD11c	N418	Pe	Biolegend	Hamster IgG	2 µg/ml
CD90.2 (Thy1.2)	N53-2.1	APC-eFluor780 (Cy7)	eBioscience Inc.	Ratte IgG	2 µg/ml
anti-Ovalbumin	poly	—	abcam®	Kaninchen IgG	5 µg/ml
anti-rat IgG IRDye 700	poly	IRDye 700DX	Rockland	Kaninchen IgG	2 µg/ml
Cy2-anti-rabbit IgG	poly	Cy2	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	Ziege IgG	1 µg/ml

3.1.5 Fluoreszenz- und Biolumineszenzreporter

Zur Bildgebung wurden in dieser Arbeit fluoreszierende *M. tuberculosis* Cherry3, Cherry10 und Charge3 [171], der parentale *M. tuberculosis* Wildtypstamm H37Rv (Tab. 3.5) sowie ein biolumineszenter *M. tuberculosis* Stamm FFluc RT eingesetzt [175].

Tabelle 3.5: FP, Plasmide

Stamm	FP	Plasmid	Anregungs-koeffizient von FP ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ von FP (Anreg./Em, nm)	FP-Leuchtkraft (% von DsRed)	Quantum-Ertrag
H37Rv	—	—	—	—	—	—
Charge3	Turbo-635	pCharge3	65 000	588/635	37	0,34
Cherry3	mCherry	pCherry3	72 000	587/610	27	0,22
Cherry10	mCherry	pCherry3	72 000	587/610	27	0,22

3.1.6 Mausstämme

Tabelle 3.6: Verwendete Mausstämme

Stamm	Züchter
BALB/c	Charles River, Sülzfeld
C57BL/6	Charles River, Sülzfeld
CB6F1	Charles River, Sülzfeld
SCID	Charles River, Sülzfeld
SKH1 Hairless	Charles River, Sülzfeld

Als Versuchstiere wurden 10 bis 12 Wochen alte Mäuse verwendet (Tab. 3.6). Infizierte Tiere wurden in separat belüfteten Käfigen mit speziellen Luftfiltern im BSL (Biologisches Sicherheits Labor)3-Bereich gehalten. Alle Mäuse waren frei von viralen, bakteriellen und parasitären Erkrankungen. Die Tierversuchsvorhaben zu den verschiedenen Experimenten wurden vom Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein unter den Nummern V312-72241.123-3 (40-4/11) und V312-72241.123-3 (55-3/13) genehmigt.

3.1.7 Geräte

Tabelle 3.7: Geräte

Geräte	Hersteller
Analysewaage ED 124S	Sartorius AG
Ausschwing-Rotor TTH 750	Heraeus
Elektrophoresegerät PowerPac	Bio Rad
FACSCantoll™	BD Bioscience
Gefrierschrank G5216-21Liebherr	Liebherr
Homogenisator Cell homogenizer	Isobiotec
Inkubationsschüttler MaxQ 6000	Thermo Fischer Scientific
Inkubator Heratherm/GS100	Heracell
Inverses Mikroskop Ti-E	Nikon

Inverses Mikroskop TS-100 F	Nikon
IVIS® Kinetic	Perkin Elmer Inc.
Kühlzentrifuge Heraeus Freco21	Thermo Fischer Scientific
Kühlzentrifuge Heraeus Multifuge 3SR Plus	Thermo Fischer Scientific
Lichtmikroskop Olympus BX41	Olympus
Magnetrührer RH basic EU	Ikamag
Mikrotom Hyrax V50	Zeiss
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR® Bioscience
pH-Meter Modell PB-11 BasicMet	Focus
Pinzetten	WPI GmbH
Präparierscheren	WPI GmbH
Präzisionswaage AY303	Sartorius AG
Spektral-Photometer VIS 320	NeoLab
Stand-Kühlschrank	Bosch
Sterilwerkbank MSC-Advantage™ Class II	Thermo Fischer Scientific
Wärmeplatte	Vet Tech
Wasserbad WBT	Roth
XGI-8 Gas Anesthesia System	Xenogen Corporation

3.1.8 Software

Tabelle 3.8: Software

Software	Firma
Adobe Acrobat Professional 8	Adobe Systems Inc.
FACSCanto™ System Software, Version 1.0.3	BD Bioscience
FACSDiva™, Version 6.0	BD Bioscience
FCS Express 4 Flow Cytometry Version 4.07.0003	DeNovo™ Software

GraphPad Prism®, Version 5.01	GraphPad Software
LAS AF, Version 2.7.3.9723	Leica Microsystems
Living Image 3.2, Version 3.2.0.8156	Caliper Life Science
Microsoft Exel 2010	Microsoft Corporation
Microsoft Powerpoint 2010	Microsoft Corporation
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation
Adobe Photoshop Elements 5.0	Adobe Systems Inc.
CorelDRAW Graphics Suite X5	Corel Corporation

3.2 Methoden

3.2.1 Bakterienanzucht

Der parentale *M. tuberculosis* H37Rv und darauf basierende fluoreszierende und lumineszierende rekombinante Reporterstämme *M. tuberculosis* Charge3, Cherry10 und Cherry3 und FFluc RT wurden im 0.47 % (w/v) Middlebrook 7H9 Medium (angereichert mit 0.5 % (v/v) Glycerol, 0.5 % (v/v) Tween-80 und 10 % (v/v) OADC (Oleinsäure, Albumin, Dextrose, Katalase)-Zusatzmedium) bis zur mittleren logarithmischen Phase angezüchtet. Die geernteten Kulturen wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Zahl der kolonienbildenden Einheiten (KBE) wurden Verdünnungsreihen der eingefrorenen Zellsuspensionen im sterilen destillierten Wasser mit einem Zusatz von 0,05 % Tween-80 angefertigt und auf 2.1 % (w/v) Middlebrook 7H11 Agarplatten ausplattiert. Nach einer Inkubation von 3 Wochen bei 37°C wurde die Kolonienanzahl auf den Agarplatten bestimmt und die KBE für jede Kultur berechnet.

3.2.2 Infektion von Versuchstieren

Alle Experimente wurden nach der gesetzlichen Vereinbarung mit der Ethik-Kommission für Tierversuche des Landes Schleswig-Holstein durchgeführt. Die Infektion der Versuchstiere mit Mykobakterien erfolgte intranasal mit einer geeigneten Erregerkonzentration (10^3 bis 10^9) in 20 µl PBS pro Tier. Hierfür wurden die Bakteriensuspensionen im sterilen PBS gelöst und zehnmals mit einer 26G-Kanüle resuspendiert, um die Aggregatbildung der Mykobakterien zu verhindern. 100 µl dieser Bakteriensuspension wurden für die Verdünnungsreihen abgenommen. Die Verdünnungen von 10^2 bis 10^8 wurden auf OADC- und Glycerol-supplementierten Agarplatten ausplattiert und 4 Wochen bei 37°C inkubiert, um die tatsächliche Bakterienkonzentration in einer Infektionsdosis zu ermitteln. Für die Infektion wurden die Tiere mit einem Ketamin-Xylacin-Cocktail betäubt. Die Dosis pro Maus betrug 60 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 22 mg/kg Körpergewicht Xylacin, gelöst in 200 µl physiologischer Kochsalzlösung. Das Betäubungsmittel wurde intraperitoneal injiziert.

3.2.3 Bestimmung der Keimlast in Lungen- und Milzhomogenaten

Die entnommenen Organe (Lunge und Milz) wurden mechanisch (durch das einfache Zermatschen in einer sterilen Plastiktüte) homogenisiert. 100 µl des jeweiligen Homogenats wurden in seriellen 10er Verdünnungsstufen von 10^{-1} bis 10^{-6} auf 2.1 % 7H11 Middlebrook Nährboden ausplattiert. Zur Verdünnung wurde der WTA-Puffer (Wasser-Tween-Albumin: 1% (v/v) Tween-80, 1 % (w/v) BSA)

benutzt. Die Bestimmung von KBE als Maß für die bakterielle Last erfolgte nach 4 Wochen nach der Inkubation in einem Brutschrank bei 37°C. Die Zahl der KBE wurde unter Berücksichtigung des jeweiligen Teilgewichts und der Verdünnungsstufe für das gesammte Organ errechnet. Die überschüssigen Lungenhomogenate wurden bei -20°C gelagert.

3.2.4 Aufbereitung von Organen für die Herstellung von Kryopräparaten

Für mikrobiologische, histopathologische und immunologische Untersuchungen wurden den Versuchstieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Versuche die Organe (Lunge, Milz, Lymphknoten und Haut) entnommen. Dafür wurden die Mäuse durch die intraperitoneale Injektion euthanasiert. Nach Notierung des jeweiligen Gesamt- und Teilgewichts und evtl. Bildgebung wurden Teile der Organe (Lunge, Milz, Haut) bzw. ganze Organe (Lymphknoten) in einer Paraformaldehydlösung (4 % in PBS) für mindestens 24 Stunden fixiert. Anschließend wurde das Gewebe für 24 Stunden in PBS überführt, um Fixierungsartefakte bei der Färbung zu vermeiden. Zur Kryokonservierung wurden Gewebestücke bzw. die Organe in einer aufsteigenden Saccharose-Reihe (5, 10, 15 und 20 % in A. dest) für 30-60 min inkubiert. Danach wurde das Gewebe in einer Einbettungsform platziert und das Gefriermedium dazugegeben. Mit Hilfe einer Pinzette wurde die Einbettungsform mit den Organen in den eiskalten Isopentan bis zum vollständigen Einfrieren eingetaucht. Von den Präparaten wurden anschließend 5 µm dicke histologische Schnitte mithilfe eines Mikrotoms angefertigt oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die angefertigten Schnitte wurden anschließend für histopathologische und immunhistochemische Färbungen (s. 2.7, 2.8) verwendet.

3.2.5 Histologische Färbungen

3.2.5.1 Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung

Die HE-Färbung von Kryopräparaten erfolgte zur Visualisierung zellulärer Bestandteile (Kerne, Zytoplasma, Zellwände), um histopathologische Veränderungen in den Mausorganen zu analysieren. Zur Kernfärbung wurden die Schnitte nach 3-minütigem Spülen in A. dest. für 10 min mit Hämatoxylin gefärbt. Unter laufendem Leitungswasser wurden die Präparate für 10 min „gebläut“ und überschüssiges Hämatoxylin ausgewaschen. Eine Gegenfärbung erfolgte für 3 min. mit Eosin (1 % in A. dest), welches zu einer rötlichen Anfärbung des Zytoplasmas führt. Zur Fixierung der Färbung wurden die Präparate nach 3-minütigem Spülen in A. bidest. durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (kurzes Schwenken in 70 % Ethanol, 2 x 96 % Ethanol, kurzes Schwenken in Ethanol absolut, 2 min in Ethanol absolut), 5 min in Xylol inkubiert und mit Entellan eingedeckelt. Die

mikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation wurde mit Hilfe des Lichtmikroskops BX41 (Olympus) durchgeführt.

3.2.5.2 Immunfluoreszenz-Färbung

Immunfluoreszenz ist eine vielseitig einsetzbare Methode, bei der unterschiedliche spezifische Strukturen in Zellen und Geweben mit Hilfe eines Antikörpers markiert und mit einem Farbstoffmolekül sichtbar gemacht werden können. Nach dem Spülen mit PBS wurden die Schnitte für 45 min mit 10 %-iger (in TPBS) FKS-Blockierungslösung inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit TPBS erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper. Dazu wurde der Antikörper im Blockierungspuffer verdünnt. 100 µl dieser Antikörper-Lösung wurden auf die Schnitte gegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wurden die Schnitte dreimal mit TPBS gewaschen und die entsprechenden fluoreszierenden sekundären Antikörper, die in einem TPBS-Puffer verdünnt wurden, aufgetragen. Nach 45 min Inkubationszeit wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und für 10 min bei RT mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit Confocal-Matrix® (Micro-Tech-Lab) eingedeckt. Die Inkubationen mit den Antikörpern erfolgten in einer feuchten Kammer. Die Auswertung und Dokumentation mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops TS-100 F (Nikon) durchgeführt.

3.2.5.3 Färbung von Mykobakterien

Zum Nachweis der säurefesten Stäbchen in histologischen Präparaten wurden die Schnitte mit Karbolfuchsinlösung überschichtet und die überschüssige Färbelösung mit A. dest abgespült. Danach wurde das Gewebe mit Methyleneblau für ca. 1 min gegengefärbt. Zur Fixierung der Färbung wurden die Präparate dehydriert, eingedeckelt und getrocknet (wie in 3.2.5.1 beschrieben). Die mikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation wurde mit Hilfe des Lichtmikroskops BX41 (Olympus) durchgeführt.

3.2.6 IVIS Bildgebung

Zur Bildgebung wurde das IVIS Kinetic® Imaging System von der Firma Perkin Elmer Inc. benutzt. Dieses System besteht aus einer lichtgeschützten Kammer, in deren Decke eine spezielle hochsensitive sog. CCD (*Cooled Charge-coupled Device*)-Kamera eingebaut ist. Diese Kamera ermöglicht die Aufnahme von Fluoreszenz- und Biolumineszenz-Signalen im sichtbaren und nahen Infrarotbereich des Lichtspektrums (480-850 nm). Das System verfügt über 10 Anregungs- und 18 Emissionsfilter und erlaubt eine spektrale Analyse im Bereich von 480-850 nm. Die Anregung von

Reportersubstanzen erfolgt durch das Licht einer Halogenlampe. Bei der Anregung fluoreszierender Substanzen wird dieses Licht mit Hilfe eines entsprechenden Filters monochromatisiert. Zur Detektion von spezifischen Signalen muss das emittierte Licht zuerst durch einen geeigneten Filter passieren, um dann von der CCD-Kamera aufgenommen zu werden. Die Messzeit beträgt nur wenige Sekunden (bei der Fluoreszenzmessung) bis wenige Minuten (bei der Lumineszenzmessung). Nicht spezifische Fluoreszenz wird mit Licht niedrigerer Wellenlängen angeregt und bei der Auswertung mittels *Image Math Tool* in Living Image Software (Version 3.2, Perkin Elmer Inc.) von der spezifischen Fluoreszenz abgezogen. Spezifische Signale werden auf ein Aufnahmebild aufgelegt, um die Detektionssignale anatomisch richtig zu platzieren. Fluoreszenz in den Brustregionen bzw. in den isolierten Organen der Tiere (Lunge, Lymphknoten) wurde nach der Entfernung von nicht spezifischen Hintergrundsignalen, die durch die Autofluoreszenz des Gewebes verursacht werden, in „Region von Interesse“ (ROI, *Region of Interest*) mittels Living Image Software quantifiziert. Die Fluoreszenzintensität ist als „Effizienz“ in Falschfarben dargestellt. Dabei repräsentieren die Signale in Gelb die Fluoreszenz der höchsten Intensität, wobei Signale in Dunkelrot eine niedrigere Fluoreszenzintensität bedeuten. Die dargestellte „Effizienz“ berechnet sich aus der gemessenen Fluoreszenzemission im Verhältnis zur Anregungsintensität (Illumination). Dieser Wert wird in der ROI, die vorher mittels ROI-Tool der Living Image Software definiert wird, pro Pixel berechnet und hat keine Einheit. Durch die Darstellung der Fluoreszenz als „Effizienz“ können die Aufnahmen, die zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments gemessen wurden, einheitlich dargestellt/normiert werden, um sie miteinander optimal zu vergleichen. Zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz wurden den Tieren vor der Messung die Brusthaare durch Rasieren entfernt bzw. haarlose SKH-1 Mäuse in den Versuchen eingesetzt. Außerdem wurden die Tiere mit speziellem Futter (ssniff®EF R/M Control, 5 % Fett, ssniff Spezialdiäten GmbH), das kein Chlorophyll enthält, gefüttert, um die Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren. Zur Aufnahme von Fluoreszenz- bzw. Lumineszenzsignalen wurden die Tiere schonend mit Isofluran (gasförmig, in Sauerstoff verdünnt; Gasfluss 0,25 Liter/Minute für 5 Tiere; Dosis: 5 % zum Einschlafen, 3 % während der Bildgebung) betäubt.

3.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurde eine Minigelapparatur (PowerPac, Bio Rad) verwendet. Es wurde gemäß der Originalmethode (Laemmli, 1970) verfahren.

Bei Elektrophorese-Prozessen in Polyacrylamidgelen hängt die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins von der Nettoladung sowie dem Reibungskoeffizienten und damit der Molekülgröße ab. Die SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) wird unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) durchgeführt, einem Detergens, dessen Anionen an die Hauptketten von Proteinen binden und fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen

zerstören. Die im nativen Protein vorhandenen Ladungen werden durch die starke negative Ladung des SDS überlagert, so dass die Mobilität im elektrischen Feld dem Logarithmus ihrer Molekulargewichte direkt proportional wird. Durch Elektrophorese mit diskontinuierlichem pH-Wert wird eine weitere Optimierung erreicht. Eine pH-Differenz zwischen Trenngel, Tankpuffer und Sammelgel um zwei Einheiten bewirkt im Sammelgel eine Fokussierung der Proteine auf eine scharfe Bande in Abhängigkeit der Laufeigenschaften des eingesetzten Glycinats und der Chlorid-Ionen. Das Sammel- und Trenngel wurde unter Verwendung einer 30 % (w/v) Acrylamid- Stammlösung mit einem Gehalt von 0.81 % (w/v) N,N'-Bismethylenacrylamid als Quervernetzer und eines Trenn- bzw. Sammelgelpuffers angefertigt. Die Polyacrylamidkonzentration lag je nach Größe der zu trennenden Proteine zwischen 12,5 und 15 %. Die Endkonzentration des Radikalstarters Ammoniumpersulfat betrug 0,03 %, die Endkonzentration des Katalysators N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) betrug 0,075 %. Die Größe der Trenngele betrug ca. 6 x 9 cm, die Sammelgelausmaße lagen bei ca. 2 x 9 cm bei einer Gelstärke von 1 mm. Die Proteinproben wurden unter Zugabe von reduzierendem bzw. nichtreduzierendem Probenpuffer für 5 min im Heizblock denaturiert und anschließend in die Probenaschen des Sammelgels aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung (130-160 V) unter Wasserkühlung für eine Dauer von 60-70 min je nach Polyacrylamidkonzentration des Gels durchgeführt. Zur Molekulargewichtsbestimmung der getrennten Proteine wurde der Protein-Standard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) verwendet.

3.2.8 Western-Blot (Elektrophoretischer Proteintransfer)

Durch elektrophoretischen Transfer wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, um sie aus einem Polyacrylamidgel auf eine polymere proteinbindende Membran zu immobilisieren. Dazu wurde eine Nitrocellulose-Membran, durch Inkubation für 5 min in H₂O und für 5 min im Transferpuffer äquilibriert. Das zu blottende Gel wurde mit der Membran zwischen je zwei Lagen Filterpapier im Nassblotter der Firma Bio Rad platziert und unter Kühlung bei einer Stromstärke von 90 V für 1-2 Stunden geblottet.

3.2.9 Immunfärbung von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

Nach dem elektrophoretischen Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran wurde diese für 15 min in TBS gewaschen und anschließend für mindestens 60 min in MPBS bei RT blockiert. Danach wurde sie in eine 2 %-ige Milchpulver-PBS-Lösung überführt, die eine geeignete Sekundär-Antikörperkonzentration enthielt und für mindestens 90 min bei RT inkubiert. Die Membran wurde

nachfolgend dreimal unter leichtem Schütteln für je 5 min mit TPBS und anschließend zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Zur Detektion und Quantifizierung der Proteine wurde Nah-Infrarot-Fluoreszenzdetektion-System (Odyssey Infrared Imaging System) von der Firma LI-COR® Bioscience benutzt. Die Detektion wurde unter Lichtausschluß durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

3.2.10 Herstellung von Einzelsuspensionen aus den trachealen und inguinalen Lymphknoten

Der Lymphknoten wurde durch ein Sieb mit einer Maschengröße von 200 µm gerieben. Nach Spühlen von DMEM und Zentrifugation bei 320 x g und 4°C für 8 min wurden die Zellen in einem geringen Volumen aufgenommen und die Zellzahl der Einzelsuspensionen bestimmt. Die Suspension wurde zur durchflusszytometrischen Analysen verwendet.

3.2.11 Durchflusszytometrie zur phänotypischen Analyse von Immunzellen

Zur durchflusszytometrischen Analyse unterschiedlicher Immunzellen wurden Einzelsuspensionen aus inguinalen und trachealen Lymphknoten verwendet.

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, mit der spezielle Zellmerkmale wie Größe und Granularität und verschiedene Fluoreszenzen detektieren kann. Zur Messung im Durchflußzytometer muss die Probe als Einzelsuspension vorliegen. Das erfolgt durch die hydrodynamische Fokussierung. Bei diesem Vorgang wird die schnell fließende Transportflüssigkeit mit dem langsam fließenden Probenstrom gemischt, so dass die Zellen einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet werden. Dieses Laserlicht regt fluoreszierende Marker an, die vorher entweder in einer Färbereaktion an bestimmte Zellmoleküle gekoppelt wurden oder von den Zellen zur Visualisierung bestimmter Transportwege aufgenommen wurden (QDots). Die Streuung des Anregungsstrahls durch die Zelle und die Fluoreszenzen der Marker werden von einem Detektionssystem erfasst. Das Vorwärtstreulicht (engl. *Forward Scatter, FSC*) zeigt die Größe des gemessenen Partikels und ermöglicht die Unterscheidung zwischen intakten Zellen und Zelltrümmern oder sonstigen Verunreinigungen. Die Seitwärtsstreulicht (engl. *Side Scatter, SSC*) gibt Auskunft über die Granularität der Zelle und erlaubt eine Aussage über den Zelltyp. Die Detektion der Fluoreszenz zeigt das Vorhandensein bestimmter Marker. Die Intensität des Leuchtens entspricht dabei der Menge gebundener Fluorochrome. Je mehr Fluorochrom-gekoppelter Marker in der Zelle vorhanden sind, desto stärker ist das detektierte Signal. Für die zeitgleiche Analyse der mehrerer Antigene werden Fluorochrome eingesetzt, die bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren und emittieren. Diese spektral unterschiedlichen Signale werden detektiert und von einem Fotomultiplier verstärkt und in elektrische Signale umgewandelt. Die Emissionsspektren verschiedener Fluorochrome können sich

überlappen. Dies kann zu falschen quantitativen Ergebnissen führen. Mit Hilfe einer Signal-Kompensation können die überlapende Fluoreszenzsignale voneinander substrahiert werden. Die analogen Signale werden digitalisiert, bevor sie im Computer mittels eines Datenverarbeitungsprogramms analysiert werden.

Die Zellsuspensionen wurden mit der Dichte von $1-5 \times 10^5$ Zellen in einem Volumen von 100 μl in die Vertiefungen einer 96-well-Mikrotiter-Rundboden Platte gegeben. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungen an die zu bestimmende Moleküle durch Inkubation mit einer Blockierungslösung verhindert. Vor und nach jedem Färbeschritt wurden die Zellen durch Zugabe von 200 μl FACS-Puffer und Zentrifugation bei 320 x g und 4°C gewaschen. Nach dem Entfernen des Überstandes erfolgten die Antikörperfärbungen mit jeweils optimierter Konzentration in einem Volumen von 50 μl MACS-Puffer für 20 min bei 4°C. Im Anschluss wurden die markierten Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die weiteren Analysen erfolgten mit der Software FCS Express.

3.2.12 QDot-Ova-Konjugation

150 μl der 8 μM QDot-Lösung wurden in 1,2 ml Boratpuffer (pH 7,4) in einem Glasbehälter resuspendiert. 400 μl der 10 mg/ml Ova-Lösung wurden unter vorsichtigem Rühren dazugegeben. Anschließend wurden 37 μl der 10 mg/ml EDC (*N-ethyl-N'-dimethylaminopropyl-carbodiimide*)-Lösung dazupipettiert und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach der Filtration mit Hilfe von 0,2 μm Filterröhrchen (Costar), 10°C, erfolgten 5 weitere Waschschrte jeweils mit 15 ml 50 mM Boratpuffer (pH 8,3) unter Verwendung von 100 kDa Filterröhrchen (Millipore). QDot-Ova-Konjugate wurden dann in 80 μl Boratpuffer (pH 8,3) aufgenommen.

3.2.13 Kultivieren und Passagieren von RAW 264.7-Zellen

In dieser Arbeit wurden murine RAW 264.7 Makrophagen verwendet. Die Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien wurden entweder bei 121°C und 1,1 bar autoklaviert oder es wurden sterile Einwegartikel verwendet. Selbst hergestellte Lösungen und Medien wurden sterilfiltriert. Die Kultivierung von RAW 264.7 Makrophagen erfolgte in 250 ml (75 cm^2) Gewebekulturflaschen aus Polystyrol mit Filter in einem CO_2 -Inkubator unter 5 % CO_2 -Begasung bei 37°C und 95 % Luftfeuchtigkeit. 90 % konfluent gewachsener Makrophagen wurden zum Passagieren mit einem sterilen Spatel vom Zellkulturflaschenboden abgeschabt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (4 min, 3,3 x g). Das Zellpellet wurde in Vollmedium durch Pipettieren resuspendiert und nach Bedarf in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät. Wenn eine bestimmte Zelldichte benötigt wurde, wurde diese mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

3.2.14 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl einer Zellsuspension entnommen und mit einer äquivalenten Menge Trypanblau vermischt. Zellen mit intakter Cytoplasmamembran nehmen den Farbstoff nicht auf, weil er die Membran nicht passieren kann. Tote und geschädigte Zellen sind hingegen durch einen blau gefärbten Nukleus zu erkennen. Die Bestimmung der lebenden nicht gefärbten Zellen erfolgte durch Auszählen von 16 Kleinquadraten in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Die Zellzahl pro Milliliter ergibt sich nach Bildung eines Mittelwerts durch Multiplikation mit dem Faktor 2×10^4 .

3.2.15 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden nach dem Abschaben vom Zellkulturflaschenboden in ein Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (3 min, 3,3 x g). Das Zellpellet wurde in Zelleinfriermedium (20 % FKS, 70 % RPMI 1640 und 10 % DMSO) resuspendiert und die Zellsuspension in ein Kryo-Einfrier Röhrchen überführt und langsam bis -80°C eingefroren. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurden die Zellen in dem Kryo-Einfrier Röhrchen in einem Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut, in Vollmedium aufgenommen, mehrmals gewaschen und kultiviert.

3.2.16 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism®, Version 5.01 (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Die Daten sind als Balkendiagramme dargestellt, die den Mittelwert der Einzelmessungen repräsentieren. Zur Ermittlung der Signifikanz wurden die Daten anhand eines Kolmogorow-Smirnow-Tests auf eine Normalverteilung getestet. Eine Normalverteilung der Daten wurde angenommen, wenn der p-Wert $> 0,05$ war. Für die Analyse von zwei Gruppen normalverteilter abhängiger Werte wurde ein gepaarter Student-t-Test angewendet (Konfidenzintervall 95 %) oder eine Varianzanalyse mit dem Two-way-ANOVA-Test und anschließendem Bonferoni-Mehrfach-Vergleichstest (Konfidenzintervall 95 %) durchgeführt. Nicht normalverteilte Datensätze wurden mit dem Mann-Whitney Test (zweiseitig, Konfidenzintervall 95 %) analysiert. Soweit nicht anders angegeben, lagen die ermittelten p-Werte $> 0,05$ und die zu untersuchenden Unterschiede wurden als nicht signifikant eingestuft. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternen gekennzeichnet und wie folgt definiert, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

4 Ergebnisse

4.1 Identifikation optimaler *M. tuberculosis* Reporterstämme für die bildgebende Darstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein nicht-invasives bildgebendes Verfahren (IVIS Bildgebung) etabliert werden, das anhand fluoreszierender bzw. lumineszierender *M. tuberculosis* Reporterstämme zur Analyse der Schutzwirkung neuer Impfstoffe gegen Tuberkulose genutzt werden soll. Dieses bildgebende Verfahren sollte eine bessere Darstellung der Impfstoffeffizienz, d.h. Zu- bzw. Abnahme der Erregermenge im selben lebenden Tier in Echtzeit ermöglichen. Das Töten der Tiere sollte dazu nicht notwendig sein. Somit könnte diese Methode dazu beitragen, die Anzahl der benötigten Versuchstiere zu verringern. Außerdem soll dieses Bildgebungsverfahren es ermöglichen, im Infektionsverlauf nach der Immunisierung individuelle Schwankungen in der Keimzahl in einzelnen Mäusen über einen bestimmten Zeitraum visuell zu verfolgen.

Zur Identifikation der optimalen *M. tuberculosis* Reporterstämme, die zur Bildgebung herangezogen werden können, sollten die Reporterstämme bezüglich ihrer Wachstumsfähigkeit und Fluoreszenz zunächst in einem immundefizienten Mausmodell der Tuberkulose getestet werden (s. 4.1.1). Der Einsatz immundefizienter Tiere gewährleistet, dass die Infektion vom erworbenen Immunsystem nicht beeinträchtigt wird und so das Wachstum, die Fitness und die Leuchtkraft der *M. tuberculosis* Reporterstämme nicht durch immunologische Reaktionen beeinflusst werden. Weiterhin sollten die Reporterstämme in immunkompetenten Tieren, die für die Impfstoffanalysen unabdingbar sind und in denen die spezifische Immunantwort einen weiteren Selektionsdruck auf die Bakterien ausübt, auf ihre Wachstumskinetik, ausgelöste Pathologie und ihre Fluoreszenz getestet werden (s. 4.1.2).

4.1.1 Nutzbarkeit von *M. tuberculosis* Reporterstämmen in immundefizienten Mäusen für die Bildgebung im lebenden Tier

In diesem Teilprojekt der Arbeit wurden die fluoreszierenden Reporterstämmen *M. tuberculosis* Charge3 (Charge3), *M. tuberculosis* Cherry3 (Cherry3) und *M. tuberculosis* Cherry10 (Cherry10) auf ihre Eignung für die *in vivo* Studien bezüglich ihrer Virulenz und Fluoreszenz in einem immundefizienten Maus-Modell der Tuberkulose getestet. Für diesen Zweck wurden CB-17 SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) Mäuse, die kein adaptives Immunsystem entwickeln, da sie keine spezifischen T- und B-Lymphozyten besitzen, mit den oben genannten *M. tuberculosis* Reporterstämmen intranasal infiziert. Die Fluoreszenz der Reporterstämmen wurde mittels IVIS Bildgebung in den Brustregionen lebender Tiere gemessen. Zum Nachweis der Erreger wurden die Brustregionen der Tiere unter Betäubung mit Ketamin/Xylacin rasiert, um eine durch die Haare bedingte Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren und somit eine bessere Darstellung von fluoreszierenden Reportersignalen zu erzielen. Die Fluoreszenz der Reportersignale wurde mit der Anzahl von *M. tuberculosis* Erregern in den infizierten Organen verglichen. Die Keimlast der Organe wurde anhand der koloniebildenden Einheiten (KBE) bestimmt. Tiere, die mit Bakterien des nicht-fluoreszierenden Ursprungsstamms *M. tuberculosis* H37Rv (WT H37Rv) infiziert wurden, dienten als negative Kontrolle.

20 Tage nach der Infektion konnte in den Lungen der mit *M. tuberculosis* Cherry3, Cherry10 und Charge3 infizierten Mäuse ein starker Anstieg der Bakterienzahl auf etwa 2×10^8 KBE pro Lunge beobachtet werden (Abb. 4.1 B). Die Keimlast in den Lungen der Tiere, die mit dem Wildtyp *M. tuberculosis* H37Rv infiziert wurden, lag zum gleichen Untersuchungszeitpunkt mit etwa 2×10^7 KBE pro Lunge um eine logarithmische Stufe niedriger, verglichen mit den fluoreszierenden Stämmen. Im weiteren Verlauf von 6 bis 8 Tagen stieg die Bakterienzahl der Reporterstämmen *M. tuberculosis* Cherry3, Cherry10 sowie des *M. tuberculosis* H37Rv Stammes auf ca. 1×10^9 KBE pro Lunge an (Abb. 4.1 D). Die Bakterienzahl in den Lungen der mit *M. tuberculosis* Charge3 infizierten Tiere blieb in etwa konstant. Auch in den Milzen kam es zu einem Anstieg der Bakterienlast im Verlauf der Infektion. Im Vergleich zu den Milzen der mit *M. tuberculosis* Charge3 bzw. mit dem Wildtyp H37Rv infizierten Tiere stieg die Keimzahl in den Milzen der mit *M. tuberculosis* Cherry3 und *M. tuberculosis* Cherry10 infizierten Tiere an Tag 26 bzw. 28 nach Infektion um eine bis 1,5 logarithmische Stufen auf 10^6 - 10^7 KBE an.

Die stärkste Fluoreszenz wurde an Tag 26 nach Infektion in den Lungenbereichen der Tiere, die mit dem Reporterstamm *M. tuberculosis* Charge3 infiziert wurden, gemessen (Abb. 4.1 A), obwohl die Bakterienzahl mit 2×10^7 KBE (Abb. 4.1 D) in den Lungen dieser Tiere im Vergleich zu der Bakterienzahl in den Lungen der mit *M. tuberculosis* Cherry3 (ca. 1×10^9 KBE) bzw. *M. tuberculosis* Cherry10 (ca.

3×10^9 KBE) infizierten Tiere deutlich niedriger war. In den Kontrolltieren wurden unter gleichen Bildgebungseinstellungen keine spezifischen Fluoreszenzsignale detektiert. Zur weiteren Etablierung des Bildgebungsmodells in immunkompetenten Mäusen wurden die Stämme *M. tuberculosis* Cherry10 und *M. tuberculosis* Charge3 ausgewählt.

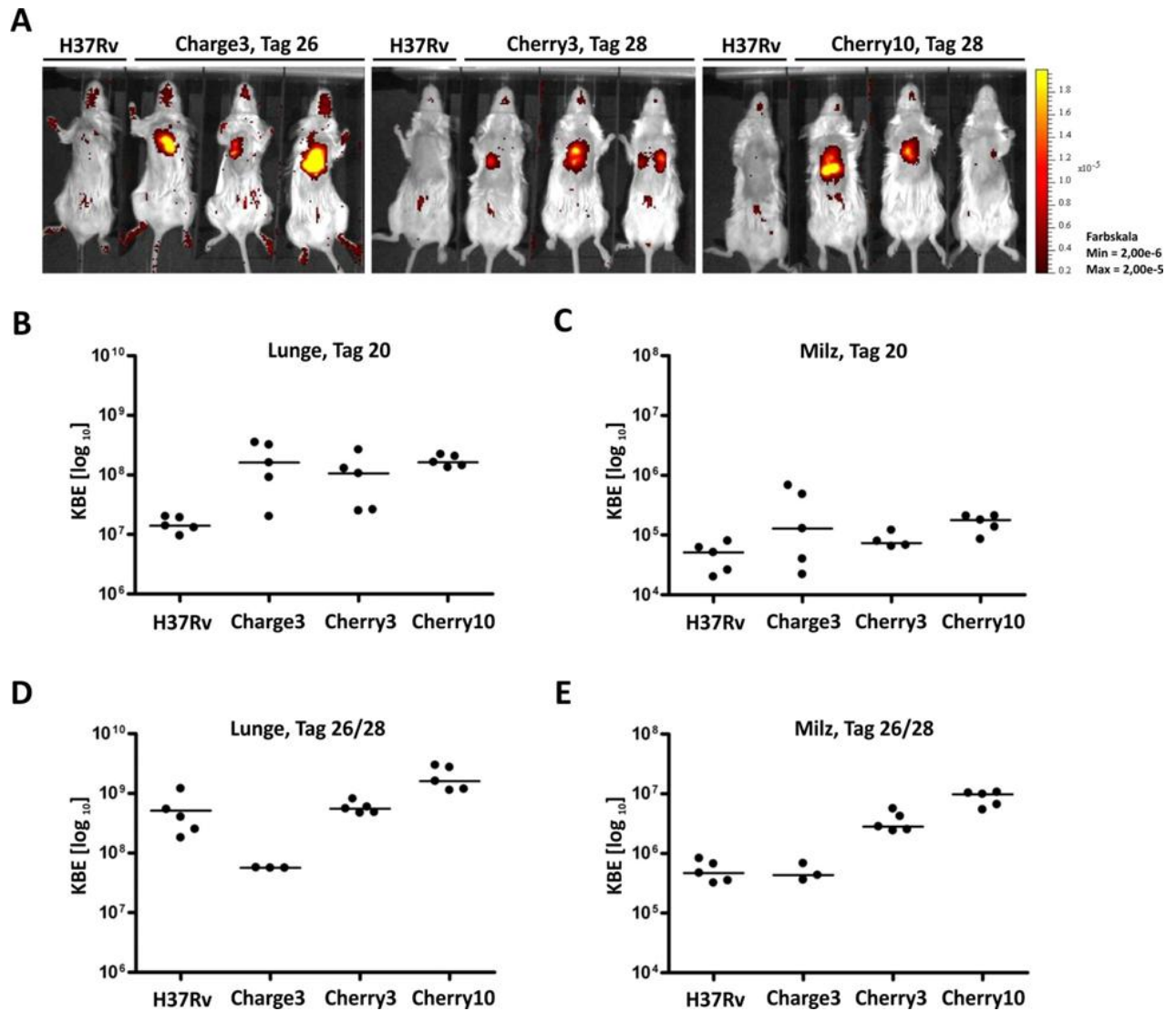


Abbildung 4.1: Test der *M. tuberculosis* Reporterstämme in immundefizienten Mäusen.

CB-17 SCID Mäuse ($n=5$) wurden intranasal mit den Reporterstämmen *M. tuberculosis* Charge3, Cherry3, Cherry10 bzw. mit dem Ursprungstamm *M. tuberculosis* H37Rv infiziert. Fluoreszenzsignale wurden mittels IVIS Bildgebung an Tag 26 bzw. 28 nach Infektion aufgenommen (**A**). Bildgebungsparameter: Anregung 605 nm; Emission 660 nm; f-stop: 2; Anregungszeit: 3 s; Für die Aufnahme unspezifischer Fluoreszenzsignale wurde der Anregungsfilter 465 nm benutzt. Fluoreszenzintensität ist als Effizienz in Falschfarben dargestellt. Signale in Gelb repräsentieren Fluoreszenz der höchsten Intensität, wobei Signale in Dunkelrot eine niedrigere Fluoreszenzintensität bedeuten. Die Keimlast wurde in Lunge (**B, C**) und Milz (**D, E**) zu den dargestellten Zeitpunkten nach der Infektion bestimmt. Die jeweiligen Experimente wurden einmal durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte; $n = 5$. Infektionsdosis/Maus/KBE: *M. tuberculosis* H37Rv, $2,9 \times 10^3$; Charge3, $1,2 \times 10^3$; Cherry3, 2×10^3 ; Cherry10, $2,3 \times 10^3$.

4.1.2 Nutzbarkeit der *M. tuberculosis* Reporterstämme für die Bildgebung in immunkompetenten Mäusen

Für die Entwicklung von Impfstoffen sind Tiermodelle, die ein intaktes Immunsystem haben, unabdingbar. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit immunkompetente SKH-1 Mäuse verwendet, um Virulenz, Wachstumskinetik und histopathologische Veränderungen *in vivo* nach der Infektion mit fluoreszierenden *M. tuberculosis* Reporterstämmen im Vergleich zu dem parentalen nicht fluoreszierenden Ursprungsstamm *M. tuberculosis* H37Rv zu testen. SKH-1 Mäuse sind haarlos. Der Einsatz haarloser Tiere ermöglicht eine bessere bildgebende Darstellung der Fluoreszenzsignale, da die Durchgängigkeit (Penetration) des Lichtes durch das Fell der Tiere nicht beeinträchtigt wird. SKH-1 Mäuse wurden intranasal mit den Reporterstämmen *M. tuberculosis* Charge3 (Charge3), *M. tuberculosis* Cherry10 (Cherry10) bzw. mit dem *M. tuberculosis* H37Rv (WT H37Rv) infiziert (Abb. 4.3).

Vor der Infektion wurde die Leuchtkraft der Reporterstämme *in vitro* untersucht. Dazu wurden die Mykobakteriensuspensionen in seriellen Verdünnungsschritten von 1:2 in die Vertiefungen der schwarzen Mikrotiterplatte pipettiert und die Fluoreszenzsignale im IVIS gemessen (Abb. 4.2). Die Anfangskonzentration der Mykobakterien betrug $2,5 \times 10^7$ KBE pro Plattenvertiefung. Die Bakterien des Reporterstammes *M. tuberculosis* Cherry10 wiesen eine höhere Intensität der Fluoreszenzsignale auf als die des Stammes *M. tuberculosis* Charge3.

Der Infektionsverlauf wurde anhand der Keimlast und der Analyse der Fluoreszenz der Reporterstämme mittels IVIS Bildgebung in den Brustregionen lebender Tiere sowie in den entnommenen Lungen verfolgt (Abb. 4.3 A, B). In lebenden Tieren wurde die Fluoreszenz einmal pro Woche über die gesamte Dauer von 80 Tagen gemessen. In dieser Zeit konnte keine Fluoreszenz in den Brustbereichen lebender Tiere, die mit fluoreszierenden Mykobakterien infiziert wurden, detektiert werden. Ebenfalls wiesen die Kontrolltiere, die mit dem nicht fluoreszierenden WT Stamm H37Rv infiziert wurden, keine Fluoreszenz auf. An Tag 5, 15, 35 und 80 nach der Infektion wurden den Tieren die Lungen entnommen und im IVIS gemessen. In den isolierten Lungen konnte die Fluoreszenz nur im Fall der Infektion mit *M. tuberculosis* Charge3 an Tag 15 und 35 festgestellt werden. Im Vergleich zu Tag 15 wurde an Tag 35 nach der Infektion stärkere Fluoreszenz gemessen (Abb. 4.3 B). In den isolierten Lungen konnte die Fluoreszenz nur in den Organen der mit *M. tuberculosis* Charge3 infizierten Tieren detektiert werden. In den Lungen der mit *M. tuberculosis* Cherry10 infizierten Tiere war die Fluoreszenz zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nachzuweisen, obwohl die Keimzahl in den Lungen an Tag 15, 35 und 80 nach der Infektion mit *M. tuberculosis* Cherry10 wesentlich höher war (bis zu 1,5 log₁₀), verglichen mit der Keimzahl in den Lungen der mit

M. tuberculosis Charge3 infizierter Tiere. In den entnommenen Milzen konnte keine Fluoreszenz gemessen werden.

15 Tage nach der Infektion stieg die Keimlast in den Lungen der mit *M. tuberculosis* Charge3 infizierten Tiere auf 1×10^6 KBE an. Diese Anzahl war geringfügig höher (ca. 0,5 log 10) verglichen mit der Bakterienanzahl der mit *M. tuberculosis* H37Rv infizierten Tiere. Im weiteren Verlauf der Infektion war die Abnahme der Menge an Mykobakterien auf ca. 1×10^5 KBE zu verzeichnen. Zum letzten Zeitpunkt des Experiments (Tag 80) verringerte sich die Keimzahl auf ca. 1×10^4 KBE.

Die Keimlast in Lungen der mit *M. tuberculosis* Cherry10 infizierten Mäuse betrug an Tag 15 nach der Infektion ca. 5×10^7 KBE. Im zeitlichen Verlauf war eine Reduktion der Bakterienzahl auf ca. 3×10^5 zu verzeichnen. Dabei wiesen ca. 90% der Kolonien rötliche Farbe auf, was auf die Expression fluoreszierender Proteine zurückzuführen ist.

Obwohl die Keimlast der Lungen der mit *M. tuberculosis* Cherry10 infizierten Tiere an Tag 15 und 35 nach der Infektion deutlich höher war als die der mit *M. tuberculosis* Charge3 infizierten Tiere, war keine Fluoreszenz in den isolierten Lungen der mit *M. tuberculosis* Cherry10 infizierten Tiere zu detektieren.

Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnten vergleichbare Mengen rot fluoreszierender Reporterbakterien im Lungengewebe der mit *M. tuberculosis* Charge3 und *M. tuberculosis* Cherry10 infizierten Mäuse nachgewiesen werden. Das Lungengewebe der mit *M. tuberculosis* H37Rv infizierten Tiere enthielt dagegen keine fluoreszierenden Bakterien (Abb. 4.4). Die Anfärbung der säurefesten Mykobakterien in den Gewebeschnitten infizierter Lungen zeigte *M. tuberculosis* in allen Gewebeproben (Abb. 4.5).

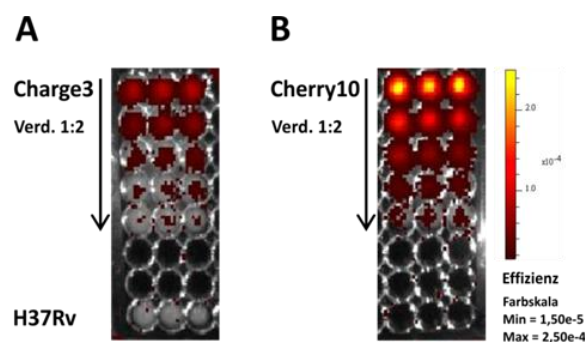


Abbildung 4.2: Titration von *M. tuberculosis* Charge3, Cherry3 und H37Rv.

Bakteriensuspensionen wurden in seriellen Verdünnungsschritten von 1:2 angesetzt und die Fluoreszenz mittels IVIS Bildgebung gemessen. Anfangskonzentration der Bakterien: $2,5 \times 10^7$ KBE pro Plattenvertiefung. Bildgebungsparameter: Anregung 570 nm; Emission 660 nm; f-stop: 1,2; Anregungszeit: 1 s.

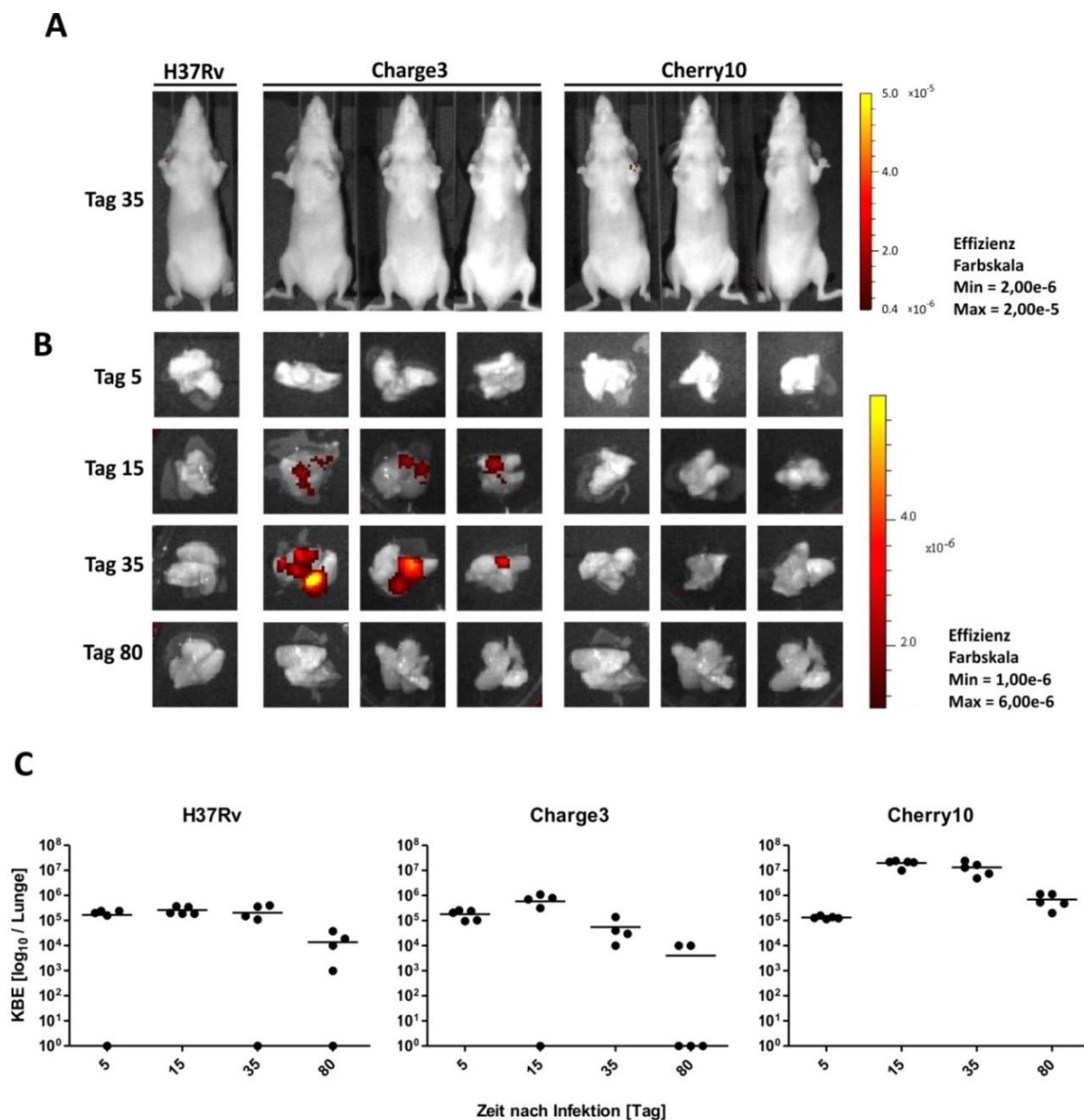


Abbildung 4.3: Nachweis der *M. tuberculosis* Reporterstämme Charge3 und Cherry10 in immunkompetenten SKH-1 Mäusen.

Gruppen von SKH-1 Mäusen ($n=5$) wurden intranasal mit den Reporterstämmen *M. tuberculosis* Charge3, Cherry10 bzw. mit dem nicht fluoreszierenden WT Stamm *M. tuberculosis* H37Rv infiziert. Fluoreszenzsignale wurden mittels IVIS Bildgebungsverfahren einmal pro Woche über einen Zeitraum von 80 Tagen gemessen. Dargestellt sind die Fluoreszenzsignale von 3 repräsentativen Mäusen (A) bzw. deren Lungen (B), die an Tag 5, 15, 35 und 80 nach der Infektion im IVIS aufgenommen wurden. Bildgebungsparameter: Anregung 570 nm; Emission 660 nm; f-stop: 1,2; Anregungszeit: 5 s. Für die Aufnahme unspezifischer Fluoreszenzsignale wurde der Anregungsfilter 465 nm benutzt. Die Fluoreszenzintensität ist als Effizienz in Falschfarben dargestellt. Signale in Gelb repräsentieren Fluoreszenz der höchsten Intensität, wobei Signale in Dunkelrot eine niedrigere Fluoreszenzintensität bedeuten. Die Keimlast wurde in der Lunge zu den dargestellten Zeitpunkten nach der Infektion bestimmt (C). Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte; $n = 5$. Infektionsdosis/Maus/KBE: H37Rv, 7×10^3 ; Charge3, $6,5 \times 10^3$; Cherry10, $5,1 \times 10^3$.

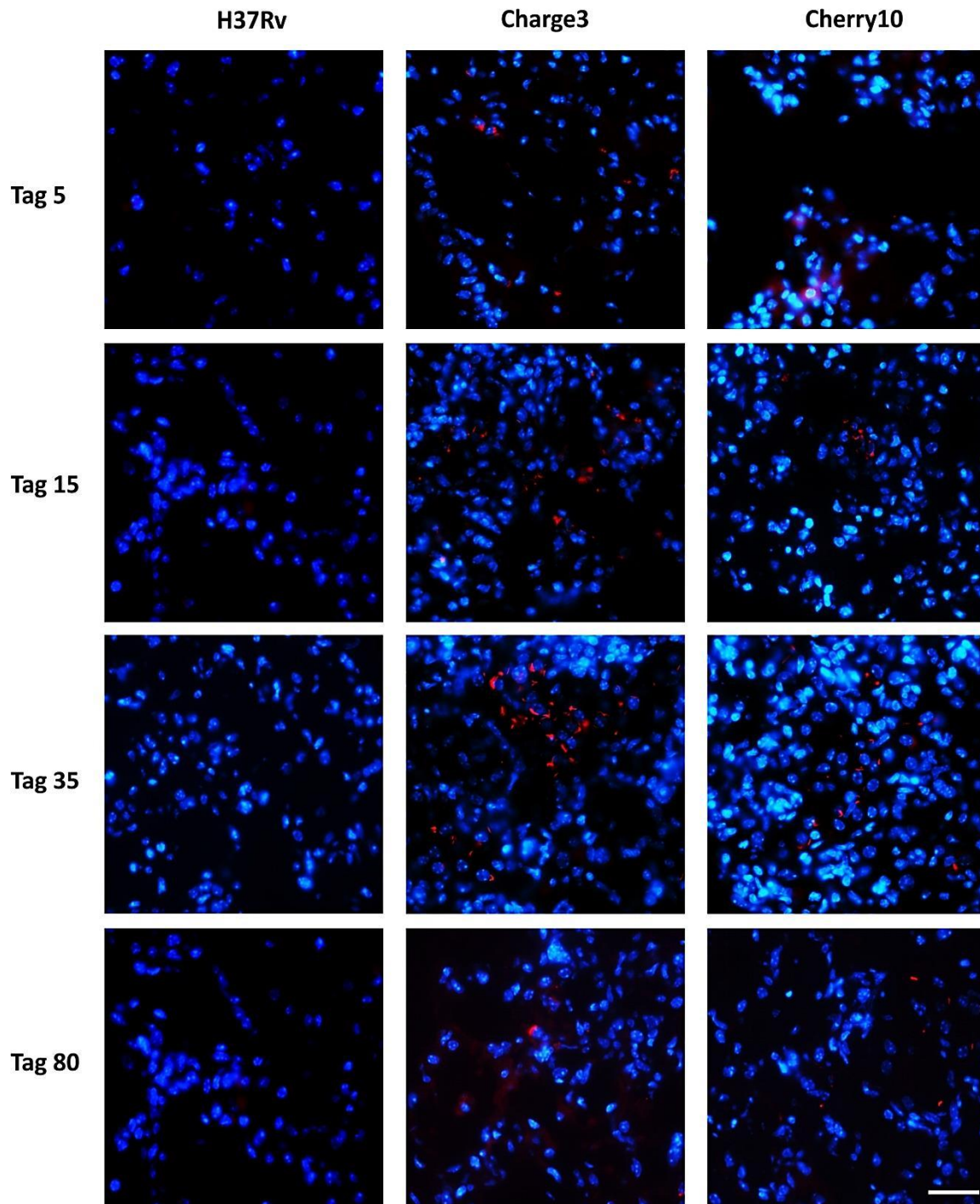


Abbildung 4.4: Nachweis der fluoreszierenden *M. tuberculosis* Charge3 bzw. Cherry3 Bakterien in den Lungen immunkompetenter SKH-1 Mäuse.

An Tag 5, 15, 35 und 80 nach Infektion wurde von jeweils 3 Mäusen pro Gruppe das Lungengewebe entnommen und mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden von den Präparaten Gefrierschnitte angefertigt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Darstellung in Falschfarben: in Blau: Zellkerne (DAPI), in Rot: fluoreszierende *M. tuberculosis* Charge3 bzw. Cherry3 Bakterien. Aufnahme mit dem Objektiv 60x, Größenmaßstab: 20 μm .

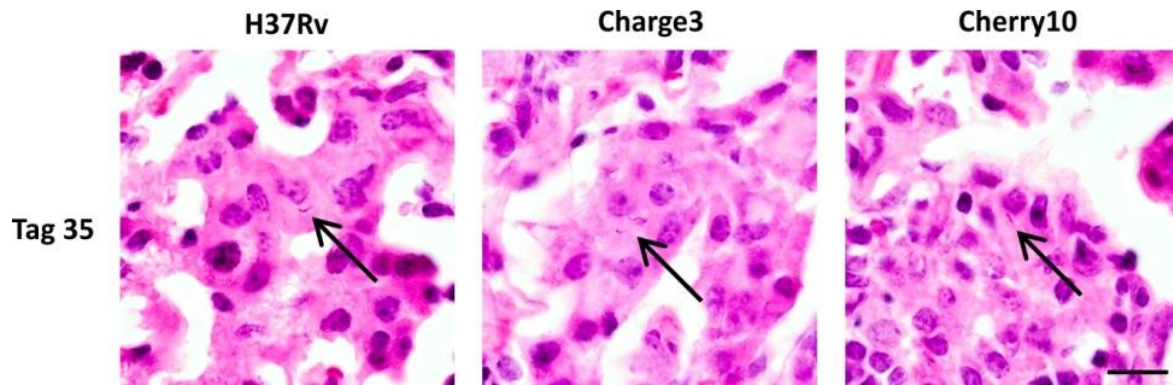


Abbildung 4.5: Nachweis von *M. tuberculosis* H37Rv, Charge3 und Cherry10 im Lungengewebe immunkompetenter SKH-1 Mäuse anhand der Anfärbung der säurefesten Mykobakterien.

35 Tage nach der Infektion wurde jeweils 3 Mäusen pro Gruppe das Lungengewebe entnommen und mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden von allen Präparaten Gefrierschnitte angefertigt und nach der Anfärbung der säurefesten Mykobakterien lichtmikroskopisch untersucht. Aufnahme mit dem Objektiv 40x, Größenmaßstab: 10 μm .

4.1.3 Nutzbarkeit von *M. tuberculosis* FFlucRT in immunkompetenten Mäusen.

Alternativ zu den fluoreszierenden Reporterstämmen wurde der lumineszierende *M. tuberculosis* FFlucRT Stamm auf seine Eignung als Reporterstamm für den Einsatz in der IVIS Bildgebung getestet.

Vor der Analyse des lumineszierenden Stamms im Tier erfolgte eine *in vitro* Analyse zur Leuchtkraft der *M. tuberculosis* FFlucRT Bakterien. Dazu wurde die Bakteriensuspension in Verdünnungsschritten von 1:2 in eine schwarze Mikrotiterplatte austitriert. Zu den Mykobakterien wurden 50 μl einer 50 mg/ml Substrat (Luciferin)-Lösung dazupipettiert und anschließend im IVIS gemessen (Abb. 4.6 C). Die Anfangskonzentration der Mykobakterien betrug 25×10^7 KBE pro Plattenvertiefung. Resultierend konnte eine kontinuierliche Abnahme der Lumineszenz *in vitro* beobachtet werden.

Zur Untersuchung von Virulenz, Wachstumskinetik und histopathologischen Veränderungen wurden die BALB/c Mäuse mit *M. tuberculosis* FFlucRT mit der Dosis $6,5 \times 10^3$ Bakterien/Maus intranasal infiziert. Der zeitliche Verlauf der Infektion wurde mithilfe von IVIS Bildgebung verfolgt. Dabei wurde die Lumineszenz mit der durch KBE ermittelte Keimlast verglichen. Als Referenzstamm diente *M. tuberculosis* H37Rv (Infektionsdosis: 7×10^3 Bakterien/Maus).

Zum Nachweis von *M. tuberculosis* FFlucRT wurde das Substrat Luciferin (500 mg/kg Mausgewicht) intraperitoneal verabreicht. Die Lumineszenz wurde 5, 15 und 30 Minuten nach der Verabreichung des Substrats im IVIS gemessen. Im Verlauf des gesamten Experiments konnte keine Lumineszenz in lebenden Tieren nachgewiesen werden. An Tag 5, 15, 34 und 80 nach der Infektion wurden den

Tieren die Lungen entnommen und unmittelbar danach im IVIS gemessen (Abb. 4.6). An Tag 5 waren in den Lungen keine Lumineszenzsignale zu verzeichnen, da sich die Bakterienzahl unter dem Detektionslimit befand. An Tag 15 nach der Infektion konnten in den Lungen die ersten Lumineszenzsignale gemessen werden (Abb. 4.6 B). Im weiteren Infektionsverlauf, an Tag 34, war eine Abnahme der Lumineszenz zu beobachten. Am letzten Zeitpunkt der Messung (Tag 80) konnte keine Lumineszenz festgestellt werden. An Tag 35 und 80 nach Infektion wurde das Substrat Luciferin (50 µl einer 50 mg/ml PBS-Lösung) auf die isolierten Lungen gegeben, damit das Substrat besser in das Lungengewebe diffundieren und das Enzym Luciferase in den Mykobakterien erreichen kann. 5 Minuten nach der erneuten Gabe des Substrats konnte eine Zunahme der Lumineszenz an Tag 35 der Infektion festgestellt werden. An Tag 80 nach der Infektion konnte jedoch durch erneute Zugabe von Luciferin keine Verstärkung der Lumineszenz beobachtet werden (Abb. 4.6 D).

Die Bakterienzahl in den Lungen der mit *M. tuberculosis* FFlucRT infizierten Tiere war im Vergleich zu der Keimzahl in den Lungen der mit dem Wildtypstamm *M. tuberculosis* H37Rv infizierten Tiere (ausgenommen des ersten Untersuchungszeitpunkts (Tag 5)) um eine bis zwei logarithmische Stufen niedriger. Im zeitlichen Verlauf der Infektion war ab dem Tag 34 eine Reduktion der Keimzahl zu beobachten (Abb. 4.6 E).

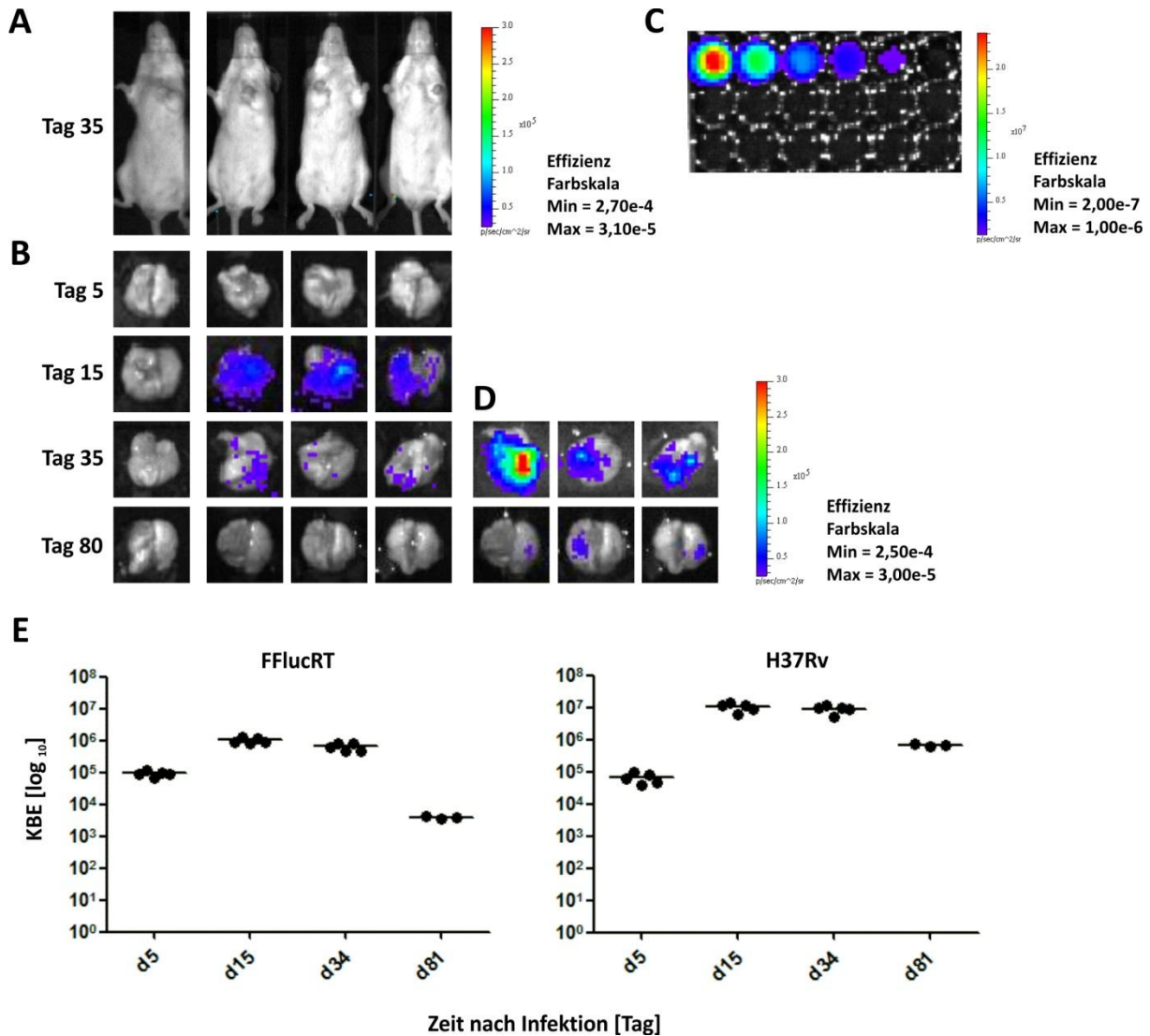


Abbildung 4.6: Nachweis des *M. tuberculosis* Reporterstamms FFlucRT in immunkompetenten BALB/c Mäusen.

Gruppen von SKH-1 Mäusen ($n=5$) wurden intranasal mit dem Reporterstamm *M. tuberculosis* FFluc bzw. Referenzstamm *M. tuberculosis* H37Rv (Infektionsdosis: 7×10^3 Bakterien/Maus intranasal infiziert: Infektionsdosis $6,5 \times 10^3$ Bakterien/Maus. Lumineszenzsignale wurden mittels IVIS Bildgebungsverfahren einmal pro Woche über einen Zeitraum von 81 Tagen gemessen. Dargestellt sind die Lumineszenzsignale drei repräsentativer Mäuse (**A**) bzw. deren Lungen (**B**, **C**, **D**), die an Tag 5, 15, 35 und 81 nach der Infektion im IVIS aufgenommen wurden. Bildgebungsparameter: Anregung 570 nm, Emission 660 nm, f-stop: 1,2, Anregungszeit: 5 min. Lumineszenzintensität ist als $s^{-1}cm^{-2}sr^{-1}$ in Falschfarben dargestellt. Signale in Gelb repräsentieren Fluoreszenz der höchsten Intensität, wobei Signale in Blau eine niedrigere Fluoreszenzintensität bedeuten. Die Keimlast wurde in den Lungen zu den dargestellten Zeitpunkten nach der Infektion bestimmt. (**D**) Die Lumineszenz wurde 5 min der erneuten Gabe von Luciferin unter den gleichen Parametern wie bei (**B**) gemessen. Die Keimlast wurde in der Lunge zu den dargestellten Zeitpunkten nach der Infektion bestimmt (**E**). Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte; $n = 5$. Bakterien suspensionen wurden in Verdünnungsschritten von 1:2 angesetzt und die Lumineszenz anhand IVIS Bildgebung gemessen. Anfangskonzentration der Bakterien: 25×10^7 KBE pro Plattenvertiefung. Bildgebungsparameter: Anregung: 570 nm, Emission: 660 nm, f-stop 1,2, Anregungszeit: 1 s.

4.2 Analyse der Schutzwirkung des Impfstoffs H56-CAF01 nach subkutaner und intranasaler Impfstoffverabreichung im Mausmodell der Tuberkulose

4.2.1 Analyse der Schutzwirkung von H56-CAF01 als Prime-Impfstoff

Dieser Teil der Arbeit befasst sich mit der bildgebenden Analyse der Schutzwirkung des rekombinanten Spaltvakzins H56 (Ag85B-ESAT6-Rv2660c (SSI, Kopenhagen) in einem Mausmodell der Tuberkulose. H56 wurde in Kombination mit dem Liposomen-basierten Adjuvans CAF01 verabreicht. In diesen Untersuchungen wurde die Schutzwirkung von H56-CAF01 als Prime-(Grundimmunisierungs)-Impfstoff mithilfe von IVIS Bildgebung getestet. Hierzu wurde ein fluoreszierender rekombinanter Reporterstamm des Tuberkuloseerregers *M. tuberculosis* Charge3 eingesetzt. Dieser Stamm hat sich in vorangegangenen Studien für die bildliche Darstellung von Infektionsprozessen in unseren Tiermodellen als optimal erwiesen (s. 4.1.1 und 4.1.2), da er im Vergleich zu den anderen untersuchten *M. tuberculosis* Reporterstämmen die höchste Fluoreszenz im lebenden Tier (SCID) sowie in isolierten Lungen der SKH-1 Mäuse aufwies. Dieser Ansatz sollte dazu beitragen, dass die Schutzwirkung anhand des Reportersignals direkt in der Lunge eines individuellen Tiers über eine längere Zeit verfolgt werden kann. In unserer Gruppe wurde bereits gezeigt, dass die Wirkung von Antibiotika anhand fluoreszierender *M. tuberculosis* Reporterstämme in den Lungen der Tiere erfolgreich analysiert werden konnte [184]. Diese Methode sollte nun auch für Impfstoffanalysen etabliert werden. Außerdem sollte in dem folgenden Kapitel analysiert werden, ob die Art der Impfstoffverabreichung eine Auswirkung auf die Schutzwirkung des Impfstoffs H56-CAF01 hat. In dieser Studie wurden zwei Immunisierungsmethoden, die bisher für die Vakzinierungen gängige subkutane und die hier zu testende intranasale Verabreichung, vergleichend analysiert. Dazu wurden CB6F1 Mäuse (F1 Generation der C57BL/6 und BALB/c Mäuse) subkutan bzw. intranasal im Abstand von zwei Wochen zweimal mit dem Impfstoff H56-CAF01 immunisiert. Kontrolltiere erhielten nur den Impfstoffträger CAF01 (Abb. 4.7). 28 Tage nach der ersten Immunisierung wurden die Mäuse mit dem fluoreszierenden Reporterstamm *M. tuberculosis* Charge3 intranasal mit der Dosis $8,6 \times 10^2$ KBE pro Maus infiziert. Die erzielte Impfstoffwirkung wurde an Tag 5, 15, 30 und 61 nach der Infektion mittels IVIS Bildgebung im Vergleich zur über KBE ermittelten Keimlast untersucht. Dabei wurde die Bakterienanzahl mit der Intensität der aufgenommenen Fluoreszenz verglichen.

In der Brustregion lebender Tiere konnten während der gesamten Versuchsdauer von 61 Tagen keine Fluoreszenzsignale detektiert werden. An Tag 5, 15, 30 und 61 nach der Infektion wurden den Tieren die Lungen entnommen und die Fluoreszenz mittels IVIS Bildgebung analysiert (Abb. 4.8 A, B). Im Fall der intranasalen Impfstoffverabreichung war ein Anstieg der Mykobakterien-spezifischen Signale an Tag 30 nach der Infektion zu verzeichnen. Dabei war kein Unterschied in der Fluoreszenz der Lungen

der H56-CAF01- und CAF01-immunisierten Tiere festzustellen. Dieses Ergebnis kann darauf hindeuten, dass kein Impfschutz gegen TB durch die intranasale Vakzinierung mit H56-CAF01 erreicht wurde. Nach der subkutanen Impfstoffverabreichung war dagegen an Tag 30 der Infektion ein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenz der Lungen der H56-CAF01- und CAF01-immunisierten Tiere festzustellen, der auf die Schutzwirkung von H56-CAF01 zurückgeführt werden kann. Im weiteren Verlauf der Infektion war eine Reduktion der Fluoreszenz in den Lungen der Versuchstiere zu beobachten, wobei diese nach der subkutanen Applikation geringer ausgefallen ist (Tag 61). In Kontrollungen der Tiere, die weder immunisiert noch infiziert wurden, war keine Fluoreszenz zu detektieren.

Der Vergleich der Keimlast zeigte, dass nach der intranasalen Impfstoffverabreichung zu keinem der Zeitpunkte der Infektion ein signifikanter Unterschied in der Bakterienzahl zwischen H56-CAF01- und CAF01-immunisierten Tiere zu beobachten war. Im Fall der subkutanen Impfstoffverabreichung ließ sich eine um ca. eine logarithmische Stufe geringere Keimzahl in den Lungen der H56-CAF01-immunisierten Mäuse im Unterschied zu der Bakterienzahl der CAF01-immunisierten Tiere erkennen (Abb. 4.8 F). Die Anzahl der Bakterien korrelierte mit den gemessenen Fluoreszenzwerten.

Anhand fluoreszenzhistologischer Untersuchungen konnten lebende rot-fluoreszierende *M. tuberculosis* Charge3 Bakterien in den entzündeten Lungenregionen nachgewiesen werden (Abb 4.9). Tote Bakterien verlieren innerhalb von 2-3 Stunden ihre Fluoreszenz und können somit in der Fluoreszenzmikroskopie nicht nachgewiesen werden.

Histologische Untersuchungen mittels HE-Färbung zeigten, dass im Lungengewebe aller mit dem Adjuvans(CAF01)-immunisierten Tiere sowie im Fall der intranasalen Immunisierung mit H56-CAF01 entzündliche Infiltrate nachzuweisen waren. Im Fall der subkutanen Immunisierung mit H56-CAF01 waren jedoch keine bis wenige Bereiche mit entzündlichen Infiltrationen zu beobachten (Abb 4.10).

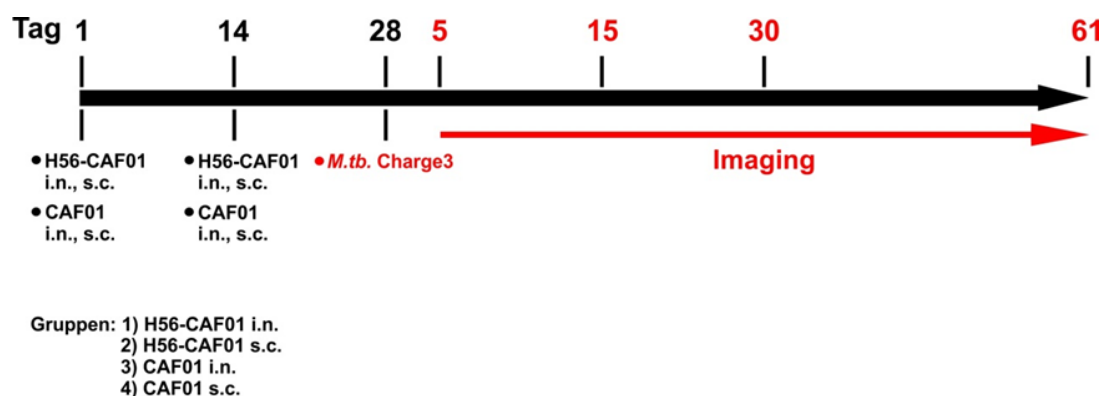


Abbildung 4.7: Versuchsaufbau zur Analyse der Schutzwirkung des H56-CAF01-Impfstoffs nach zwei unterschiedlichen Immunisierungswegen.

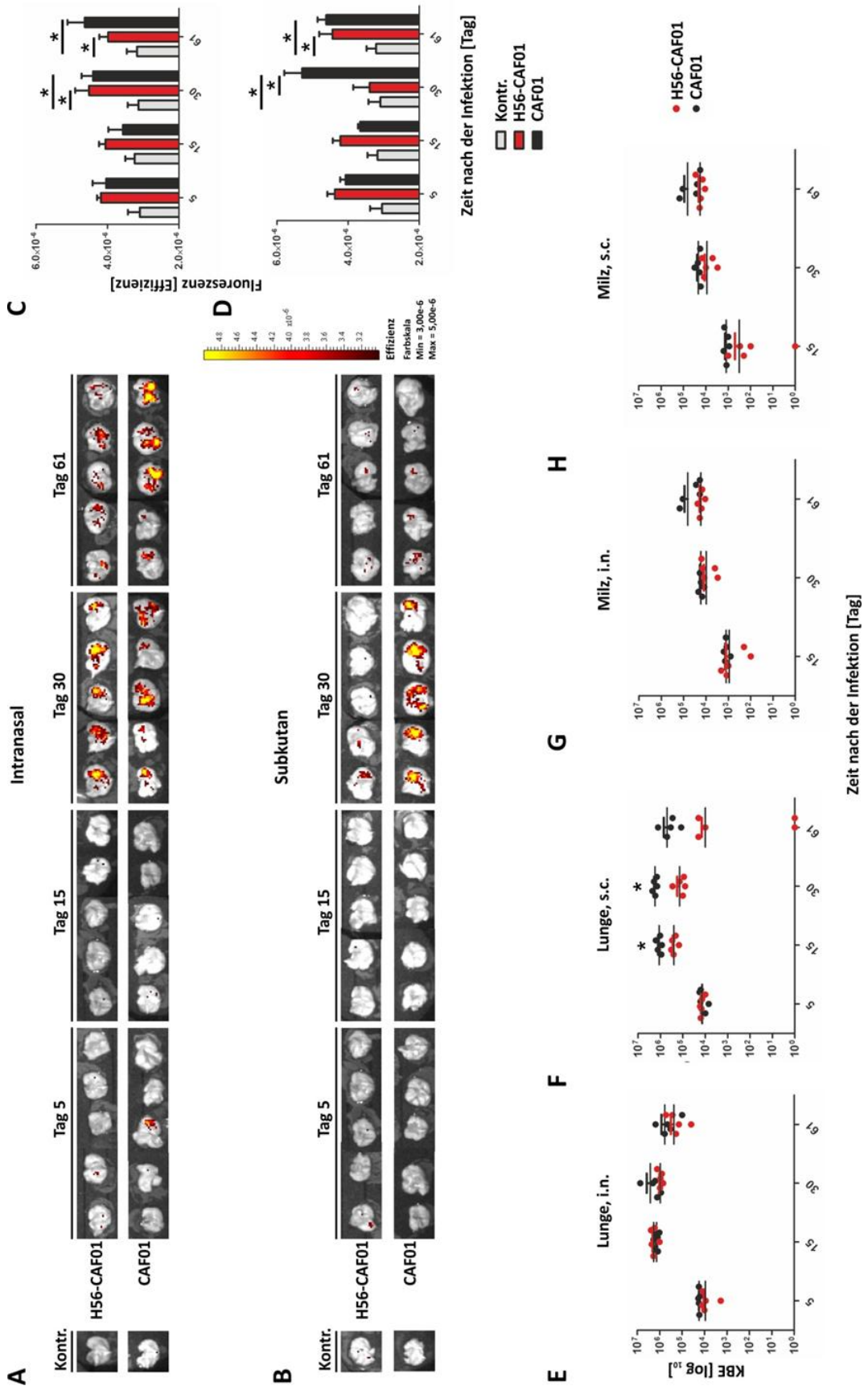


Abbildung 4.8: Die Schutzwirkung des Impfstoffs H56-CAF01 ist von der Art der Impfstoffverabreichung abhängig.

CB6F1 Mäuse (n=5) wurden im Abstand von zwei Wochen zweifach mit dem Impfstoff H56-CAF01 (10 µg H56 in 40 µl der CAF01-Lösung (1,25 mg/ml DDA und 0,5 mg/ml TDB)/Maus) intranasal bzw. subkutan (5 µg H56 in 40 µl der CAF01-Lösung (1,25 mg/ml DDA und 0,5 mg/ml TDB)/Maus) immunisiert. Kontrollgruppen der Versuchstiere erhielten nur den Impfstoffträger CAF01 (intranasal: 40µl und subkutan 100 µl der CAF01-Lösung (1,25 mg/ml DDA und 0,5 mg/ml TDB)). An Tag 28 nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse mit *M. tuberculosis* Charge3 infiziert (Infektionsdosis: $0,86 \times 10^3$ KBE/Maus). Anschließend wurde die Impfstoffwirkung an Tag 5, 15, 30 und 61 nach der Infektion im IVIS nach intranasaler (A) bzw. nach subkutaner (B) Impfstoffverabreichung untersucht. Kontrollgruppen (Kontr.) wurden weder immunisiert, noch infiziert. Als Kontrollen (Kontr.) sind Lungen der Versuchstiere zum Zeitpunkt Tag 35 nach der Infektion dargestellt. Bildgebungsparameter: Anregung 605 nm; Emission 660 nm; f-stop: 1.2; Anregungszeit: 1 s. Für die Aufnahme unspezifischer Fluoreszenzsignale wurde der Anregungsfilter 500 nm benutzt. Fluoreszenzintensität ist als Effizienz in Falschfarben dargestellt. Signale in Gelb repräsentieren die Fluoreszenz der höchsten Intensität, wobei Signale in Dunkelrot eine niedrigere Fluoreszenzintensität bedeuten. Abbildungen wurden mit Hilfe der Image Math Tool normiert. (C, D) Fluoreszenz isolierter Lungen nach intranasaler Impfstoffverabreichung (n=5). Die Keimlast wurde in Lunge (E, F) und Milz (G, H) zu den dargestellten Zeitpunkten nach der Infektion bestimmt. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte; *p < 0,05; **p < 0,01, ***p < 0,001.

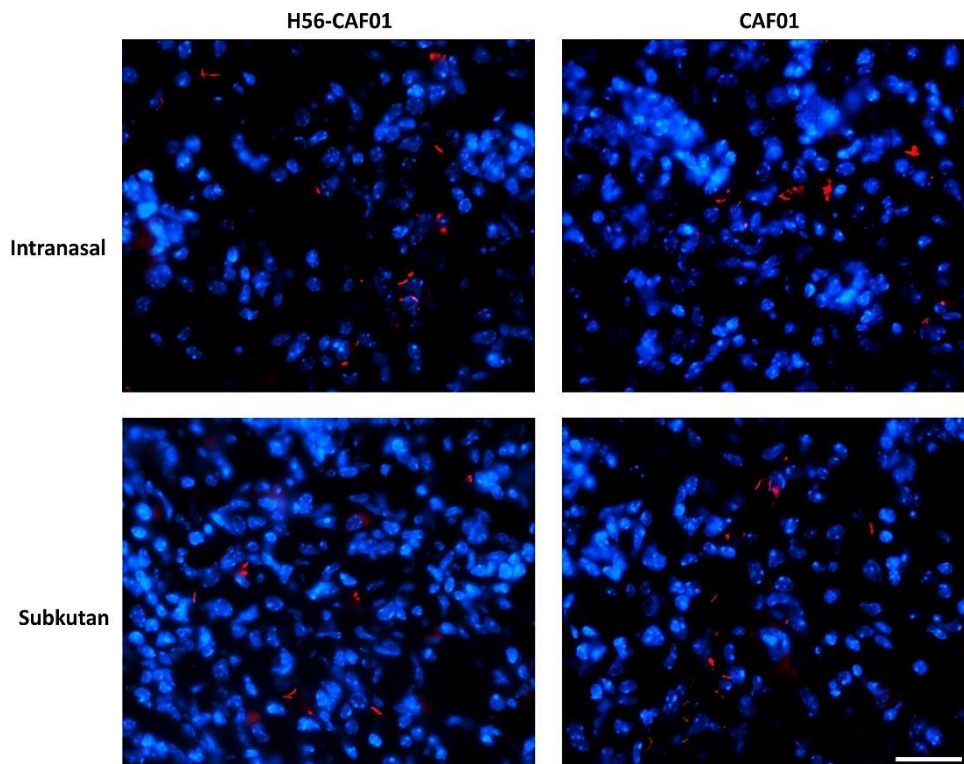


Abbildung 4.9: Nachweis fluoreszierender *M. tuberculosis* Charge3 Bakterien im Lungengewebe der CB6F1 Mäuse.

An Tag 5, 15, 30 und 61 nach der Infektion wurde von jeweils 3 Mäusen pro Gruppe das Lungengewebe entnommen und mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Gefrierschnitte der Lungenpräparate angefertigt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dargestellt ist das Lungengewebe mit H56-CAF01- bzw. CAF01-immunisierter Mäuse nach intranasaler bzw. subkutaner Impfstoffverabreichung an Tag 30 nach Infektion. Darstellung in Falschfarben: in Blau: Zellkerne (DAPI), in Rot: fluoreszierende *M. tuberculosis* Charge3 Bakterien. Aufnahme mit dem Objektiv 100x, Größenmaßstab: 10 µm.

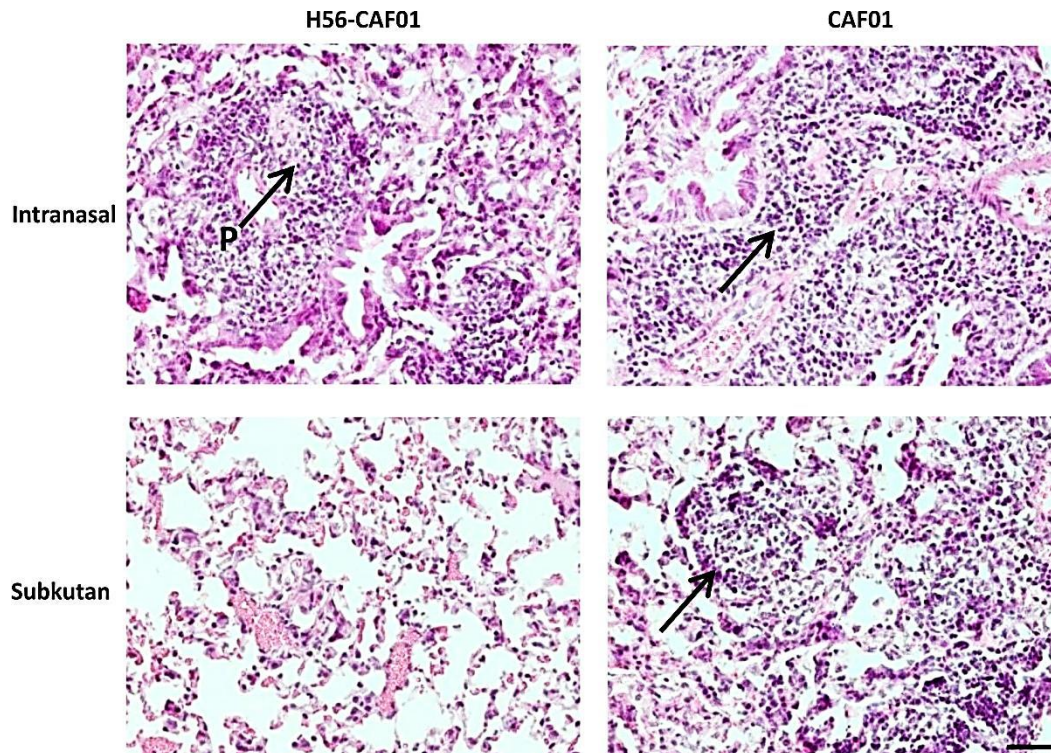


Abbildung 4.10: Entzündliche Infiltrate in den Lungen immunisierter Mäuse.

An Tag 5, 15, 30 und 61 nach der Infektion wurde von jeweils 3 Mäusen das Lungengewebe entnommen und mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden von den Präparaten Gefrierschnitte angefertigt und nach der HE-Färbung mikroskopisch untersucht. Dargestellt ist das Lungengewebe H56-CAF01- bzw. CAF01- immunisierter Mäuse nach intranasaler und subkutaner Impfstoffverabreichung an Tag 30 nach Infektion. Aufnahme mit dem Objektiv 40x, Größenmaßstab: 30 μm . Pfeile: Infiltration entzündlicher Zellen.

4.2.2 Analyse der Schutzimpfung des Impfstoffs H56-CAF01 im Mausmodell der Tuberkulose nach Grundimmunisierung mit BCG

In dieser Studie wurde die Schutzwirkung von H56-CAF01 auf seine Eignung als Boost-(Nachimmunisierungs)-Impfstoff mittels IVIS Bildgebung anhand des fluoreszierenden Reporterstammes *M. tuberculosis* Charge3 in der Maus untersucht. Dabei wurden wieder zwei Applikationswege (subkutan gegenüber intranasal) miteinander verglichen. Dazu wurde vier Gruppen von CB6F1 Mäusen zunächst BCG als Grundimmunisierung (Prime-Immunsierung) verabreicht (1×10^3 KBE/Maus), anschließend erfolgten im Abstand von zwei Wochen zwei weitere Boost-(Nach)-Immunsierungen mit H56-CAF01 bzw. mit dem Impfstoffträger CAF01 alleine. Eine Gruppe der Versuchstiere wurde nicht immunisiert. Nach 42 Tagen wurden alle Versuchstiere mit *M. tuberculosis* Charge3 intranasal infiziert. Die erzielte Impfstoffwirkung wurde an Tag 5, 15, 30 und 60 nach der Infektion mittels IVIS Bildgebung und anhand der durch KBE ermittelten Keimlast untersucht. Dabei wurde die Bakterienzahl mit der Intensität der aufgenommenen Reportersignale verglichen (Abb. 4.11 und 4.12). Kontrolltiere wurden weder immunisiert, noch infiziert.

In den Lungenbereichen lebender Mäuse konnte zu keinem der dargestellten Zeitpunkte des Experiments Fluoreszenz gemessen werden, da die Fluoreszenzsignale der Bakterien beim Wandern durch das Gewebe abgeschwächt wurden und die Oberfläche der Brustregion nicht erreichen konnten, wo sie mit der CCD-Kamera des IVIS Geräts detektierbar wären. Daraufhin wurden den Tieren an den dargestellten Zeitpunkten nach der Infektion die Lungen entnommen und im IVIS analysiert (Abb. 4.12 A-C). Im Vergleich zur subkutanen Applikation wurden im Fall der intranasalen Vakzinierung höhere Fluoreszenzwerte in den Lungen der mit H56-CAF01 geimpften Tiere gemessen. Im Fall der subkutanen Immunisierung konnten im Lauf des Experiments sehr schwache Fluoreszenzsignale gemessen werden (Abb. 4.12 B). Die Fluoreszenz der Lungen nicht geimpfter, jedoch mit *M. tuberculosis* Charge3 infizierter Tiere stieg bis zum Tag 30 der Infektion an, an Tag 60 war eine leichte, nicht signifikante, Verminderung der Fluoreszenz zu verzeichnen. In Kontrolllungen der Tiere, die weder immunisiert noch infiziert wurden, war keine Fluoreszenz zu detektieren.

Der Vergleich der Keimlast zeigte, dass nach intranasaler Impfstoffverabreichung zu keinem der Zeitpunkte der Infektion ein signifikanter Unterschied in der Bakterienzahl zwischen H56-CAF01- und CAF01-immunisierten Tieren zu beobachten war. Im Fall der subkutanen Impfstoffverabreichung war die Keimzahl in den Lungen der H56-CAF01-immunisierten Mäuse im Vergleich zu der Bakterienzahl der CAF01-immunisierten Tiere nicht signifikant, um eine halbe logarithmische Stufe, verringert (Abb. 4.8 G). Die Anzahl der Bakterien korrelierte mit den gemessenen Fluoreszenzwerten. Anhand fluoreszenzhistologischer Untersuchungen konnten lebende fluoreszierende *M. tuberculosis* Charge3 Bakterien in den inflammatorischen Lungenregionen detektiert werden (Abb 4.13). Histologische Untersuchungen mittels HE-Färbung zeigten, dass im Lungengewebe aller mit dem Adjuvans (CAF01)-immunisierten Tiere und nach der intranasalen Immunisierung mit H56-CAF01 sowie mit *M. tuberculosis* Charge3 im Lungengewebe der infizierten Tiere entzündliche Infiltrate nachzuweisen waren. Im Fall der subkutanen Immunisierung mit H56-CAF01 waren jedoch keine bis wenige Bereiche mit entzündlichen Infiltrationen zu beobachten (Abb 4.14).

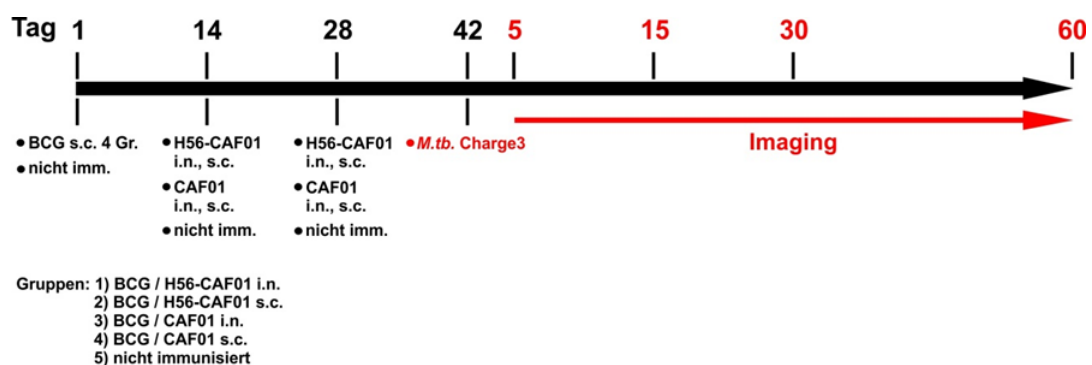


Abbildung 4.11: Versuchsaufbau zur Analyse der Schutzwirkung des H56-CAF01-Impfstoffes in zwei Immunisierungsmodellen nach der Grundimmunisierung mit BCG.

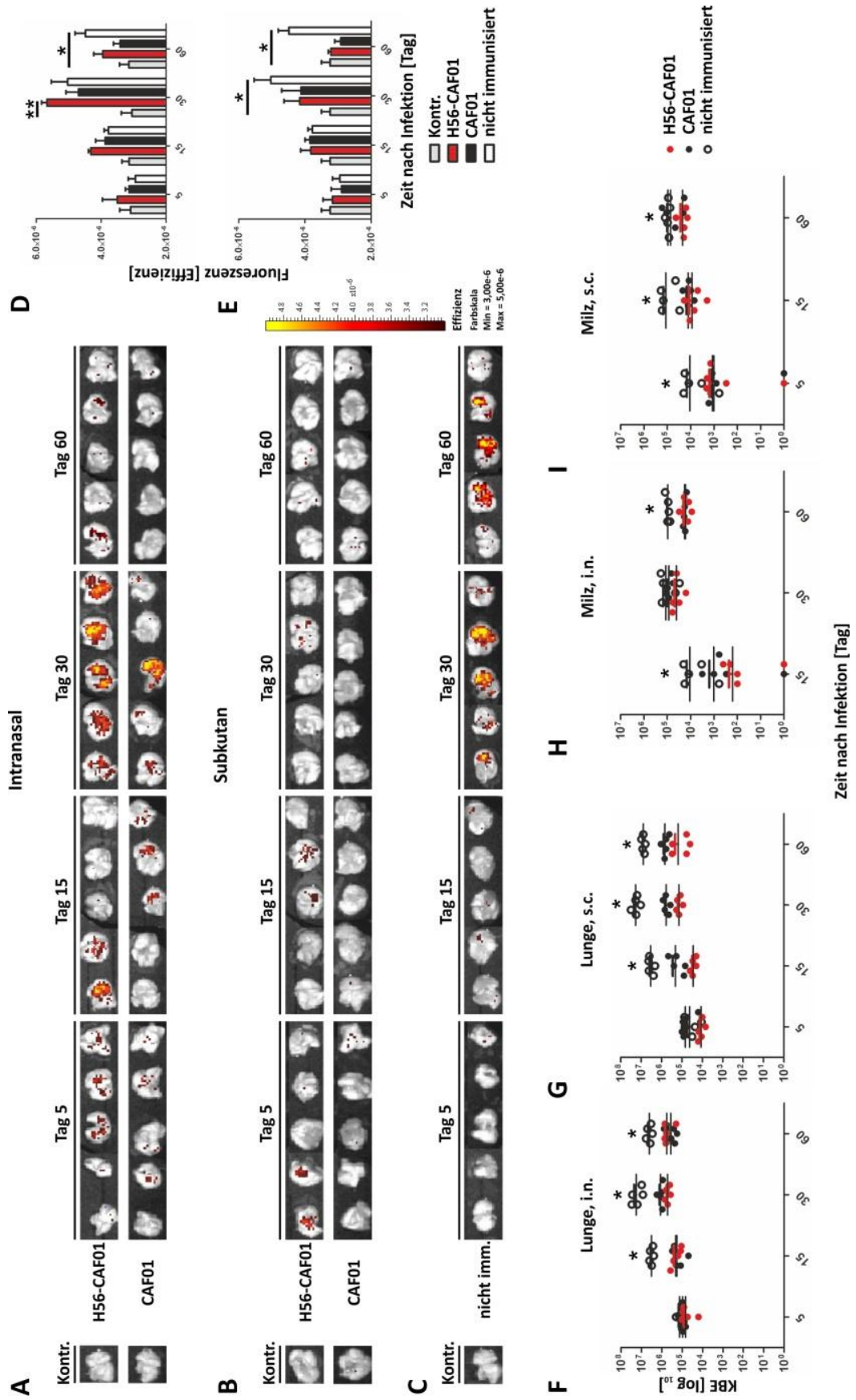


Abbildung 4.12: Schützende Wirkung des H56-CAF01-Impfstoffes nach Grundimmunisierung mit BCG.

CB6F1 Mäuse (n=5) wurden mit dem BCG Impfstoff subkutan grundimmunisiert (Dosis/Maus: 1×10^3 KBE). 14 und 28 Tage nach der BCG Immunisierung wurden die Tiere mit dem Impfstoff H56-CAF01 intranasal bzw. subkutan nachimmunisiert. 2 Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse mit dem Reporterstamm *M. tuberculosis* pCharge3 intranasal infiziert (Infektionsdosis: $0,9 \times 10^3$ KBE/Maus). Anschließend wurde die Impfstoffwirkung in den isolierten Lungen an Tag 5, 15, 30 und 60 nach der Infektion im IVIS gemessen (**A, B**). (**C**) Mäuse dieser Gruppen wurden nicht immunisiert, es erfolgte nur eine Infektion mit *M. tuberculosis* Charge3. Kontrollgruppen (Kontr.) wurden weder immunisiert noch infiziert. Als Kontrollen sind Lungen der Versuchstiere zum Zeitpunkt Tag 35 nach der Infektion dargestellt (**A, B, C**). Bildgebungsparameter: Anregung 605 nm; Emission 660 nm; f-stop: 1.2; Anregungszeit: 1 s. Für die Aufnahme unspezifischer Fluoreszenzsignale wurde der Anregungsfilter 500 nm benutzt. Fluoreszenzintensität ist als Effizienz in Falschfarben dargestellt. Signale in Gelb repräsentieren die Fluoreszenz der höchsten Intensität, wobei Signale in Dunkelrot eine niedrigere Fluoreszenzintensität bedeuten. Aufgenommene Bilder wurden mit Hilfe der Image Math Tool normiert. Fluoreszenz isolierter Lungen nach intranasaler (**D**) bzw. subkutaner (**E**) Impfstoffverabreichung (n=5). Die Keimlast wurde in Lunge (**F, G**) und Milz (**H, I**) zu den dargestellten Zeitpunkten nach der Infektion bestimmt. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen; *p < 0,05; **p < 0,01, ***p < 0,001.

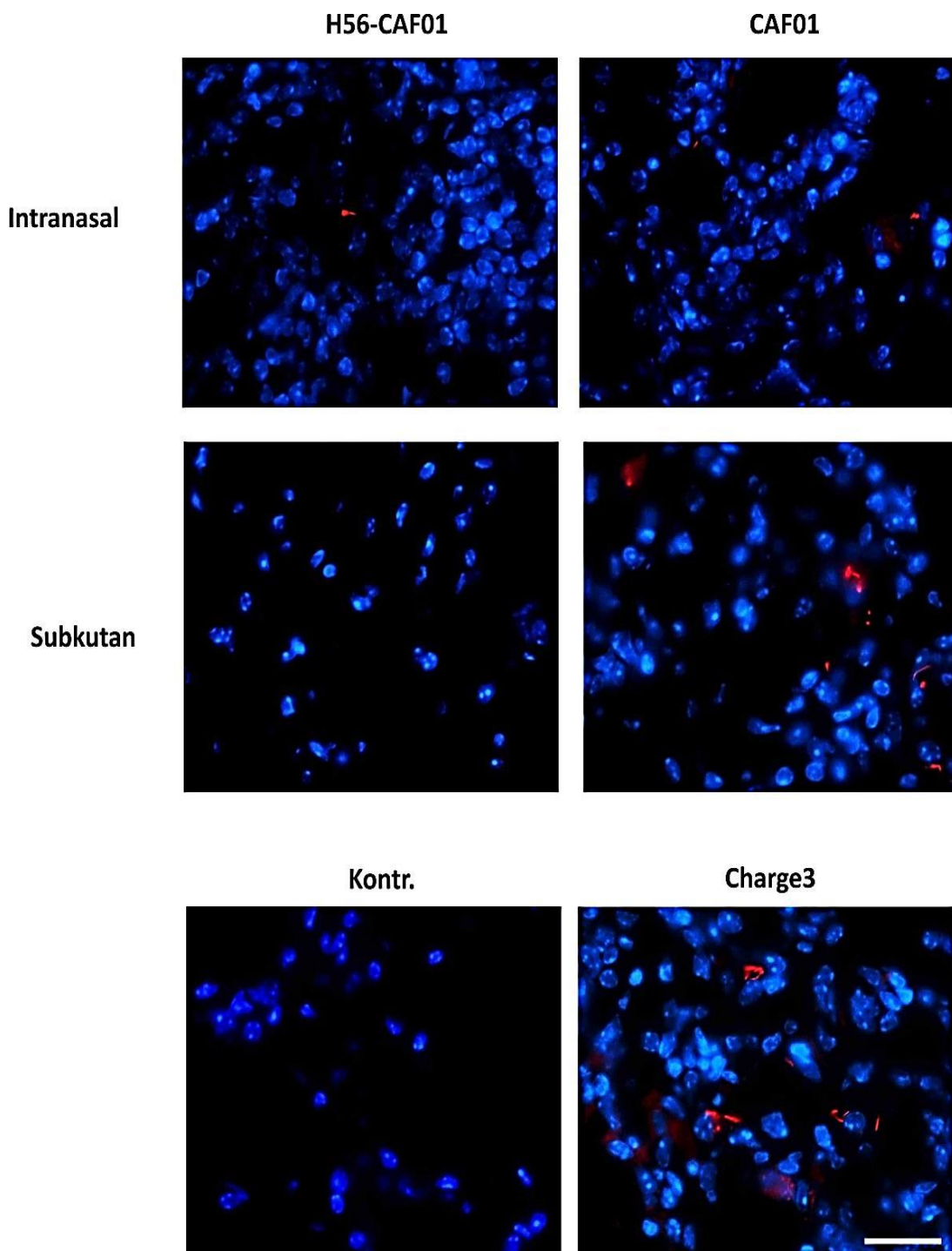


Abbildung 4.13: Nachweis der fluoreszierenden *Mtb* Charge3 Bakterien im Lungengewebe der CB6F1 Mäuse. An Tag 5, 15, 30 und 60 nach der Infektion wurde von jeweils 3 Mäusen pro Gruppe das Lungengewebe entnommen und mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Gefrierschnitte der Lungenpräparate angefertigt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dargestellt ist das Lungengewebe mit H56-CAF01 bzw. CAF01 behandelter Mäuse nach intranasaler und subkutaner Impfstoffverabreichung an Tag 30 nach der Infektion. Kontrolllungen (Kontr.) wurden weder immunisiert noch infiziert. Originalvergrößerung 600x. In Rot: fluoreszierende *M. tuberculosis* Bakterien Charge3. Aufnahme mit dem Objektiv 100x, Größenmaßstab: 25 μm .

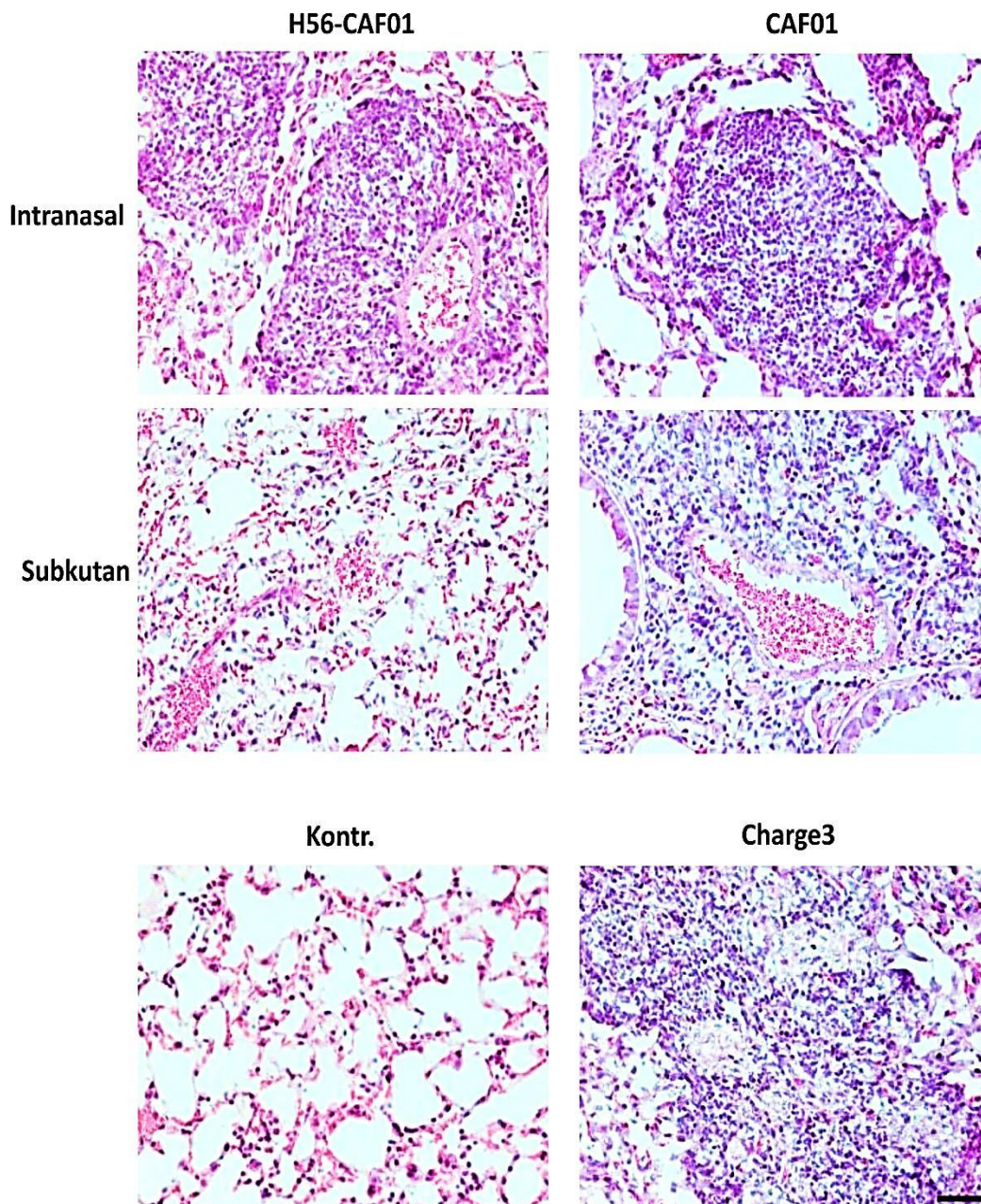


Abbildung 4.14: Nachweis der *M. tuberculosis* Charge3 Bakterien im Lungengewebe der CB6F1 Mäuse.

An tag 5, 15, 30 und 60 nach der Infektion wurde von jeweils 3 Mäusen das Lungengewebe entnommen und mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden von den Präparaten Gefrierschnitte angefertigt und nach der HE-Färbung mikroskopisch untersucht. Dargestellt ist das Lungengewebe mit H56-CAF01 bzw. CAF01 immunisierter Mäuse nach intranasaler und subkutaner Impfstoffverabreichung an Tag 30 nach der Infektion. Aufnahme mit dem Objektiv 40x, Größenmaßstab: 50 µm

4.3 Zeitliche und räumliche Verteilung des Impfstoffträgers CAF01

4.3.1 Herstellung und Analyse des fluoreszierenden CAF01

Der Verabreichungsort eines Impfstoffs, seine Verteilung, d.h. der Transport eines Impfstoffes zu den immunologisch relevanten Organen (drainierende Lymphknoten, Milz) bzw. seine Verteilung im Zielorgan (z.B. Lunge), ebenso wie seine Verteilungsgeschwindigkeit und Verweildauer im Gewebe (Depotbildung) können die Immunantwort beeinflussen [196]. Zur Visualisierung dieser Prozesse in der Maus und ihren Organen wurde der Impfstoffträger CAF01 mit fluoreszierenden Halbleiter-Nanokristallen (Quantum Dots, QDots) markiert (Abb. 4.15) und nach intranasaler bzw. subkutaner Verabreichung mittels IVIS Bildgebung analysiert. Als Modellantigen wurde Ovalalbumin (Ova) verwendet. Das Ovalbumin wurde mittels EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) kovalent an die Quantum Dots gekoppelt (s. 3.4.1). Die QDot-Ova-Konjugate wurden mit CAF01 vermischt, so dass die Verabreichungsdosen für die intranasale bzw. subkutane Applikation jeweils 20 bzw. 100 pmol QDots enthielten. Das Gesamtvolumen einer Dosis für die intranasale Applikation betrug 30 μ l und für die subkutane Impfstoffverabreichung 100 μ l. Die Konzentrationen der Bestandteile des Vakzinträgers CAF01, DDA und TDB, waren mit 250 μ g DDA und 50 μ g TDB in jeder Verabreichungsdosis dieselben. Einzelne Dosen (QDot-Ova-CAF01 bzw. QDot-CAF01 (ohne Protein)) sowie QDot-Ova Konjugate (ohne Impfstoffträger) wurden bei 30 000 \times g für 15 min (4°C) zentrifugiert. Pellets und entsprechende Überstände wurden anschließend im Western Blot analysiert (Abb. 4.16). In den jeweiligen Überständen waren weder fluoreszierende QDots noch ungebundenes Ova nachweisbar (Bahnen 4, 6, 8, 10 und 12). Weiterhin war zu beobachten, dass das Wandern der QDot-haltigen CAF01 im SDS-PAGE Gel durch das Protein beeinflusst war. QDot-CAF01 verblieben während der Elektrophorese in den Geltaschen, wobei proteinhaltige QDot-Ova-CAF01 Formulierungen besser im Gel wandern konnten. Das kann an der erhöhten Löslichkeit von QDot-Ova-CAF01 durch das Protein liegen. Im Weiteren wurde die Fluoreszenz einzelner Verabreichungsdosen im IVIS nachgewiesen (Abb. 4.17). Die Abb. 4.18 zeigt den Nachweis von Ova im Lungengewebe nach intranasaler Verabreichung. Dabei ist eine Kolo-kalisation von QDot und Ova zu beobachten, was auf eine erfolgreiche und stabile Kopplung von Ova an die QDots hindeutet.

Die zeitliche Verteilung der fluoreszierenden Impfdosen in der Maus wurde in nachfolgenden Experimenten mittels IVIS Bildgebung untersucht. Die Anwendung dieser neuen Technologie, mit der sich die Verteilung und die Quantifizierung von QDots-markierten Substanzen im gleichen Tier zeitlich beobachten lässt, soll dazu beitragen, die Entwicklung und Verbesserung neuer Vakzine gegen Infektionskrankheiten, insbesondere der Tuberkulose, voranzutreiben. Die Erkenntnisse aus diesen

Studien sollten dazu dienen, aus den zwei Verabreichungs-Methoden, subkutan gegenüber intranasal, die optimalste für CAF01 als Impfstoff-Träger zu ermitteln.

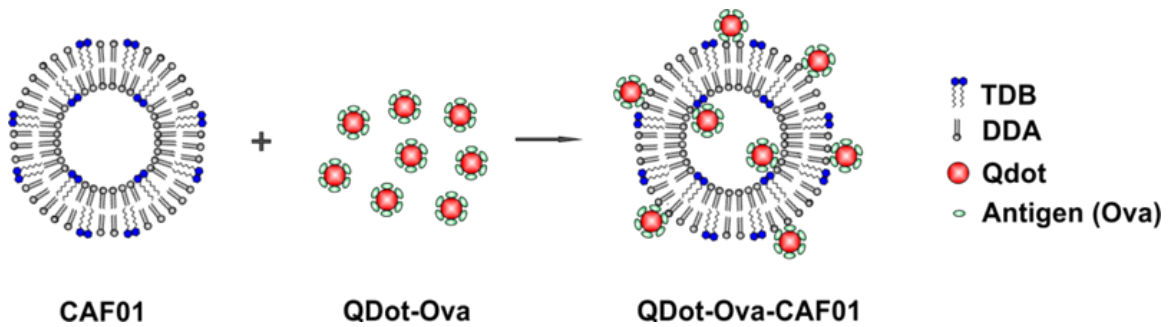


Abbildung 4.15: Herstellung der fluoreszierenden QDot-Ova-CAF01 Konjugate.

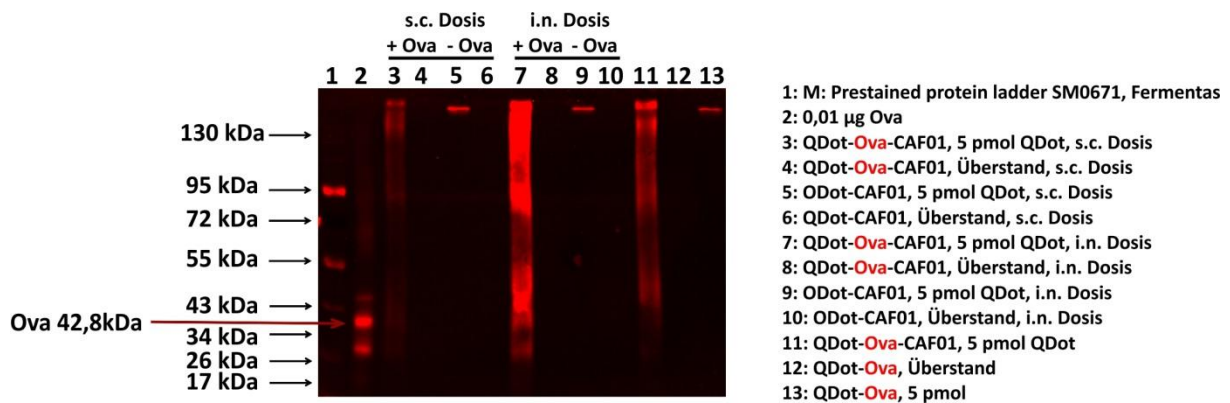


Abbildung 4.16: Western Blot Analyse der fluoreszierenden QDot-Ova-CAF01 Konjugate.

Die QDot-Ova-CAF01 Konjugate wurden wie im Methodenteil (s. Seite 27) beschrieben hergestellt. Nach der Ultrazentrifugation (15 min, 4°C, 30 000 x g) wurden die jeweiligen Sedimente bzw. die Überstände im Western Blot analysiert. Nach der Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran wurden freie Bindungsstellen mit 5 % MPBS blockiert (90 min, RT). Danach erfolgte die erste Inkubation mit dem anti-Ova Antikörper (ÜN, 4°C, Verd. 1:200, Schütteln). Nach dem Waschen der Membran in 0,001 %-igem TBS erfolgte die zweite Inkubation mit dem sekundären Antikörper IRDye 700 (40 min, Verd. 1:1000, RT, Schütteln). Zur Detektion der Fluoreszenzsignale wurde das Odyssey Infrared Imaging System der Firma LI-COR® Bioscience benutzt.

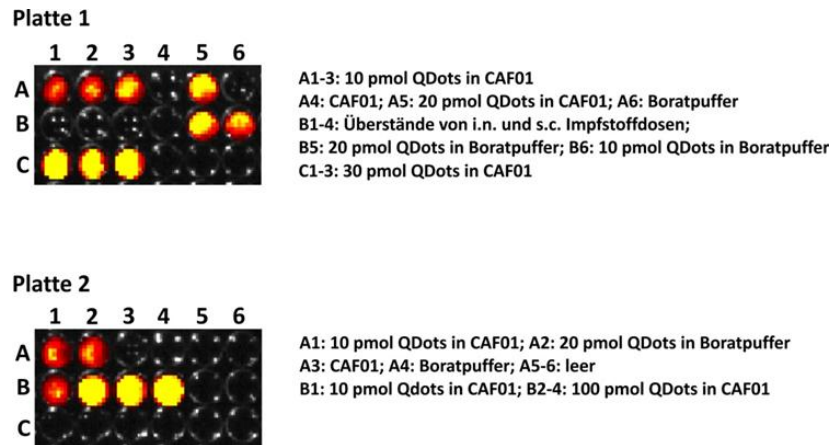


Abbildung 4.17: Test der fluoreszierenden QDot-Ova-CAF01 Formulierungen im IVIS.

Die Fluoreszenz einzelner Verabreichungsdosen wurde mittels IVIS Bildgebung analysiert. Bildgebungsparameter: Anregung 560 nm, Emission 700 nm, f-stop: 1,2, Anregungszeit 0.5 s. Diese Analyse wurde 3-fach wiederholt.

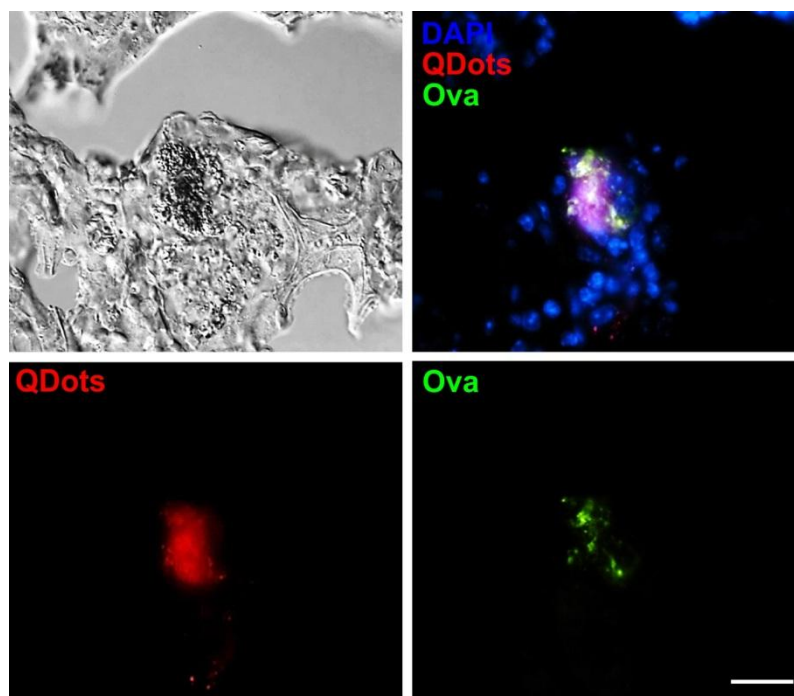


Abbildung 4.18: Nachweis von Ovalbumin im Lungengewebe.

SKH1-Mäusen (n=5) wurden fluoreszierende Impfstoffträger QDot-Ova-CAF01 (20 pmol QDots und 5 µg Ova/Dosis) intranasal verabreicht. An Tag 1 nach der Verabreichung wurden den Tieren die Lungen entnommen und mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden von den Präparaten Gefrierschnitte angefertigt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurden jeweils 2 Kryoschnitte von 2 Mäusen gegen das Ova immunhistologisch gefärbt (1. AK: anti-Ova, Kaninchen, Verd.: 1:200; 2. AK: Cy2-conjugated Goat anti-rabbit J6 (H+L), Verd.: 1:200). Darstellung in Falschfarben: in Blau: Zellkerne (DAPI), in Grün: Ovalbumin, in Rot: QDots, Aufnahme mit dem Objektiv 20x, Größenmaßstab: 200 µm.

4.3.2 Verteilung des fluoreszenzmarkierten Impfstoffträgers CAF01 in der Maus nach intranasaler Applikation

Verteilung von fluoreszierenden CAF01 mit 20 pmol QDots/Dosis

Zur Visualisierung der zeitlichen Verteilung des fluoreszenzmarkierten Impfstoffträgers CAF01 in der Maus in Abhängigkeit von der Verabreichungsmethode (intranasal gegenüber subkutan) wurden haarlose SKH1-Mäuse eingesetzt. In dieser Studie wurde der Impfstoffträger CAF01 in einem Gemisch mit den QDot-Ova Konjugaten (QDot-Ova-CAF01) intranasal verabreicht. Darüber hinaus wurde die Fluoreszenz des Impfstoffs im Lungenbereich lebender Tiere unmittelbar nach deren Verabreichung (Tag 1), an Tag 2 und weiterhin alle 5-7 Tage nach der Verabreichung für die gesamte Versuchsdauer von 31 Tagen mittels IVIS Bildgebung gemessen. Die Fluoreszenz wurde in isolierten Organen (Lungen bzw. drainierenden Lymphknoten) an Tag 9 und 31 nach der Impfung gemessen. Zu der detaillierten Analyse der Lokalisation der mit QDots markierten Impfstoffträger und histopathologischer Veränderungen wurden die Organe anhand immunhistochemischer und fluorometrischer Methoden untersucht.

Im Brustbereich lebender Tiere konnte keine Fluoreszenz während der gesamten Versuchsdauer detektiert werden, wobei die Fluoreszenz der Lungen im geöffneten Brustraum sowie in den isolierten Lungen (Abb. 4.19 A, B) bzw. drainierenden trachealen Lymphknoten (Abb. 4.19 C) gut messbar war. An Tag 9 nach der Verabreichung war eine starke Reduktion der Fluoreszenz in den Lungen im geöffneten Brustbereich zu verzeichnen (Abb. 4.19 A). Am letzten Zeitpunkt des Experiments (Tag 31) konnte keine Fluoreszenz im geöffneten Brustraum (Abb. 4.19 A) und nur sehr schwache Fluoreszenz in den entnommenen Lungen (Abb. 4.19 B, D) detektiert werden. Der Vergleich der Fluoreszenzsignale der trachealen Lymphknoten, die an Tag 9 und 31 nach der Verabreichung aufgenommen wurden, zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 4.19 C und E). Die Lungen und Lymphknoten der Kontrolltiere, denen weder fluoreszierende noch andere Substanzen verabreicht wurden, wiesen keine Fluoreszenz auf (Abb. 4.19 B, C).

Weiterhin wurde die Verteilung von QDot-Ova-CAF01 Formulierungen im Lungengewebe mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (Abb 4.20) und anhand der HE-Färbung untersucht (Abb. 4.21). An Tag 1 und 2 nach der Verabreichung waren fluoreszierende QDots in zahlreichen Bereichen im Lungengewebe, zu beobachten. An Tag 9 und 31 des Experiments waren dagegen deutlich weniger QDots zu verzeichnen. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen mittels HE-Färbung stimmen mit den Befunden der Fluoreszenzmikroskopie überein.

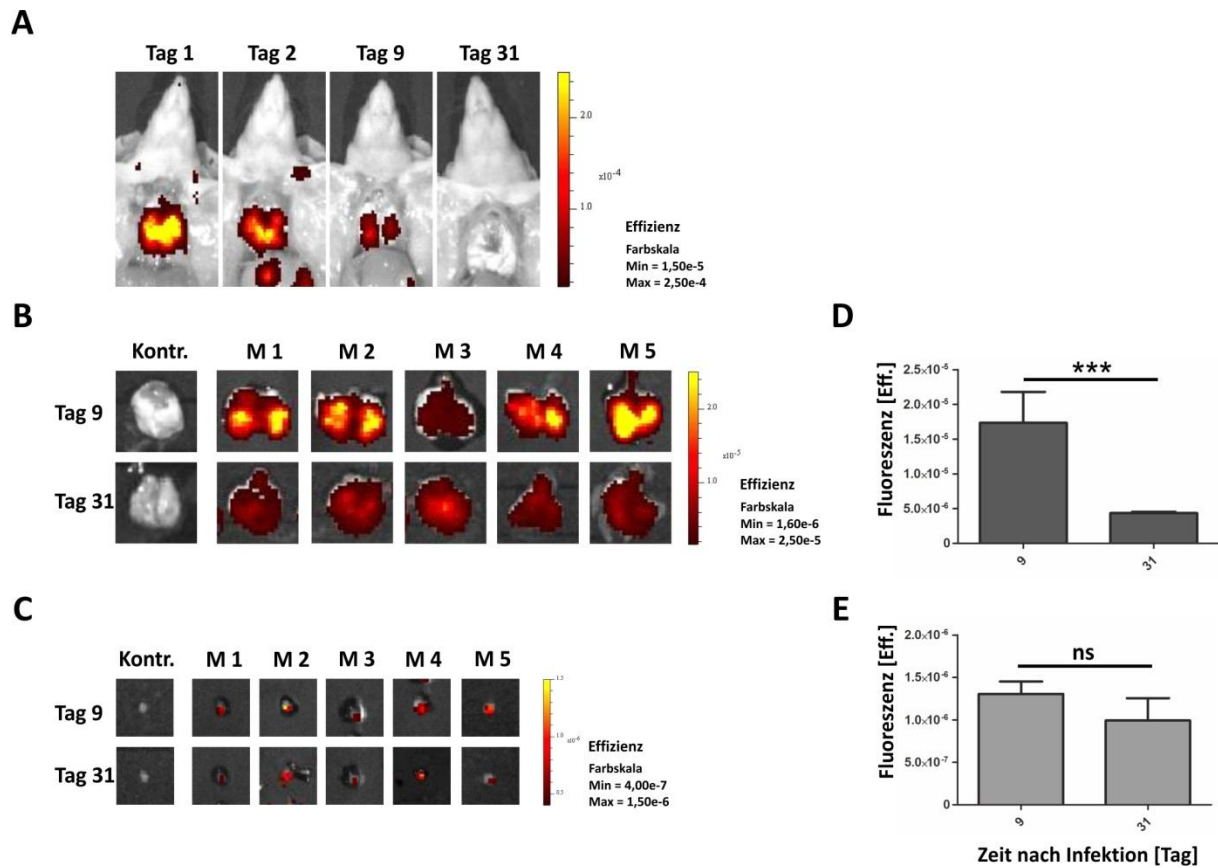


Abbildung 4.19: Zeitliche Verteilung von QDot-Ova-CAF01 (20 pmol Qdot/Dosis) in der Maus nach intranasaler Verabreichung.

SKH-1 Mäusen ($n=5$) wurde mit QDots (20 pmol/Dosis) markierter Impfstoffträger CAF01 in Kombination mit dem Proteinantigen Ova ($5 \mu\text{g}/\text{Dosis}$) intranasal verabreicht. Fluoreszenz wurde an Tag 1, 2, 9 und 31 nach der Verabreichung im geöffneten Brustbereich der Maus (A) sowie in den isolierten Lungen (B) und trachealen Lymphknoten (C) an den Tagen 9 und 31 mittels IVIS Bildgebung gemessen. Bildgebungsparameter: (Anregung 640 nm; Emission 700 nm; f-stop: 1,2; Anregungszeit: 1 s. Für die Aufnahme unspezifischer Fluoreszenzsignale wurde der Anregungsfilter 465 nm benutzt. Fluoreszenzintensität ist als Effizienz in Falschfarben dargestellt. Signale in Gelb repräsentieren die Fluoreszenz der höchsten Intensität, wobei Signale in Dunkelrot eine niedrigere Fluoreszenzintensität bedeuten. Quantifizierung der Fluoreszenz der isolierten Lungen (D) bzw. trachealen LK (E). Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

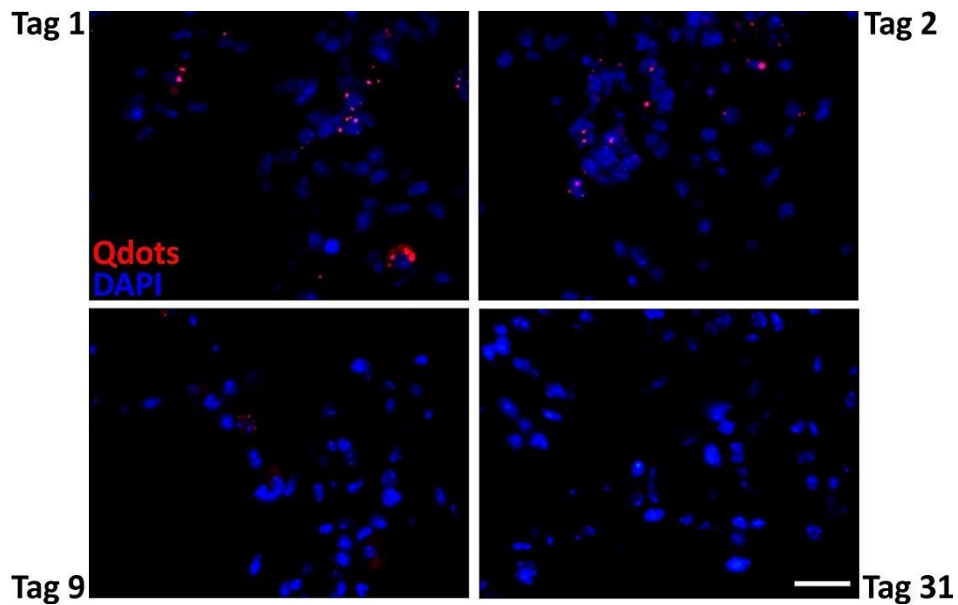


Abbildung 4.20: Verteilung der Fluoreszenzsignale im Lungengewebe der SKH-1 Mäuse nach intranasaler Verabreichung von QDot-Ova-CAF01.

SKH-1 Mäusen (n=5) wurden fluoreszierende Impfstoffträger QD-Ova-CAF01 (QDot: 20 pmol, Ova: 5µg/Maus) intranasal verabreicht. An Tag 1, 2, 9 und 31 nach der Verabreichung wurden den Tieren die Lungen entnommen und nach der Analyse im IVIS mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Gefrierschnitte der Lungenpräparate von jeweils drei Mäusen angefertigt und nach der DAPI-Färbung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Darstellung in Falschfarben: in Blau: Zellkerne (DAPI), in Rot: QDots. Aufnahme mit dem Objektiv 100x, Größenmaßstab: 25 µm.

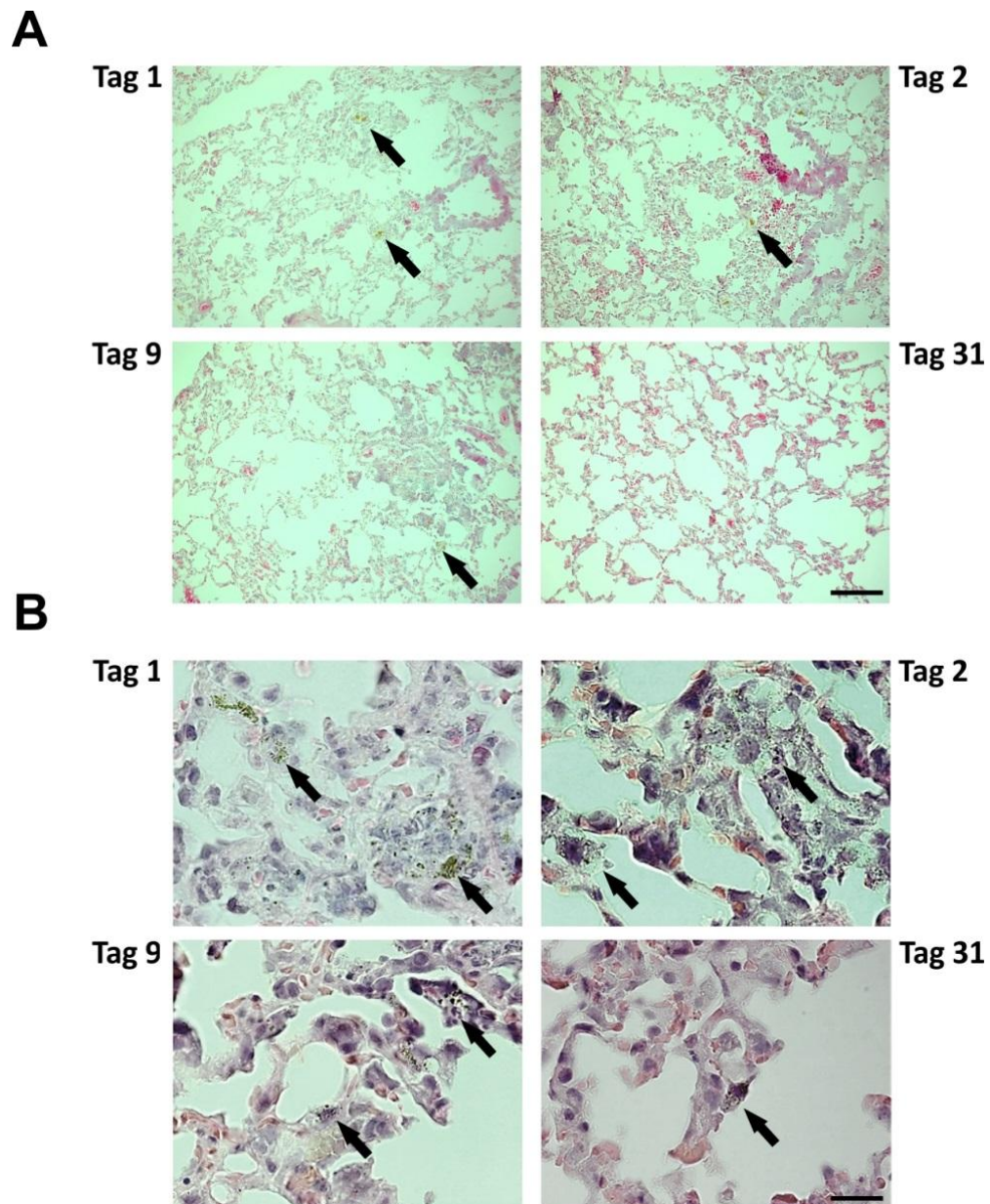


Abbildung 4.21: Analyse der Verteilung von QDot-Ova-CAF01 im Lungengewebe der SKH-1 Mäuse nach intranasaler Verabreichung.

SKH-1 Mäusen (n=5) wurden fluoreszierende Impfstoffträger QDot-Ova-CAF01 (QDot: 20 pmol, Ova: 5µg/Maus) intranasal verabreicht. An Tag 1, 2, 9 und 31 nach der Verabreichung wurden die Lungen entnommen und nach der Bildgebungsanalyse im IVIS mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Gefrierschnitte der Lungenpräparate von jeweils drei Mäusen angefertigt, mittels HE gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Aufnahme mit dem Objektiv: **A**: 20x, **B**: 100x, Größenmaßstab: **A**: 100 µm; **B**: 20 µm. QDots sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Verteilung von fluoreszierenden CAF01 mit 100 pmol QDots/Dosis

Im nächsten Versuch wurde die Konzentration der QDots in den Impfstoffträgerkonjugaten auf 100 pmol erhöht, um die Detektion und Verteilung der fluoreszierenden Konjugate im ganzen Tier zu erreichen. In diesem Versuch wurden C57BL/6 Mäuse verwendet, um die Experimente denen unserer Kooperationspartner in Dänemark anzupassen. Dabei wurden zwei Arten von Impfstoffformulierungen verwendet: 1. fluoreszierende proteinhaltige QDot-Ova-CAF01 und 2. nur QDot-haltige QDot-CAF01 Formulierungen. Auf diese Weise sollte analysiert werden, ob die Verteilung der Formulierungen durch das Vorhandensein des Proteins beeinflusst wird. Für besseres Detektieren von Fluoreszenzsignalen wurden den Tieren die Brustbereiche unter Betäubung mit Ketamin/Xylacin rasiert, um eine durch die Haare bedingte Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren und somit bessere Darstellung von fluoreszierenden Reportersignalen zu erzielen.

Die Fluoreszenz in lebenden Mäusen wurde direkt nach der Verabreichung der Impfstoffe (Tag 1), an Tag 2 und weiterhin alle 5-7 Tage während der gesamten Versuchsdauer von 29 Tagen mittels IVIS Bildgebung analysiert. Die stärkste Fluoreszenz in den lebenden Mäusen konnte direkt nach der Verabreichung, an Tag 1, detektiert werden, wobei eine höhere Fluoreszenz in den Brustbereichen der Tiere, die die Formulierungen ohne Ovalbumin (QDot-CAF01) erhielten, im Vergleich zu den Tieren, die Ova-haltige Formulierungen (QDot-Ova-CAF01) erhielten, gemessen wurde (Abb. 4.22 A, B). Ab Tag 2 ist eine starke Reduktion der Fluoreszenzsignale in allen lebenden Mäusen zu verzeichnen. An Tag 15 und 29 nach der Verabreichung konnten nur schwache bis gar keine Fluoreszenzsignale in Lungenbereichen der Tiere, die sowohl QDot-CAF01 als QDot-Ova-CAF01 erhalten haben, gemessen werden.

An Tag 15 und 29 nach der Verabreichung wurden den Tieren die Lungen entnommen und deren Fluoreszenz im IVIS gemessen. An Tag 15 konnten in den Lungen Fluoreszenzsignale mit der höchsten Intensität gemessen werden (Abb. 4.22 C), wobei die Fluoreszenzsignale in den Lungen der Tiere, die QDot-CAF01 erhielten, signifikant höher waren als in den Lungen der mit QDot-Ova-CAF01 behandelten Tiere (Abb. 4.22 C, E). An Tag 29 konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenz der Lungen zwischen zwei zu vergleichenden Gruppen festgestellt werden. Die Fluoreszenz der Lungen der mit QDot-CAF01 behandelten Tiere war stärker als der Lungen der mit QDot-Ova-CAF01 behandelten Tiere (Abb. 4.22 E). Diese Analysen zeigen, dass CAF01-Formulierungen ohne Ovalbumin in lebenden Mäusen sowie in den isolierten Lungen im Vergleich zu den CAF01-Formulierungen mit Ovalbumin besser detektierbar sind. Die Fluoreszenz der QDots wird somit durch die Bindung des Proteins beeinträchtigt. Die Lymphknoten aus diesem Versuch wurden für die nachfolgenden durchflußzytometrischen Untersuchungen verwendet (s. 4.5.1).

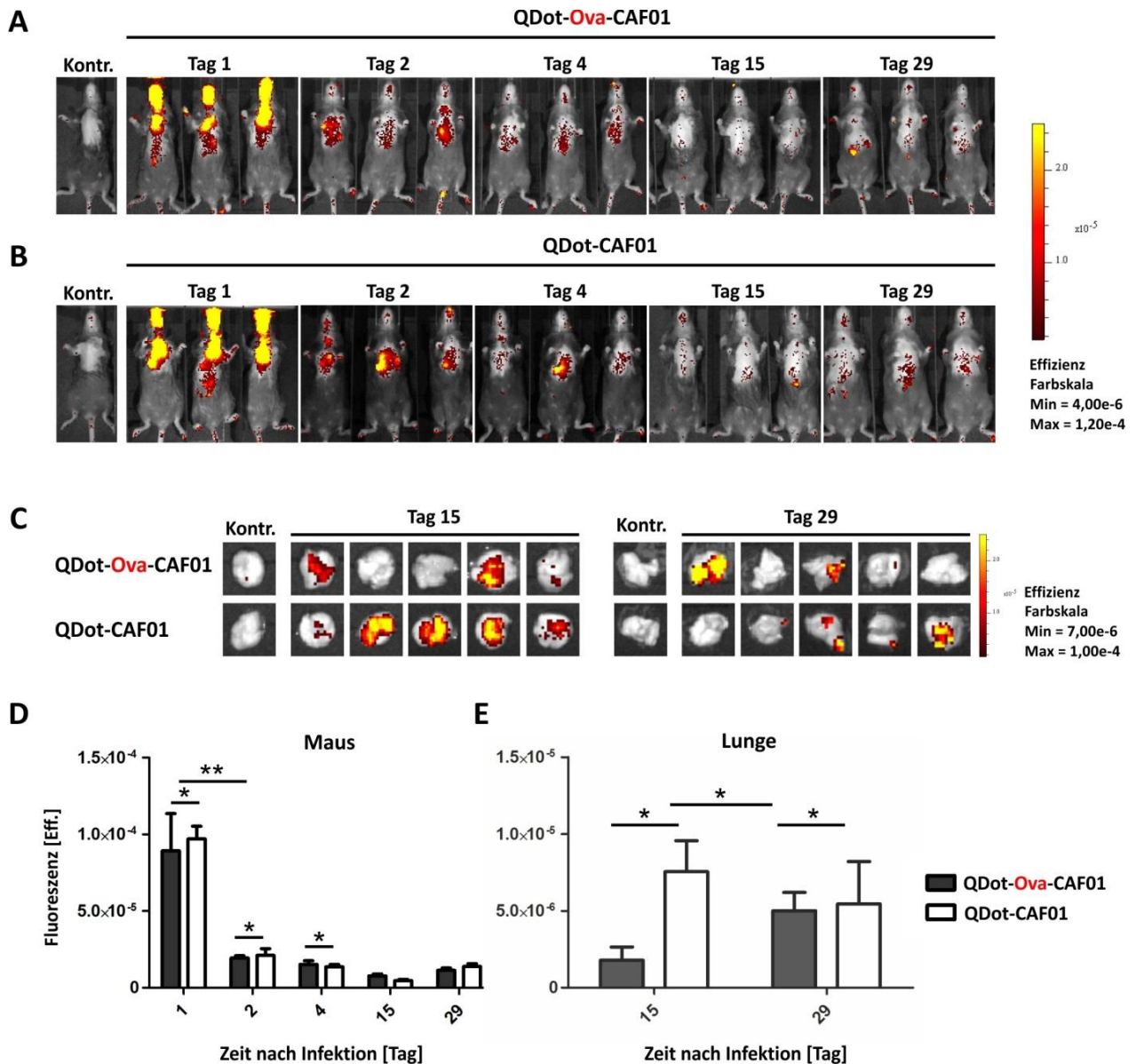


Abbildung 4.22: Zeitliche Verteilung von QD-Ova-CAF01 in der Maus nach intranasaler Verabreichung.

C57BL/6 Mäusen ($n=5$) wurde der mit QDots (100 pmol/Dosis) markierter Impfstoffträger CAF01 in Kombination mit dem Proteinantigen Ova (5 μg /Dosis) intranasal verabreicht. Fluoreszenz wurde unmittelbar nach der Verabreichung (Tag 1) und an Tag 2, 4, 15 und 29 nach der Verabreichung im lebenden Tier (A, B) mittels IVIS Bildgebung gemessen. Fluoreszenz in einzelnen, isolierten Lungen wurde an den Tagen 15 und 29 nach der Verabreichung gemessen (C). Bildgebungsparameter: Anregung 640 nm; Emission 700 nm; f-stop: 1,2; Anregungszeit: 1 s. Für die Aufnahme unspezifischer Fluoreszenzsignale wurde der Anregungsfilter 465 nm benutzt. Fluoreszenzintensität ist als Effizienz in Falschfarben dargestellt. Signale in Gelb repräsentieren die Fluoreszenz der höchsten Intensität, wobei Signale in Dunkelrot eine niedrigere Fluoreszenzintensität bedeuten. Quantifizierung der Fluoreszenz in der Maus (D) bzw. Lunge (E). Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen; $n = 5$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.3 Verteilung des mit fluoreszenzmarkierten Impfstoffträgers CAF01 in der Maus nach subkutaner Applikation

Verteilung von fluoreszierenden CAF01 mit 20 pmol QDots/Dosis

Zur Untersuchung der zeitlichen Verteilung des mit fluoreszierenden QDots markierten Impfstoffträgers CAF01 im Mausekörper wurden die QDot-Ova-CAF01 (20 pmol QDots) Formulierungen subkutan auf der rechten Seite im Schwanzbereich der haarlosen SKH1-Mäuse injiziert. Die Fluoreszenz wurde an Tag 1, 2, 15, 22 und 31 nach der Verabreichung mittels IVIS Bildgebung untersucht (Abb 4.23). Im Verlauf des Experiments wurde eine kontinuierliche Reduktion der Fluoreszenz am Verabreichungsort beobachtet (Abb. 4.23 A). Am letzten Zeitpunkt des Versuchs (Tag 31) wurden nur sehr geringe Fluoreszenzwerte an der Injektionsstelle gemessen. In den unbehandelten Kontrolltieren wurden zu keinem Zeitpunkt der Messung Fluoreszenzsignale gemessen.

Um zu untersuchen, ob fluoreszierende Formulierungen zu den regionalen drainierenden Lymphknoten transportiert worden sind, wurden den Tieren die inguinalen Lymphknoten der Injektionsseite (LK Re) und der gegenüberliegenden Seite (LK Li) an Tag 9 und 31 nach der Verabreichung entnommen. Die Fluoreszenz der LK wurde mittels IVIS Bildgebung analysiert (Abb. 4.23 C). Im Vergleich zu den Lymphknoten der Kontrolltiere wiesen die LK der geimpften Tiere an jedem der untersuchten Zeitpunkte Fluoreszenzsignale auf. Das deutet auf einen erfolgreichen Transport der fluoreszierenden Vakzin-Formulierungen zu den inguinalen LK hin. An Tag 31 gemessene Fluoreszenz der LK Re und LK Li war im Vergleich zur Fluoreszenz der entsprechenden LK, die an Tag 9 nach der Injektion im IVIS gemessen wurden, signifikant höher (Abb. 4.23 E). An Tag 31 nach der Applikation wurde ein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenz der rechten LK im Vergleich zu den linken LK festgestellt, dabei wiesen die LK von der Injektionsseite eine höhere Fluoreszenz auf (Abb. 4.23 E).

Anhand fluoreszenzmikroskopischer Analysen konnten QDot-Ova-CAF01 im Lymphknotengewebe (LK Re) nachgewiesen werden (Abb. 4.24). Die QDot-CAF01 Formulierungen konnten ebenfalls in Gewebeschnitten der LK der Injektionsseite (LK Re) detektiert werden, wobei im Gewebe der LK Li deutlich weniger QDot-spezifischer Signale zu beobachten waren (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl der Q-Dot-spezifischen Signale in den inguinalen LK der linken Seite war deutlich geringer im Vergleich zu der Anzahl der Signale in den rechten LK. Histologische Untersuchungen vom Hautgewebe der Injektionsstellen zeigten eine massive Einwanderung von Entzündungszellen, überwiegend von neutrophilen Granulozyten, in Dermis und Subcutisbereichen der Haut (Abb 2.25).

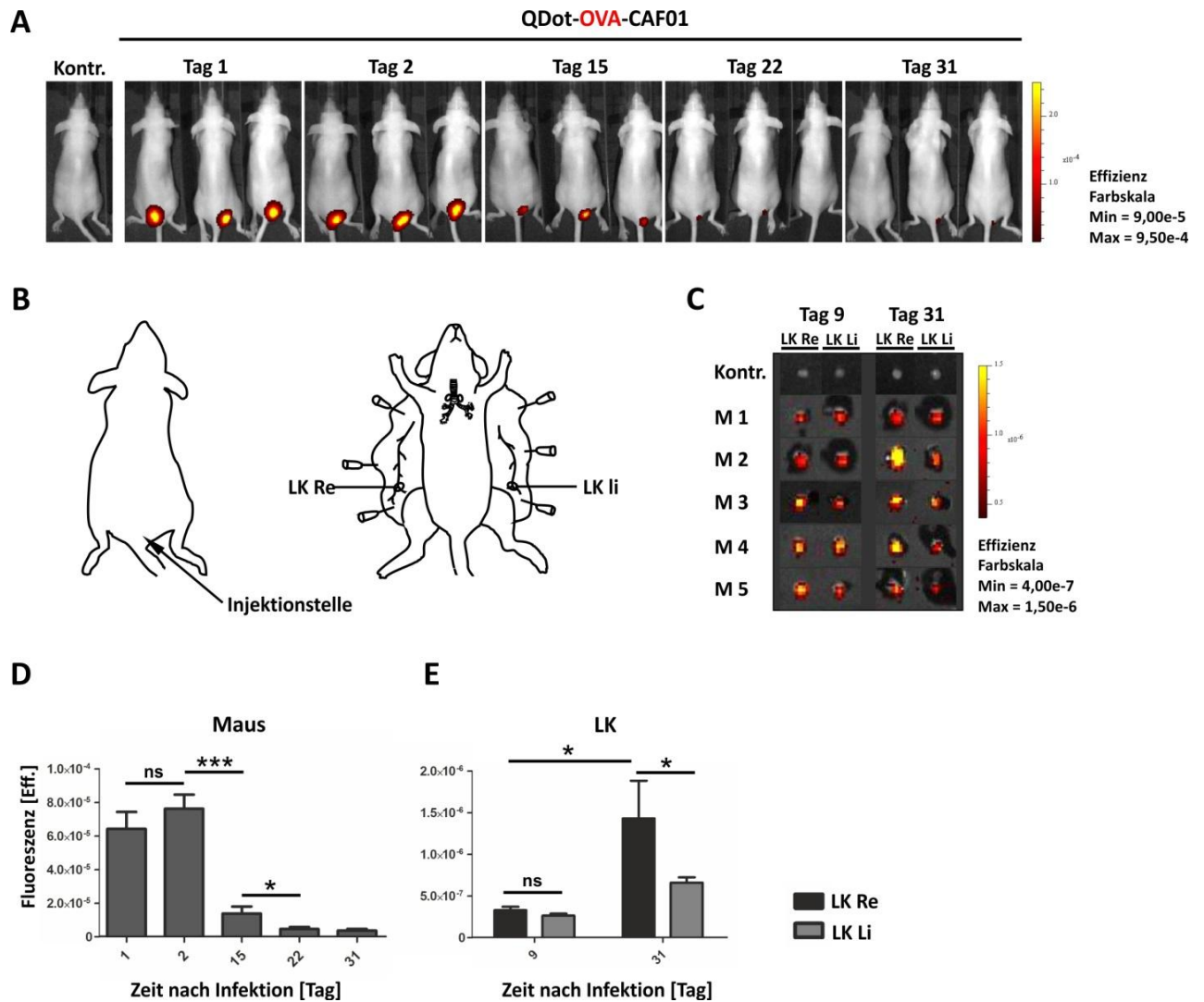


Abbildung 4.23: Zeitliche Verteilung von QDot-Ova-CAF01 in lebenden SKH-1 Mäusen und isolierten inguinalen Lymphknoten nach subkutaner Verabreichung.

SKH-1 Mäusen (n=5) wurden fluoreszierende Impfstoffträger QD-Ova-CAF01 (QDot: 20 pmol, Ova: 5µg/Maus) subkutan verabreicht. Fluoreszenz wurde an Tag 1, 2, 15, 22 und 31 nach der Verabreichung in lebenden Tieren (A) sowie deren isolierten inguinalen LK (C) mittels IVIS Imaging gemessen. Bildgebungsparameter: Anregung 640 nm; Emission 700 nm; f-stop: 1,2; Anregungszeit: 1 s. Für die Aufnahme unspezifischer Fluoreszenzsignale wurde der Anregungsfilter 465 nm benutzt. Fluoreszenzintensität ist als Effizienz in Falschfarben dargestellt. Signale in Gelb repräsentieren die Fluoreszenz der höchsten Intensität, wobei Signale in Dunkelrot eine niedrigere Fluoreszenzintensität bedeuten. Injektionsstelle sowie der LK der Injektionsstelle (LK Re) bzw. der gegenüberliegenden Stelle (LK Li) sind schematisch in (B) dargestellt. Quantifizierung der Fluoreszenz in der Maus (D) bzw. inguinalen LK (E). Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen; n = 5; *p < 0,05; ***p < 0,001.

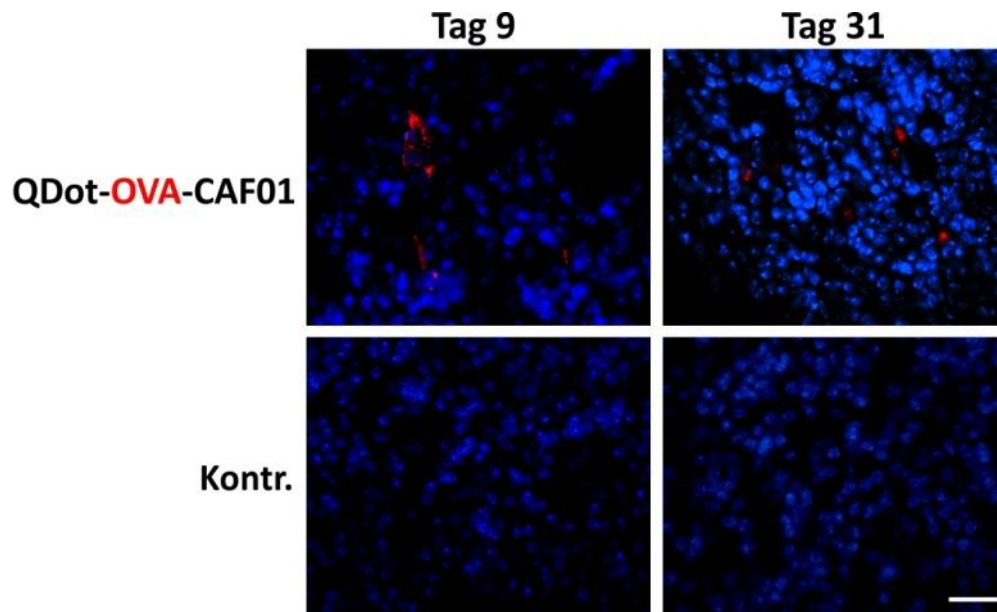


Abbildung 4.24. Nachweis von QDot-Ova-CAF01 in inguinalen Lymphknoten nach subkutaner Verabreichung. Gruppen von SKH-1 Mäusen (n=5) wurden fluoreszierende Impfstoffträger QDot-Ova-CAF01 (QDot: 20 pmol, Ova: 5µg/Maus) intranasal verabreicht. An Tag 9 und 31 nach der Verabreichung wurden den Tieren inguinale LK entnommen und nach der Analyse im IVIS mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Gefrierschnitte der Lungenpräparate von jeweils drei Mäusen angefertigt und nach der DAPI-Färbung fluoreszenzhistologisch untersucht. Aufnahme mit dem Objektiv 100x, Größenmaßstab: 20 µm.

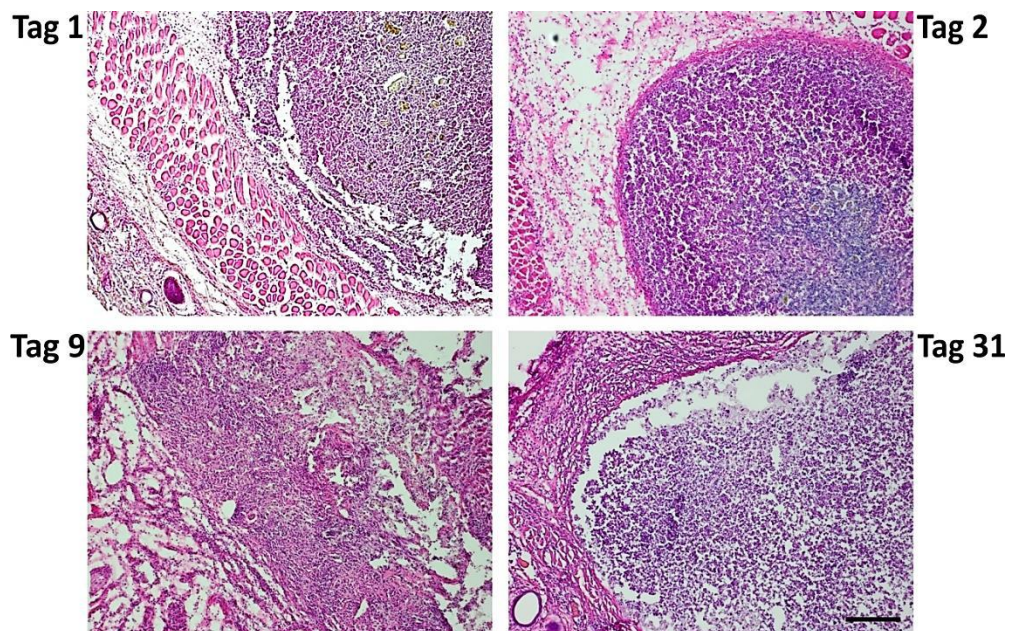


Abbildung 4.25: Nachweis von QDot-Ova-CAF01 in der Haut nach subkutaner Verabreichung.

SKH-1 Mäusen (n=5) wurden fluoreszierende Impfstoffträger QDot-Ova-CAF01 (QDot: 20 pmol, Ova: 5µg/Maus) intranasal verabreicht. An Tag 1, 2, 9 und 31 nach der Verabreichung wurde den Tieren das Hautgewebe der Injektionsstelle entnommen und 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Gefrierschnitte der Lungenpräparate von jeweils drei Mäusen angefertigt und nach der HE-Färbung lichtmikroskopisch untersucht. Aufnahme mit dem Objektiv 100x, Größenmaßstab: 50 µm.

Verteilung von fluoreszierenden CAF01 mit 100 pmol QDots/Dosis

C57BL/6 Mäusen wurden fluoreszierende proteinhaltige QDot-Ova-CAF01 bzw. nur QDot-haltige QDot-CAF01 Formulierungen, die jeweils 100 pmol QDots enthielten, subkutan auf der rechten Seite in der Schwanzregion verabreicht. Die Fluoreszenz der Formulierungen wurde direkt nach der Verabreichung (Tag 1) und weiterhin 2, 4, 15, und 29 Tage nach der Injektion in lebenden Tieren gemessen (Abb. 4.26 A, B). Im Verlauf des Experiments verminderte sich die Fluoreszenz am Verabreichungsort kontinuierlich. Am letzten Zeitpunkt des Experiments (Tag 29) konnte eine stärkere Fluoreszenz der 100 pmol QDot-haltigen Formulierungen an der Injektionsstelle gemessen werden, verglichen zu der Fluoreszenz der Formulierungen, die 20 pmol QDots enthielten (vgl. Abb. 4.23 A).

Auch in diesem Experiment wurde der Transport von CAF01-Formulierungen zu den drainierenden inguinalen Lymphknoten untersucht. Dazu wurden den Tieren an Tag 15 und 29 nach der Verabreichung die inguinalen Lymphknoten von der Injektionsseite (LK Re) und von der gegenüberliegenden Seite (LK Li) entnommen und im IVIS gemessen (Abb. 4.26 D, E). Dabei konnte in Lymphknoten der Injektionsseite (LK Re) eine signifikant höhere Fluoreszenz beobachtet werden im Unterschied zu den Lymphknoten der linken Seite (LK Li). Es wurde festgestellt, dass die Fluoreszenz der Formulierungen durch das Protein (Ovalbumin) stark vermindert war. QDot-CAF01-haltige LK zeigten eine, im Unterschied zu den QDot-Ova-CAF01-haltigen LK, signifikant höhere Fluoreszenz auf (Abb 4.25 D, E, F, G). Die Lymphknoten aus diesem Versuch wurden auch für durchflußzytometrische Untersuchungen verwendet (s. 4.5.1).

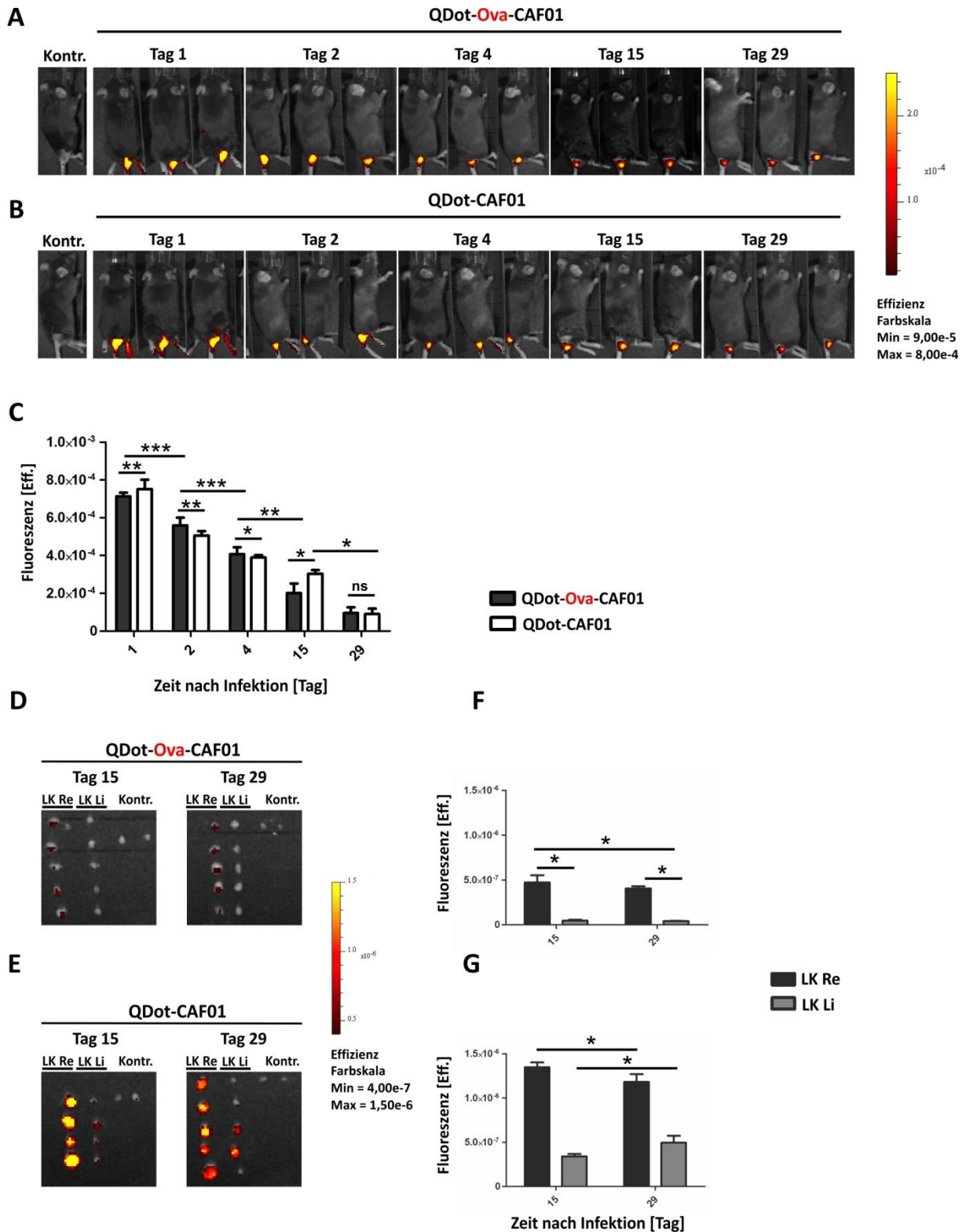


Abbildung 4.26: Zeitliche Verteilung von QDot-Ova-CAF01 (100 pmol QDot/Dosis) in der Maus nach subkutaner Verabreichung.

C57BL/6 Mäusen (n=5) wurde der mit QDots (100 pmol/Dosis) markierter Impfstoffträger CAF01 in Kombination mit dem Proteinantigen Ova (5 µg/Dosis) subkutan verabreicht. Fluoreszenz wurde unmittelbar nach der Verabreichung (Tag 1) und an Tag 1, 4, 15 und 29 nach der Verabreichung im ganzen Tier im IVIS gemessen (A, B). An Tag 15 und 29 nach der Verabreichung wurden den Tieren inguinale LK entnommen und ebenfalls im IVIS analysiert (D, E) Bildgebungsparameter: Anregung 640 nm; Emission 700 nm; f-stop: 1,2; Anregungszeit: 1 s. Für die Aufnahme unspezifischer Fluoreszenzsignale wurde der Anregungsfilter 465 nm benutzt. Fluoreszenzintensität ist als Effizienz in Falschfarben dargestellt. Signale in Gelb repräsentieren die

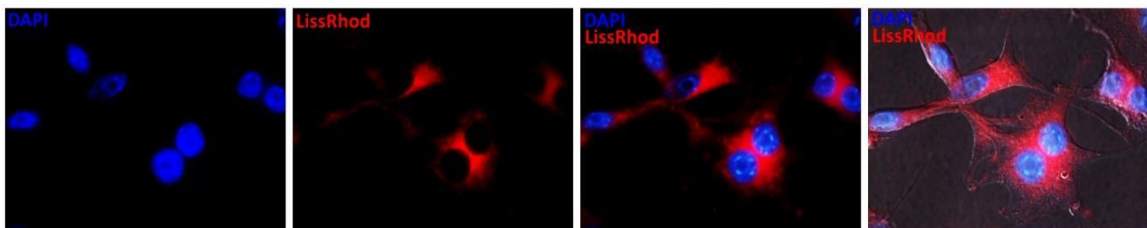
Fluoreszenz der höchsten Intensität, wobei Signale in Dunkelrot eine niedrigere Fluoreszenzintensität bedeuten. Quantifizierung der Fluoreszenz in den inguinalen LK nach der Verabreichung von QDot-Ova-CAF01 (F) bzw. von QDot-CAF01 (G). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.4 Verteilung von fluoreszenzmarkierten Impfstoffen in der Maus

4.4.1 Herstellung und Analyse des fluoreszierenden CAF01

Eine optimale Schutzwirkung bedarf einer gemeinsamen Depotbildung und des gemeinsamen Transports beider Bestandteile eines Impfstoffs, Antigen und Adjuvans, zu den drainierenden LK. Um zu untersuchen, ob das Adjuvans CAF01 und das Modellantigen Ovalbumin am Verabreichungsort oder im Zielorgan Lunge gemeinsam lokalisiert sind bzw. simultan zu den sekundären lymphatischen Organen, wie peripheren LK, transportiert werden, wurden die Liposomen mit dem hydrophoben Fluoreszenzfarbstoff Lissamin Rhodamin (LissRhod) markiert (SSI). Die Stabilität und Leuchtkraft von LissRhod-CAF01 wurden zunächst in RAW 264.7 Makrophagen getestet (Abb. 4.27 A, B). Diese Analysen zeigten, dass mit LissRhod gefärbte CAF01-Liposomen nach 1,5 Stunden Inkubationszeit in Makrophagen sehr gut detektiert werden konnten. Anhand der Färbung des Lysosom-assoziierten Proteins LAMP-1 konnte gezeigt werden, dass LissRhod-CAF01 ausschließlich in den Endosomen/Liposomen lokalisiert sind (Abb. 4.27 B).

A



B

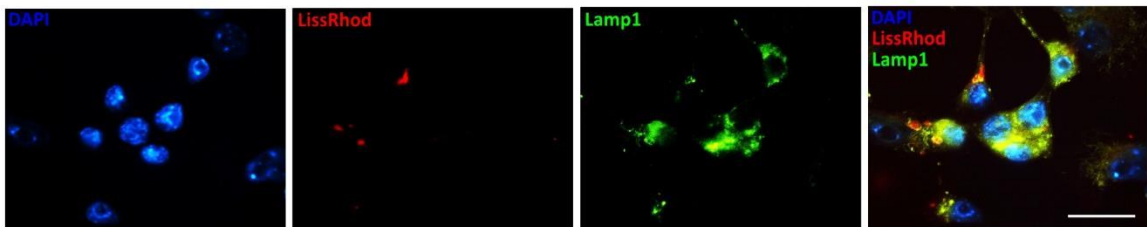


Abbildung 4.27: Lokalisation von LissRhod-CAF01 in RAW 264.7 Makrophagen.

RAW 264.7 Makrophagen wurden mit LissRhod (0,25 $\mu\text{g/ml}$) für 1,5 Stunden inkubiert und nach der Fixierung mit 4 % PFA und darauffolgender Einbettung mittels Confocal® Matrix fluoreszenzmikroskopisch untersucht (A). Fixierte Zellen wurden zusätzlich gegen Lysosomen-assoziiertes Protein LAMP-1 gefärbt (B). Darstellung in Falschfarben: in Blau: Zellkerne (DAPI), in Rot: QDots, in Grün: (LAMP-1). Aufnahme mit dem Objektiv 100x, Größenmaßstab: 10 μm .

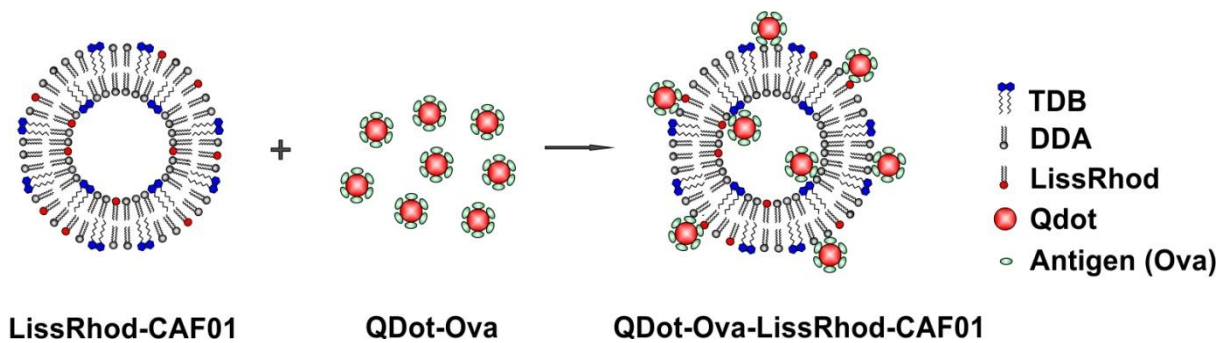


Abbildung 4.28: Schema der Herstellung der fluoreszierenden Impfstoffkonjugate (QDot-Ova-LissRhod-CAF01).

Weiterhin wurden die LissRhod-CAF01-Impfstoffträger mit dem QDot-dekorierten Ovalbumin vermischt, um fluoreszierende QDot-Ova-LissRhod-CAF01 Formulierungen zu erhalten (Abb 4.28). Ferner sollte LissRhod auf seine Eignung als Reportersubstanz im Mauskörper mittels IVIS Bildgebungsverfahren getestet werden. Diese Analysen sollten dazu führen, ein gutes Detektionssystem zur Visualisierung der zeitlichen Verteilung von fluoreszenzmarkierten Impfstoffen im Mauskörper zu etablieren. Auch hier wurden zwei Immunisierungswege, subkutan und intranasal, vergleichend getestet. Dazu wurden den haarlosen SKH-1 Mäusen QDot-Ova-CAF01 bzw. QDot-Ova-LissRhod-CAF01 Formulierungen intranasal bzw. subkutan verabreicht und die zeitliche Verteilung dieser Impfstoffe im IVIS und mittels fluoreszenz- sowie lichtmikroskopischer Untersuchungen verfolgt.

Im lebenden Tier konnte anhand IVIS Bildgebung eine gemeinsame Lokalisation sowie eine distinkte spezifische Detektion von beiden Reportersignalen, LissRhod (CAF01) und QDot (Ovalbumin), nur im Fall der subkutanen Verabreichung nachgewiesen werden (Abb. 4.29). Im Brustbereich und in einzelnen Organen (Lunge, tracheale bzw. inguinale Lymphknoten) wurde vorwiegend QDot-spezifische Fluoreszenz festgestellt. Das kann daran liegen, dass im Lungen- sowie im Lymphknotengewebe im Vergleich zu der Injektionsstelle „Haut“ die fluoreszierenden Formulierungen feiner verteilt sind, d.h. dass Vakzin-Formulierungen nicht an einer Stelle, wie in der Haut, konzentriert sind. Aufgrund der feinen Verteilung der fluoreszierenden Substanzen wird das emittierte Licht in einem höheren Maße vom Gewebe absorbiert und außerdem durch die Streuung abgeschwächt. Dadurch wird die Fluoreszenz gemindert. In der Haut konnten QDot- und LissRhod-spezifische Fluoreszenz jeweils getrennt detektiert werden.

Weiterhin wurde die Verteilung von LissRhod-CAF01 nach intranasaler bzw. subkutaner Verabreichung in lebenden Mäusen sowie entnommenen Lungen und LK im IVIS analysiert (Abb. 4.30). Dabei zeigte sich, dass die LissRhod-spezifische Fluoreszenz nur am Tag 1, direkt nach der

Applikation, an den Nasenspitzen der Tiere detektiert werden konnte. In den Brustbereichen der Tiere dagegen konnte die Fluoreszenz zu keinem der Untersuchungszeitpunkte nachgewiesen werden. Am Tag 2 nach der Verabreichung konnte LissRhod-spezifische Fluoreszenz in den isolierten Lungen, jedoch nicht in den trachealen LK festgestellt werden. Am letzten Zeitpunkt des Versuchs (Tag 10) konnte die Fluoreszenz weder in den Lungen noch in trachealen LK gemessen werden. Nach subkutaner Verabreichung konnte dagegen zu jedem Zeitpunkt des Versuchs an der Injektionsstelle im Schwanzbereich LissRhod-spezifische Fluoreszenz detektiert werden, jedoch nicht in den isolierten inguinalen LK.

Fluoreszenzhistologische Analysen von Lungen-, Haut- und Lymphknotengewebe bestätigten die Ko-Lokalisation von CAF01 und Ovalbumin an allen Untersuchungszeitpunkten des Experiments (Tag 2 und Tag 10 nach der Verabreichung) (Abb. 4.31, 4.33). Das bedeutet, dass Antigen und Adjuvans gemeinsam am Verabreichungsort lokalisiert sind und gemeinsam in die LK transportiert werden. Durch histologische Untersuchungen anhand der HE-Färbung konnte die Lokalisation der QDots im Lungen- bzw. LK-Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 4.32, 4.34). Nach subkutaner Applikation war eine Einwanderung entzündlicher Zellen, überwiegend neutrophiler Granulozyten zu beobachten (Abb. 4.34 A). Diese Analysen zeigen, dass LissRhod neben QDots als weitere fluoreszierende Reportersubstanz für unsere Bildgebungsanalysen geeignet ist, wenn auch mit geringer Intensität.

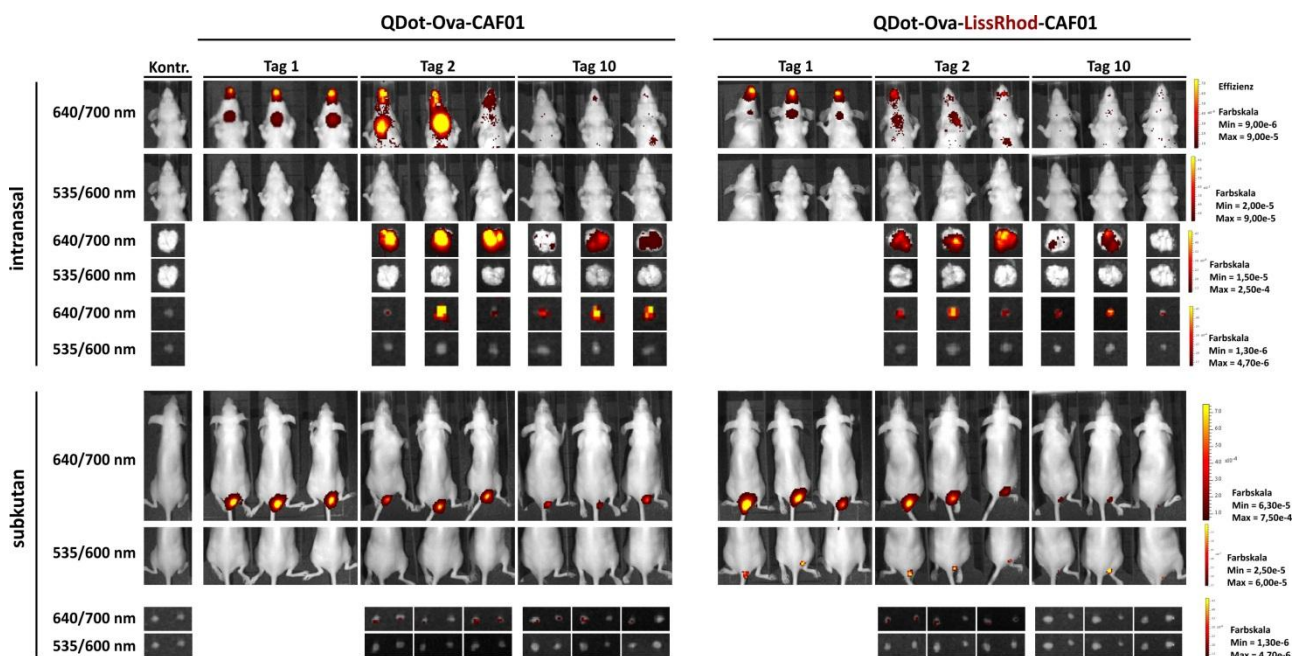


Abbildung 4.29: Zeitliche Verteilung von QDot-Ova-CAF01 und QDot-Ova-LissRhod-CAF01 in der Maus.

SKH-Mäusen (n=3) wurden QDot-Ova-CAF01 bzw. QDot-Ova-LissRhod-CAF01 intranasal (Dosis/Maus: QDot: 100 pmol, Ova: 5 µg in 30 µl LissRhod-CAF01 (25 µg/ml)) bzw. subkutan (Dosis/Maus: QDot: 100 pmol, Ova: 10 µg in 100 µl LissRhod-CAF01 (25 µg/ml)) verabreicht. Kontrolltiere erhielten nur den nicht fluoreszierenden CAF01 Impfstoffträger (30 µl/Maus intranasal bzw. 100 µl/Maus subkutan). Fluoreszenz wurde im ganzen Tier bzw. in den isolierten Organen (Lunge, Lymphknoten) im IVIS gemessen. Bildgebungsparameter: Anregung:

640 nm, Emission: 700 nm für die Detektion von QDots; Anregung 535 nm, Emission 700 nm für die Detektion von LissRhod; f-stop: 1.2; Anregungszeit: 1 s. Für die Aufnahme unspezifischer Fluoreszenzsignale wurde der Anregungsfilter 430 nm benutzt. Fluoreszenzintensität ist als Effizienz in Falschfarben dargestellt. Signale in Gelb repräsentieren die Fluoreszenz der höchsten Intensität, wobei Signale in Dunkelrot eine niedrigere Fluoreszenzintensität bedeuten. Aufnahmen wurden mit Hilfe von Image Math Tool normiert.

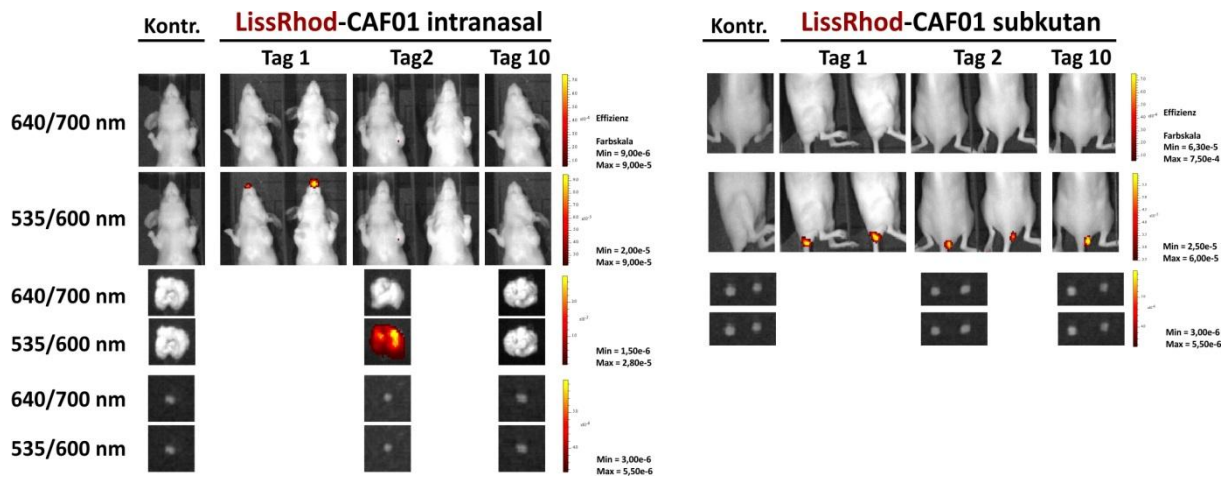
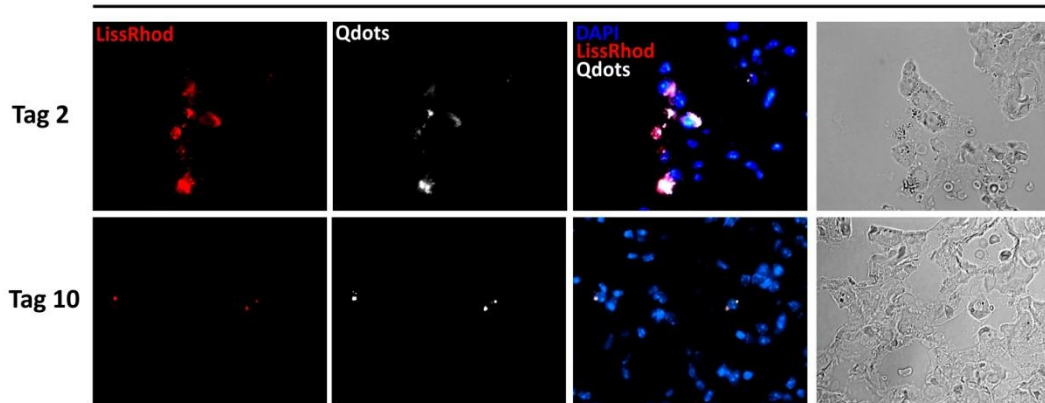


Abbildung 4.30: Zeitliche Verteilung von LissRhod-CAF01 in der Maus.

SKH-Mäusen (n=3) wurden QDot-Ova-CAF01 bzw. QDot-Ova-LissRhod-CAF01 intranasal (Dosis/Maus: QDot: 100 pmol, Ova: 5 µg in 30 µl LissRhod-CAF01 (25 µg/ml)) bzw. subkutan (Dosis/Maus: QDot: 100 pmol, Ova: 10 µg in 100 µl LissRhod-CAF01 (25 µg/ml)) verabreicht. Kontrolltiere erhielten nicht fluoreszierenden CAF01 Impfstoffträger (30 µl/Maus intranasal bzw. 100 µl/Maus subkutan). Fluoreszenz wurde im ganzen Tier bzw. in den isolierten Organen (Lunge, Lymphknoten) im IVIS gemessen. Bildgebungsparameter: Anregung: 640 nm, Emission: 700 nm für die Detektion von QDots; Anregung 535 nm, Emission 700 nm für die Detektion von LissRhod; f-stop: 1.2; Anregungszeit: 1 s. Für die Aufnahme unspezifischer Fluoreszenzsignale wurde der Anregungsfilter 430 nm benutzt. Fluoreszenzintensität ist als Effizienz in Falschfarben dargestellt. Signale in Gelb repräsentieren die Fluoreszenz der höchsten Intensität, wobei Signale in Dunkelrot eine niedrigere Fluoreszenzintensität bedeuten. Aufnahmen wurden mit Hilfe von Image Math Tool normiert.

A

QDot-Ova-LissRhod-CAF01



B

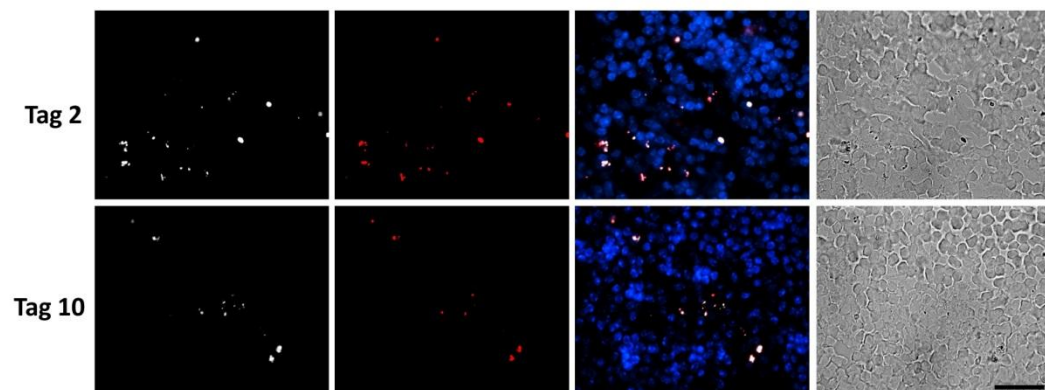


Abbildung 4.31: Detektion des fluoreszenzmarkierten Impfstoffträgers CAF01 in Lungen und trachealen Lymphknoten

QDot-Ova-LissRhod-CAF01 wurden intranasal (QDot: 100 pmol, Ova: 5 μg in 30 μl LissRhod-CAF01 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)/Maus) bzw. subkutan (QDot: 100 pmol, Ova: 10 μg in 100 μl LissRhod-CAF01 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)/Maus) verabreicht. Lungen (A) - und Lymphknotengewebe (B) der SKH-1 Mäuse wurden nach der Entnahme an Tag 2 und 10 nach der Verabreichung mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden Gefrierschnitte angefertigt und nach der DAPI-Färbung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Darstellung in Falschfarben: in Blau: Zellkerne (DAPI), in Rot: LissRhod, in Weiß: QDots. Aufnahme mit dem Objektiv 100x, Größenmaßstab: 20 μm .

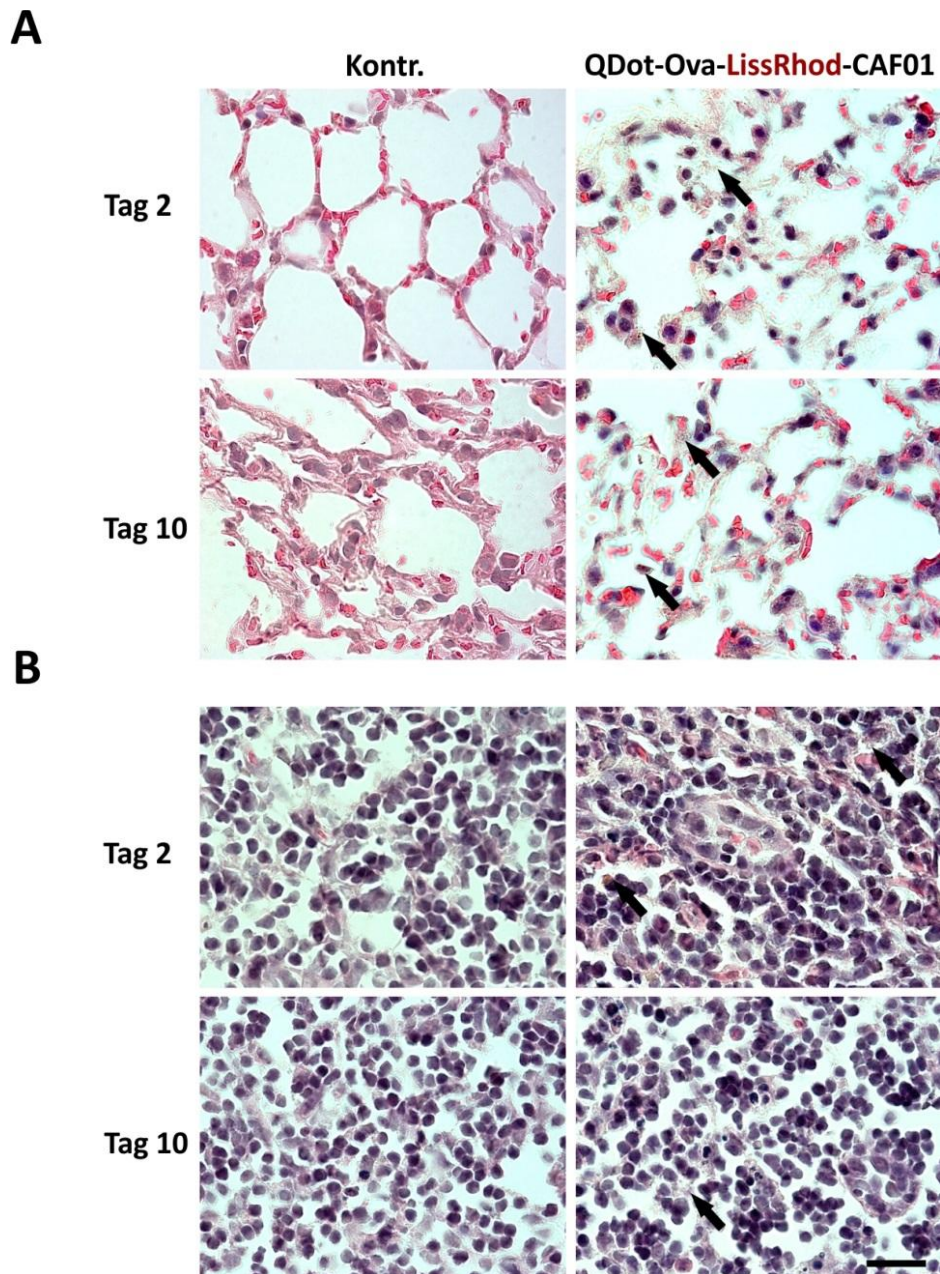


Abbildung 4.32: Detektion von Impfstoffträgern CAF01 in Lungen und trachealen Lymphknoten.

SKH-1 Mäusen wurden die QDot-Ova-LissRhod-CAF01 Formulierungen intranasal (QDot: 100 pmol, Ova: 5 µg in 30 µl LissRhod-CAF01 (25 µg/ml)/Maus) bzw. subkutan (QDot: 100 pmol, Ova: 10 µg in 100 µl LissRhod-CAF01 (25 µg/ml)/Maus) verabreicht. An Tag 2 und 10 nach der Applikation wurde den Tieren das Lungen- (**A**) - und Lymphknotengewebe (**B**) entnommen und mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden Gefrierschnitte angefertigt, mittels HE gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Lokalisation von QDots ist durch Pfeile gekennzeichnet. Aufnahme mit dem Objektiv 100x, Größenmaßstab: 30 µm.

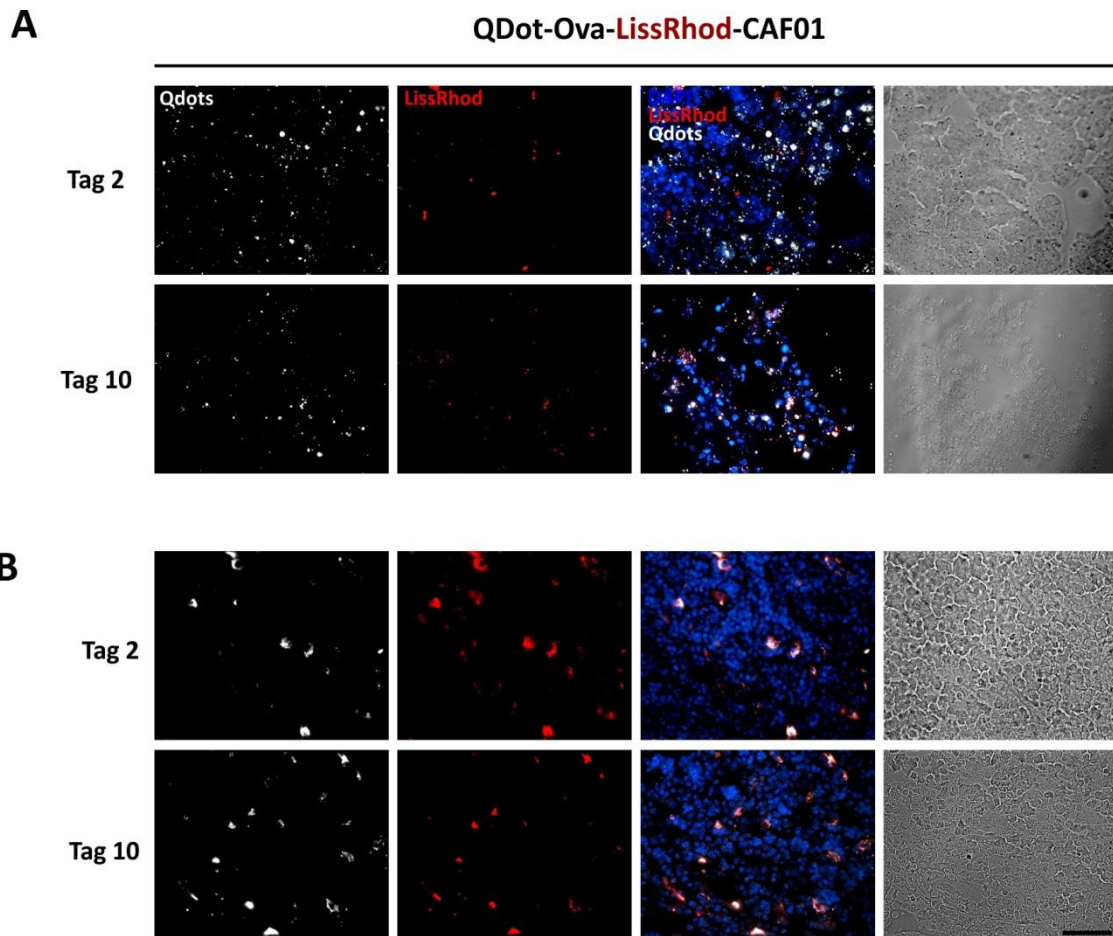


Abbildung 4.33: Detektion des fluoreszenzmarkierten Impfstoffträgers CAF01 in der Haut und inguinalen Lymphknoten.

SKH-1 Mäusen wurden die QDot-Ova-LissRhod-CAF01 Formulierungen intranasal (QDot: 100 pmol, Ova: 5 µg in 30 µl LissRhod-CAF01 (25 µg/ml)/Maus) bzw. subkutan (QDot: 100 pmol, Ova: 10 µg in 100 µl LissRhod-CAF01 (25 µg/ml)/Maus) verabreicht. An Tag 2 und 10 nach der Applikation wurde den Tieren das Haut- **(A)** - und Lymphknotengewebe **(B)** entnommen und mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden Gefrierschnitte angefertigt und nach der DAPI-Färbung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Darstellung in Falschfarben: in Blau: Zellkerne (DAPI), in Rot: LissRhod, in Weiß: QDots. Aufnahme mit dem Objektiv 100x, Größenmaßstab: 20 µm.

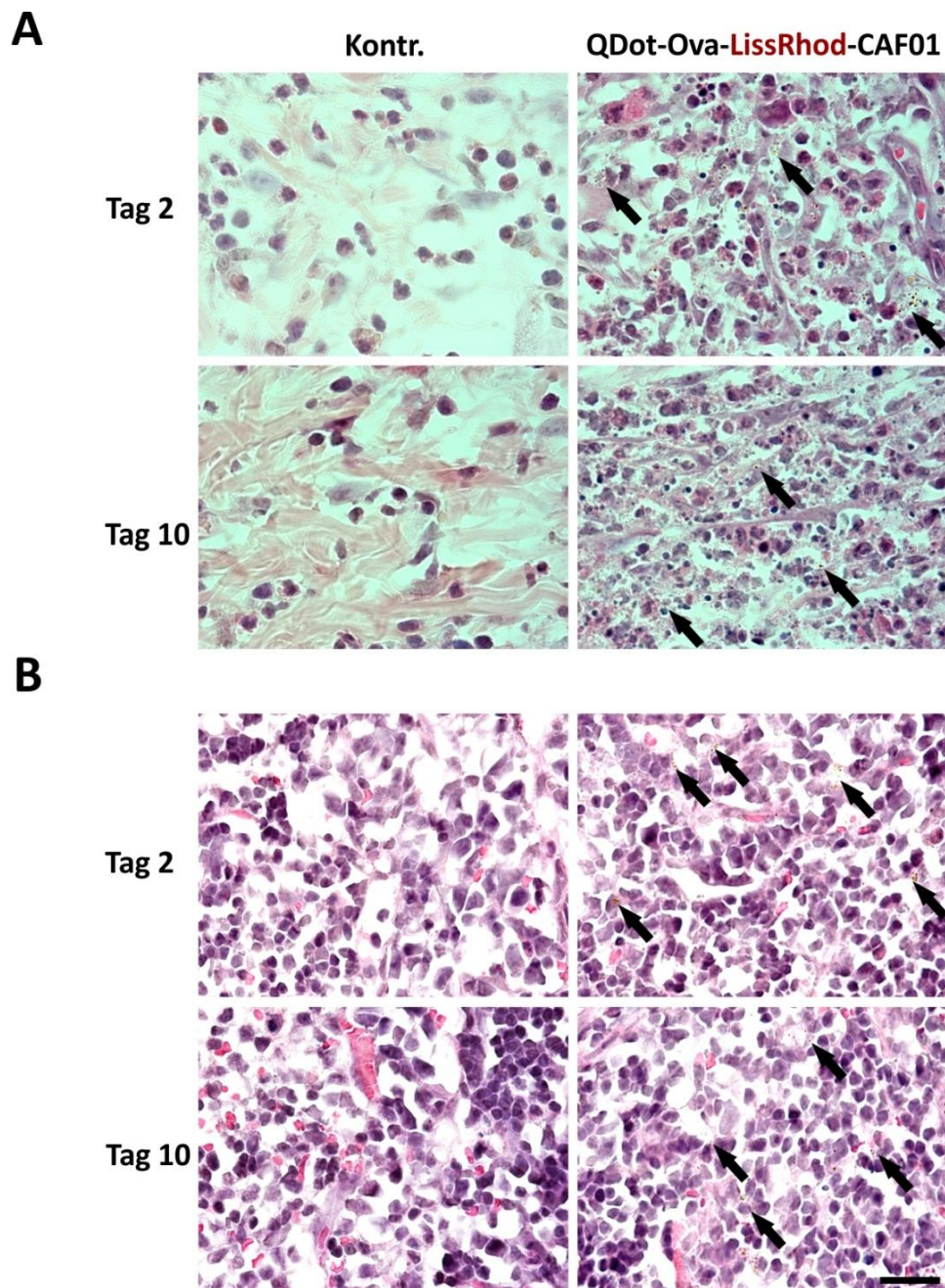


Abbildung 4.34: Detektion von Impfstoffträgern CAF01 in der Haut und inguinalen Lymphknoten.

QDot-Ova-LissRhod-CAF01 wurden intranasal (QDot: 100 pmol, Ova: 5 µg in 30 µl LissRhod-CAF01 (25 µg/ml)/Maus) bzw. subkutan (QDot: 100 pmol, Ova: 10 µg in 100 µl LissRhod-CAF01 (25 µg/ml)/Maus) verabreicht. Haut (A) - und Lymphknotengewebe (B) der SKH-1 Mäuse wurden nach der Entnahme an Tag 2 und 10 nach der Applikation mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden Gefrierschnitte angefertigt, HE gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Lokalisation von QDots ist durch Pfeile gekennzeichnet. Aufnahme mit dem Objektiv 100x, Größenmaßstab: 40 µm.

4.5 Myeloide Zellen in drainierenden Lymphknoten nach der Impfung mit QDot-Ova-CAF01

In dem zuvor beschriebenen Versuch zur Visualisierung der Verteilung von QDot-Ova-CAF01 in der Maus wurde der Impfstoffträger CAF01 in einem Gemisch mit QDot-Ova Konjugaten den SKH-1 Mäusen subkutan in der Schwanzregion verabreicht. An Tag 1, 2, 9 und 31 nach der Verabreichung wurden den Tieren die inguinalen Lymphknoten entnommen. An Tag 9 und 31 nach der Verabreichung wurde die Fluoreszenz der entnommenen LK mittels IVIS Bildgebung analysiert (Abb. 4.23). Fluoreszenzhistologische Analysen der Gewebeschnitte der inguinalen Lymphknoten zeigten eine im zeitlichen Verlauf zunehmende Einwanderung von CD11b⁺ Zellen (Abb. 4.35). Dabei konnten die CD11b⁺ Zellen überwiegend in einem „Kanalsystem“ (Rand-, Intermediär- und Marksinus) des LK sowie im lymphoretikulären Gewebe des Mark-(Medulla)-Bereiches im LK nachgewiesen werden. Die Abb. 4.36 zeigt den Vergleich vom LK-Gewebe, das fluoreszenzhistologisch bzw. nach der HE-Färbung lichtmikroskopisch untersucht wurde. Es ist zu beobachten, dass die QDots in Fluoreszenzbildern sowie in lichtmikroskopischen Bildern an den gleichen Stellen im Gewebe zu finden sind.

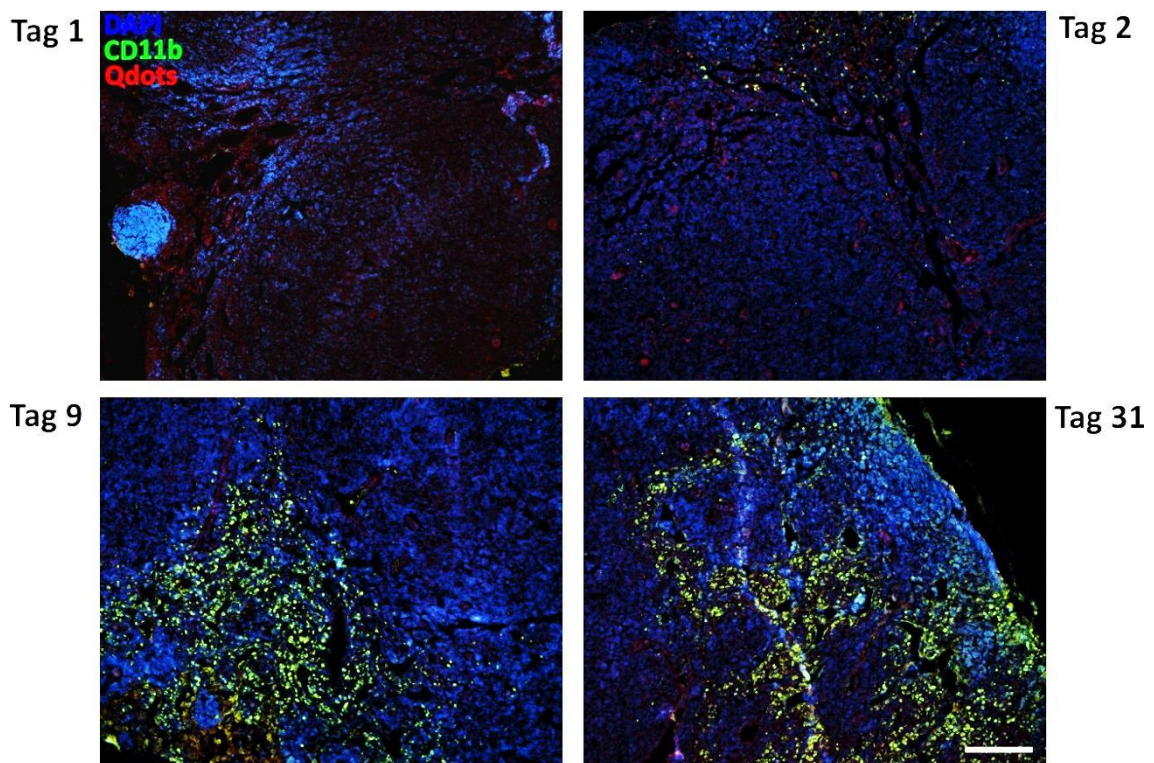


Abbildung 4.35: Vermehrtes Auftreten von CD11b⁺ Zellen in inguinalen Lymphknoten nach subkutaner Verabreichung von QDot-Ova-CAF01.

SKH1-Mäusen (n=5) wurden die fluoreszierenden Impfstoffträger QDot-Ova-CAF01 (20 pmol QDots und 5 µg Ova/Dosis) subkutan verabreicht. An Tag 1, 2, 9 und 31 nach der Verabreichung wurden den Tieren die inguinalen Lymphknoten entnommen und mit 4 % PFA fixiert. Jeweils 3 Kryo-Schnitte von 3 Mäusen pro Zeitpunkt wurden gegen CD11b immunhistologisch gefärbt (1. AK: anti-CD11b, Kaninchen, Verd.: 1:100; 2. AK: Cy2-conjugated Goat anti-rabbit J6 (H+L), Verd.: 1:200). Darstellung in Falschfarben: in Blau: Zellkerne (DAPI), in Grün: CD11b⁺ Zellen, in Rot: QDots, Aufnahme mit dem Objektiv 20x, Größenmaßstab: 200 µm.

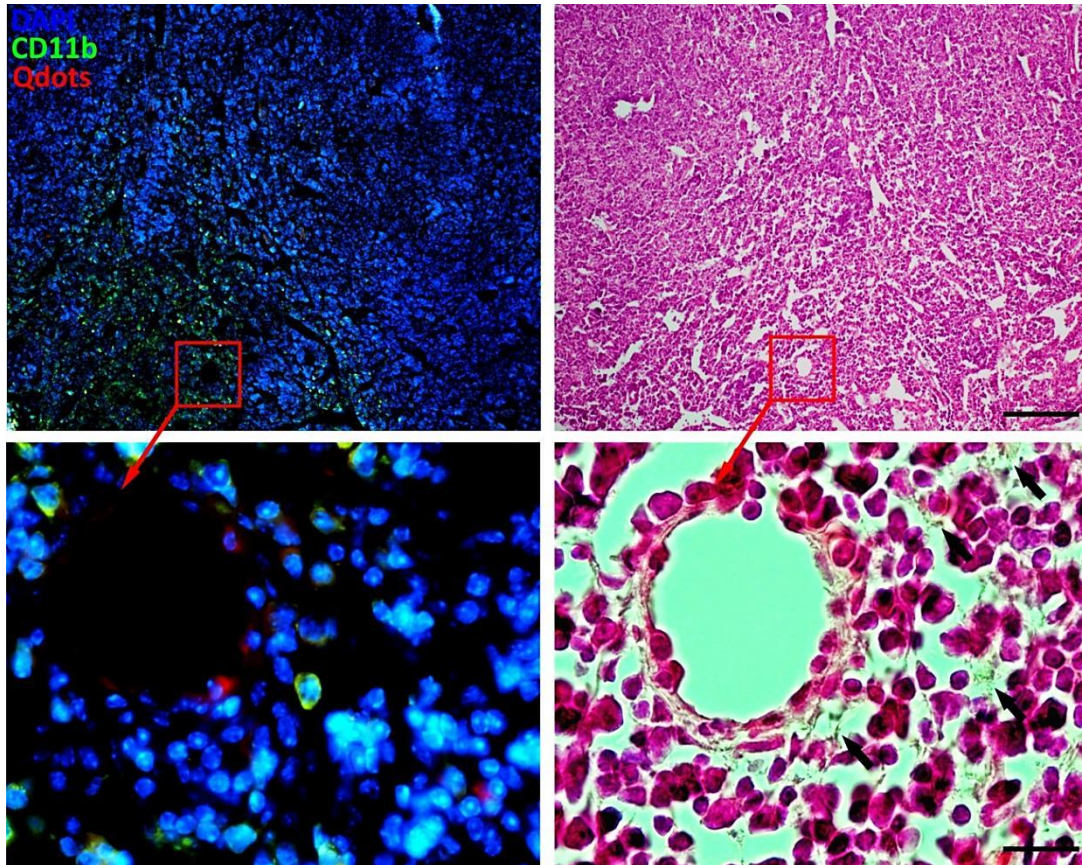


Abbildung 4.36: Lokalisation der QDots im Lymphknotengewebe.

SKH1-Mäusen (n=5) wurden fluoreszierende Impfstoffträger QDot-Ova-CAF01 (20 pmol QDots und 5 μ g Ova/Dosis) subkutan verabreicht. An Tag 1, 2, 9 und 31 nach der Verabreichung wurden den Tieren die inguinalen Lymphknoten entnommen und mit 4 % PFA fixiert. Jeweils 3 Kryoschnitte von 3 Mäusen pro Zeitpunkt wurden gegen CD11b immunhistologisch gefärbt (1. AK: anti-CD11b, Kaninchen, Verd.: 1:100; 2. AK: Cy2-conjugated Goat anti-rabbit J6 (H+L), Verd.: 1:200). Darstellung in Falschfarben: in Blau: Zellkerne (DAPI), in Grün: CD11b⁺ Zellen, in Rot: QDots (rechte Reihe). Vergleichend wird die entsprechende Stelle im histologischen Schnitt gezeigt. Hier wurden die Kryoschnitte von denselben Mäusen mittels HE gefärbt, schwarze Pfeile zeigen QDots (linke Reihe), Aufnahme mit dem Objektiv 100x, Größenmaßstab: obere Reihe: 200 μ m; untere Reihe: 20 μ m.

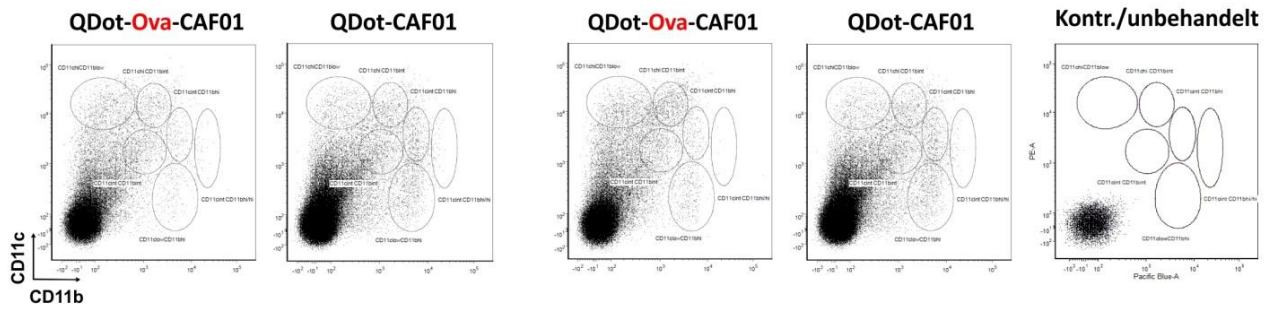
4.5.1 Analyse impfstofftragender APZ in Abhängigkeit vom Applikationsweg

Zur Ausbildung einer spezifischen Immunität ist das Zusammenspiel des angeborenen und adaptiven Immunsystems von großer Bedeutung. Um eine erfolgreiche Immunantwort gegen ein bestimmtes Antigen bzw. die Ausbildung Zell-vermittelter Antworten zu induzieren, muss das Antigen von Antigen-präsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen oder Makrophagen aufgenommen und prozessiert werden. Zur Analyse von Zellpopulationen, die bei der Aufnahme und dem Transport von Impfstoffträgern zu den drainierenden Lymphknoten beteiligt sind, wurden die fluoreszenzmarkierten CAF01 (QDot-Ova-CAF01) in Abhängigkeit vom assoziierten Protein und Verabreichungsweg (intranasal und subkutan) in den Lymphknoten- und Milzzellen anhand der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Lymphknoten-Zellen und Splenozyten wurden an Tag 15 und 29 nach intranasaler bzw. subkutaner Verabreichung von QDot-Ova-CAF01 bzw. QDot-CAF01 aus den Mäusen isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei erwiesen sich in beiden sekundären lymphatischen Organen $CD11c^+CD11b^+$ Zellpopulationen als Hauptzellpopulationen, die die markierten CAF01 aufgenommen haben (Abb. 4.37 A, 4.38 A). Weiterhin wurden die $CD11b^+/QDot^+$ bzw. $CD11c^+/QDot^+$ Subpopulationen im Einzelnen untersucht. Dabei wurden im LK sechs und in der Milz sieben unterschiedliche Subpopulationen bestimmt (Abb. 4.37 B, 4.38 B). Die Subpopulationen der unbehandelten Kontrolltiere enthielten keine QDot-haltigen Zellen (Abb. 4.37 A, 4.38 A: Kontr. unbehandelt). Bei den Kontrollen ist die Population 3, $CD11c^{int}CD11b^{hi/hi}$, die bei den LK die meisten QDot-haltigen Zellen enthält, ebenfalls vorhanden, wird aber nicht durch die Impfung ausgelöst (Abb. 4.37 B, 4.38 B: Kontr./3). In den meisten Fällen erfolgte die Aufnahme QDot-markierter Impfstoffträger, die nicht mit Proteinantigen assoziiert waren, effizienter als die der Ova-haltigen Impfstoffträger (Abb. 4.39, 4.40). Die detaillierte Analyse einzelner $CD11c^+CD11b^+$ Subpopulationen zeigte, dass die $CD11c^{int}CD11b^{hi/hi}$ Populationen (Populationen 3) des Lymphknotens die Hauptpopulationen mit fluoreszenzmarkierten CAF01 darstellten (Abb. 4.39 B, C). An Tag 29 nach intranasaler Verabreichung stieg die Zahl QDot-CAF01- bzw. QDot-Ova-CAF01 tragender Zellen im Lymphknoten von ca. 4-8 % auf ca. 20-45 %, wobei nach der subkutanen Verabreichung der maximale Wert von ca. 23 % erreicht wurde. Dabei erhöhte sich die Zahl der QDot-haltigen Zellen von ca. 0,2-0,5 % auf ca. 8-10 % in den $CD11c^{int}CD11b^{int}$ Subpopulationen (Populationen 6). In der Milz war eine ähnliche Situation zu verzeichnen. Bemerkenswert war, dass die $CD11c^{int}CD11b^{low/int}$ Subpopulationen (Populationen 7) am Tag 15 nach intranasaler sowie subkutaner Verabreichung in der Milz schwach vertreten waren (ca. 0,1-0,2 %), wobei die Prozentzahl dieser Populationen am Tag 29 des Experiments auf ca. 20-30 % gewachsen war (Abb. 4.40 B, Vergleich der $CD11b^+/QDot^+$ Zellen). Interessant war, dass die $CD11c^{hi}CD11b^{low}$ Subpopulationen (Populationen 1) keinen Impfstoff enthielten (Abb. 4.40 C).

A

Intranasal, Tag 29, tr. LK

Subkutan, Tag 29, i. LK



B

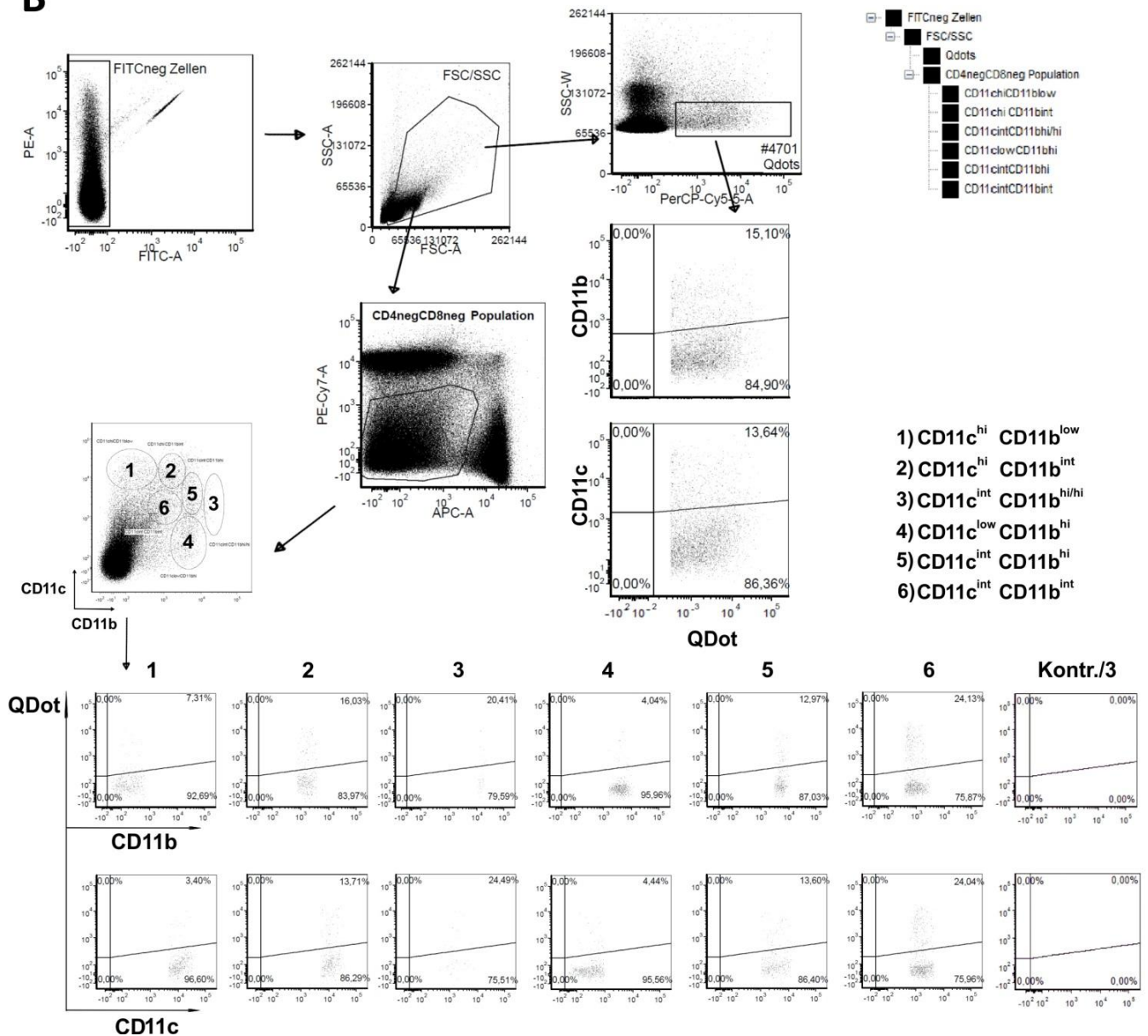


Abbildung 4.37: Analyse der Subpopulationen QDot-tragender Zellen in Lymphknoten.

C57BL/6 Mäuse (n=5) wurden mit QDot-Ova-CAF01 (100 pmol QDots/Dosis, 5 µg Ova/Dosis) bzw. QDot-CAF01 (100 pmol QDots/Dosis) intranasal bzw. subkutan geimpft. Kontrolltiere blieben unbehandelt. An Tag 15 und 29

nach der Verabreichung wurden die Zellen aus den trachealen bzw. inguinalen Lymphknoten isoliert und CD11c⁺, CD11b⁺ Zellen auf das Vorhandensein QDot-haltiger Ova-CAF01 Formulierungen durchflusszytometrisch analysiert. Zur detaillierten Analyse wurden CD11c⁺CD11b⁺ Zellen in einzelne Subpopulationen (1-6) aufgespalten. **(A)** Der Vergleich CD11c⁺CD11b⁺ Zellpopulationen (Tag 29) in Abhängigkeit von Protein und Impfweg. **(B)** Gating-Strategie und Analyse einzelner Subpopulationen auf das Vorhandensein von QDot-haltigen CAF01. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

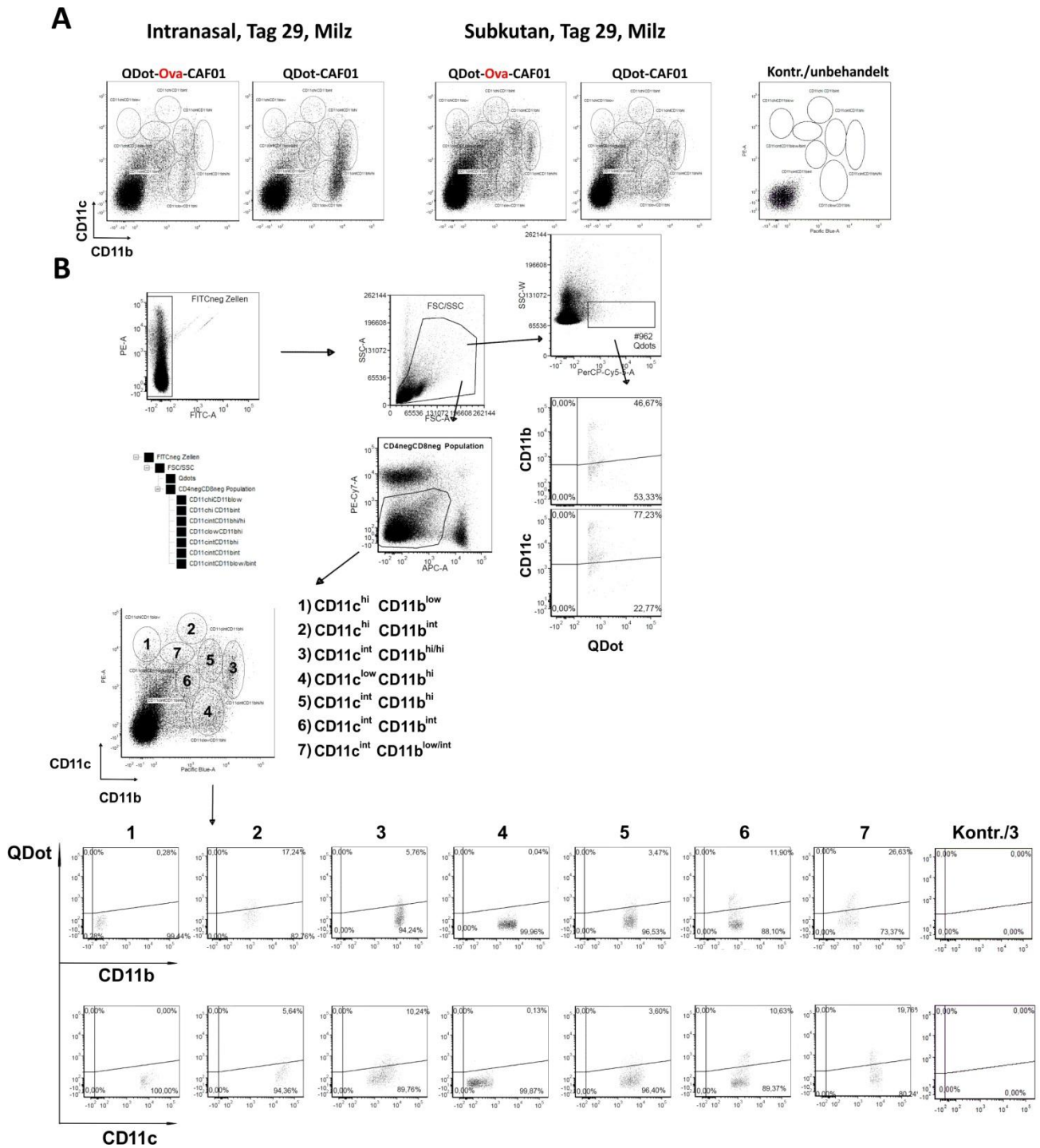
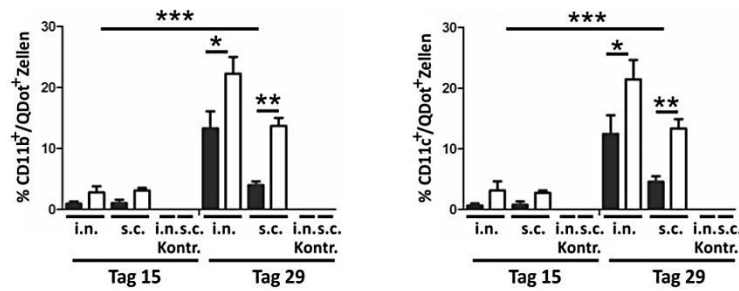


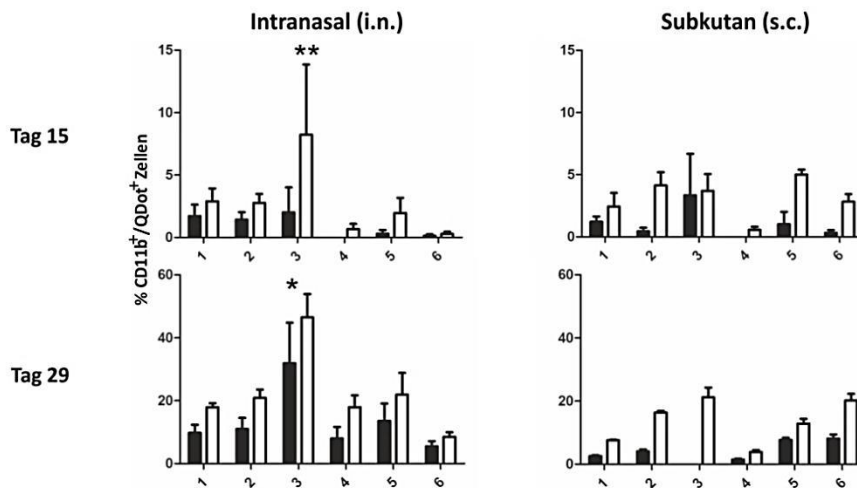
Abbildung 4.38: Analyse der Subpopulationen QDot-tragender Zellen in der Milz.

C57BL/6 Mäuse (n=5) wurden mit QDot-Ova-CAF01 (100 pmol QDots/Dosis, 5 µg Ova/Dosis) bzw. QDot-CAF01 (100 pmol QDots/Dosis) intranasal bzw. subkutan geimpft. Kontrolltiere blieben unbehandelt. An Tag 15 und 29 nach der Verabreichung wurden den getöteten Tieren die Milzen entnommen. Nach Splenozyten-Isolierung wurden die CD11c⁺, CD11b⁺ Zellen auf das Vorhandensein QDot-haltiger Ova-CAF01 Formulierungen durchflusszytometrisch analysiert. Zur detaillierten Analyse wurden CD11c⁺CD11b⁺ Zellen in einzelne Subpopulationen (1-7) aufgespalten. **(A)** Der Vergleich CD11c⁺CD11b⁺ Zellpopulationen (Tag 29) in Abhängigkeit von Protein und Impfweg. **(B)** Gating-Strategie und Analyse einzelner Subpopulationen auf das Vorhandensein von QDot-haltigen CAF01. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

A



B



C

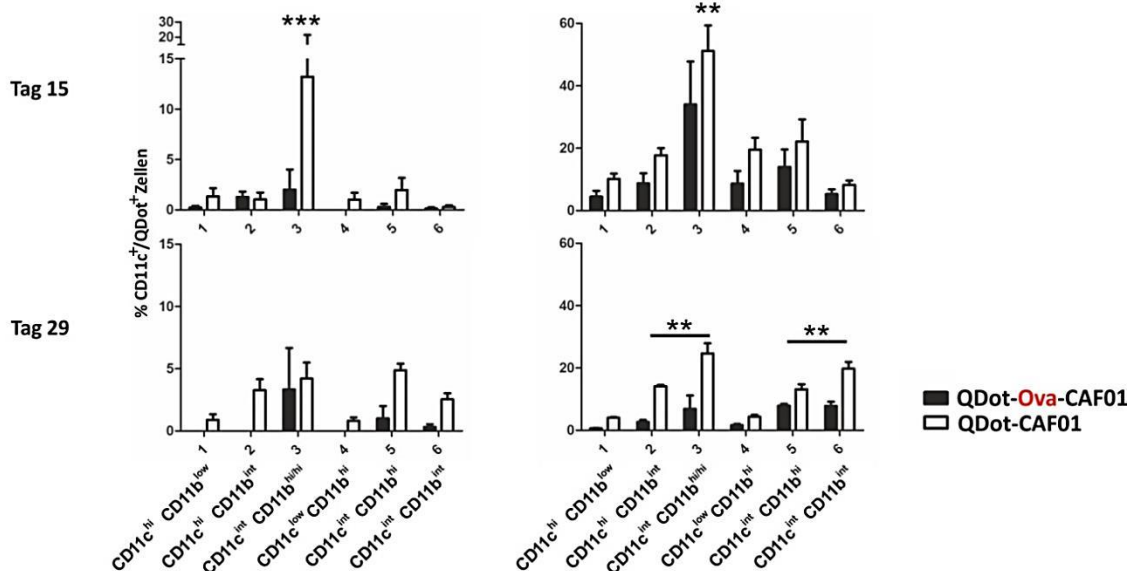
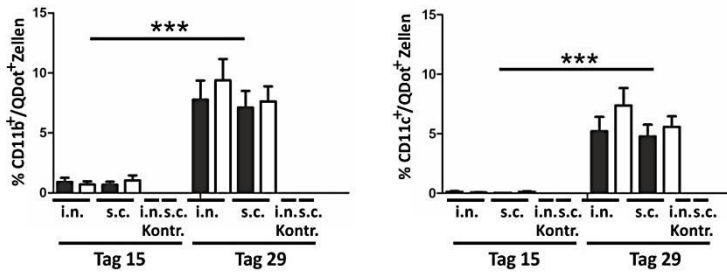


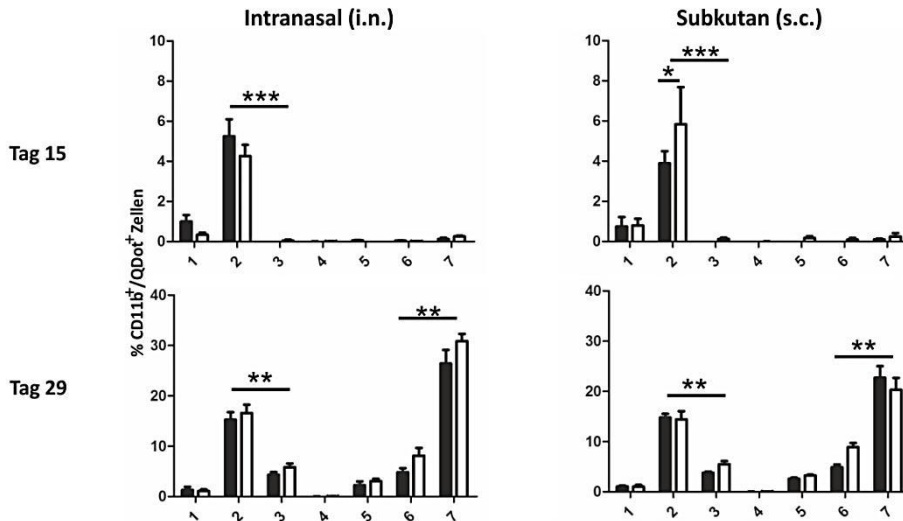
Abbildung 4.39: Quantifizierung QDot-träger Zellen in Lymphknoten.

C57BL/6 Mäuse (n=5) wurden mit QDot-Ova-CAF01 (100 pmol QDots/Dosis, 5 µg Ova/Dosis) bzw. QDot-CAF01 (100 pmol QDots/Dosis) intranasal bzw. subkutan geimpft. Kontrolltiere blieben unbehandelt. An Tag 15 und 29 nach der Verabreichung wurden die Zellen aus den trachealen bzw. inguinalen Lymphknoten isoliert und CD11c⁺, CD11b⁺ Zellen auf das Vorhandensein QDot-haltiger Ova-CAF01 Formulierungen durchflusszytometrisch analysiert. (A) Vergleich der CD11b⁺/QDot⁺ und CD11c⁺/QDot⁺ Gesamtpopulationen. (B) Quantifizierung einzelner Subpopulationen der CD11b⁺/QDot⁺ Zellen. (C) Quantifizierung einzelner Subpopulationen der CD11c⁺/QDot⁺ Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen; *p < 0,05; **p < 0,01, ***p < 0,001.

A



B



C

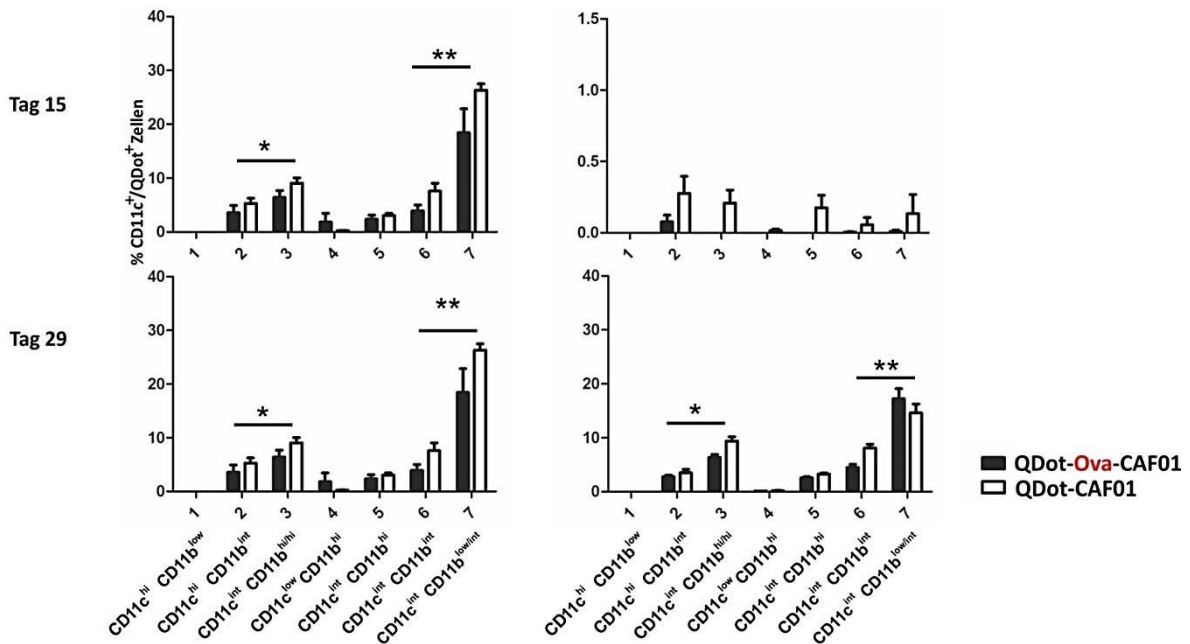


Abbildung 4.40: Quantifizierung QDot-tragender Zellen in der Milz.

C57BL/6 Mäuse (n=5) wurden mit QDot-Ova-CAF01 (100 pmol QDots/Dosis, 5 µg Ova/Dosis) bzw. QDot-CAF01 (100 pmol QDots/Dosis) intranasal bzw. subkutan geimpft. Kontrolltiere blieben unbehandelt. An Tag 15 und 29 nach der Verabreichung wurden den getöteten Tieren die Milzen entnommen. Nach Splenozyten-Isolierung wurden die CD11c⁺, CD11b⁺ Zellen auf das Vorhandensein QDot-haltiger Ova-CAF01 Formulierungen durchflusszytometrisch analysiert. (A) Vergleich der CD11b⁺/QDot⁺ und CD11c⁺/QDot⁺ Gesamtpopulationen. (B) Quantifizierung einzelner Subpopulationen der CD11b⁺/QDot⁺ Zellen. (C) Quantifizierung einzelner Subpopulationen der CD11c⁺/QDot⁺ Zellen. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen; *p < 0,05; **p < 0,01, ***p < 0,001.

5 Diskussion

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) zählen die Impfungen zu den effektivsten und kostengünstigsten Strategien zur Kontrolle und Bekämpfung von Infektionskrankheiten. Der einzig verfügbare Impfstoff gegen die Tuberkulose, BCG, hat nur eine schützende Wirkung gegen die tuberkulöse Hirnhautentzündung beim Kleinkind, kann jedoch die Lungentuberkulose als häufigste Erkrankungsform des Erwachsenen nicht verhindern [106]. In verschiedenen Studien lag die schützende Wirkung von BCG in einem breiten Spektrum zwischen 0 und 80 % [197]. Aus all diesen Gründen wird derzeit weltweit intensiv nach besseren Vorbeugungs- und Behandlungsmethoden gegen die Tuberkulose gesucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kombination aus einem speziellen Bildgebungsverfahren mit leuchtenden rekombinanten *M. tuberculosis* Reporterstämmen etabliert. Dieses Verfahren wurde auf seine Einsetzbarkeit hin getestet, um die Schutzwirkung des neuen Impfstoffkandidaten H56-CAF01 im Tiermodell der Tuberkulose zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wurden der Transport des Impfstoffs zu immunrelevanten Organen, seine Verteilung in myeloiden Zellen und seine Verweildauer in der Maus bzw. ihren Organen (Lunge, Lymphknoten) analysiert.

Der fluoreszierende Reporterstamm *M. tuberculosis* Charge3 hat sich für den Einsatz zur Impfstoffeffizienzanalyse in immunkompetenten Mäusen als optimal erwiesen. Die Fluoreszenzintensität und die Bakterienzahl reichten jedoch nicht für den direkten Nachweis der Erregerlast im lebenden Tier aus. Aus diesem Grund musste die Fluoreszenzintensität an den herausgenommenen Lungen gemessen werden. Damit ermöglicht das Bildgebungsverfahren zwar einen schnelleren Nachweis der KBE eine Reduktion der Tierzahl ist jedoch nicht möglich. Anhand der IVIS Bildgebung wurde eine protektive Wirkung von H56-CAF01 nur im Fall der subkutanen Immunisierung festgestellt. Weitere Untersuchungen zeigten eine gemeinsame Lokalisation von Antigen (Ova) und Adjuvans (CAF01) an den Verabreichungsorten Lunge und Haut, sowie einen gemeinsamen Transport zu den regionalen Lymphknoten. Die CD11c⁺CD11b⁺ Population der myeloiden Immunzellen zeigte sich als dominierende antigenträgende Subpopulation.

5.1 Anwendungsbereiche und Reporter in der optischen Bildgebung

In den letzten Jahren wurden nicht-invasive optische Bildgebungsverfahren besonders intensiv in der Krebsforschung, Neurobiologie und in der Infektionsforschung, z.B. zum Testen verschiedener Wirkstoffe, wie Antibiotika, eingesetzt. „Bildgebendes Verfahren“ fasst als Oberbegriff in der Medizin und speziell in der medizinischen Diagnostik verschiedene apparative Untersuchungsmethoden, die zwei- oder dreidimensionale Bilddaten von Organen und Strukturen des menschlichen Körpers liefern und vor allem zur Diagnose krankheitsbedingter Veränderungen eingesetzt werden, zusammen. Zu diesen Methoden zählen u.a. Röntgenstrahlung, Computertomographische Methoden, Magnetresonanztomographie, Ultraschall, Infrarotstrahlung und Endoskopie. Optische Bildgebung, die auf der Verwendung des Lichts des nahinfraroten (NIR, 700-850 nm) Spektrums basiert, erlaubt im Gegensatz zu bildgebenden Methoden, die auf morphologischen Informationen basieren (z.B. Ultraschall), Informationen auf molekularer und zellulärer Ebene bildgebend darzustellen. Außerdem weisen sie eine Reihe weiterer Vorteile gegenüber anderen Verfahren auf. Durch die Verwendung von energieärmeren elektromagnetischen Wellenlängen werden z.B. keine ionisierenden Wechselwirkungen erzeugt. Darüber hinaus sind optische Bildgebungsverfahren relativ preisgünstig und können portabel konstruiert werden. In der heutigen Zeit stehen diverse Vektor-basierte Fluoreszenzmarker und Substanzen/Fluorochrome, fluoreszierende Nanopartikel und verschiedene Lumineszenz-basierte Reportersysteme, die in der optischen Bildgebung genutzt werden können, zur Verfügung.

Zur Bildgebung in kleinen Tieren werden nicht-invasive optische Verfahren, wie planare und tomographische Bildgebung eingesetzt. Bei der planaren Bildgebung werden die detektierten Signale von speziellen Kameras (CCD-Kameras) in Form von Lichtintensität erfasst und direkt als Bilder dokumentiert. Dabei entstehen „Wärmekarten“, die die Intensitäten der detektierten Photonen darstellen. Hierbei wird zwischen Epi-Illumination (Beleuchtung) und Trans-Illumination unterschieden. Bei der Epi-Illumination befinden sich die Quelle für das Anregungslicht und die Kamera, die das Emissionslicht detektiert, auf derselben Seite des zu untersuchenden Objekts. Dabei fällt das Licht von oben auf das zu untersuchende Objekt. Bei der Trans-Illumination befinden sich die Anregungsquelle und die Kamera auf gegenüberliegenden Seiten des Objekts. Die Lichtquelle befindet sich also unter dem zu untersuchenden Objekt. Die Epi-Illumination ist oberflächenbezogen. Die Trans-Illumination eignet sich besser für die Detektion der Signale aus tieferen Bereichen des Körpers. Für die Beleuchtung kann Licht unterschiedlicher Wellenlängen, die sich aber in einem engen Wellenlängenbereich befinden sollten, verwendet werden. Bei der tomographischen Bildgebung werden einzeln aufgenommene Aufnahmen zu einem dreidimensionalen Bild

rekonstruiert. Hierbei erfolgt die Anregung mit dem Licht einer definierten Wellenlänge und einer konstanten Intensität, weshalb das Licht ausschließlich durch Laser erzeugt wird [175].

Fluoreszenzbildgebung

Optische Fluoreszenz-Bildgebung beruht auf der Lichtemission eines anorganischen Fluorophors bzw. fluoreszierenden Proteins nach Anregung durch eine externe Lichtquelle. Sichtbares Licht dringt nur wenige Millimeter ins Gewebe ein [189]. Licht des NIR-Spektrums kann dagegen Eindringtiefen von mehreren Zentimetern erreichen [198]. Unter Anwendung langwelliger Lichts im NIR-Bereich wird die Lichtabsorption durch Gewebe, Hämoglobin und Wasser verringert [199]. Zusätzlich wird bei der Benutzung von langwelligem Licht die Autofluoreszenz des Gewebes reduziert. Das führt zu einem verbesserten Kontrast bei der Bildererstellung. Neben der Lichtabsorption ist die Streuung des Lichtes im Gewebe ein weiterer Störfaktor. Die Streuung kann bereits ab einer Weite von ca. 1 mm eine Rolle spielen. Sollten Gewebereinheiten größerer Dicke gemessen werden, müssen diese Streuungsvorgänge in Betracht gezogen werden. Im Wellenlängenbereich von ca. 700-900 nm sind die Absorption und die Streuung im biologischen Gewebe relativ gering. Dieser Bereich wird als „diagnostisches Fenster“ bezeichnet [199, 200].

Das Phänomen der Fluoreszenz wurde zuerst im Jahr 1845 von John Frederick William Herschel beschrieben [201]. Dabei berichtete er von einem blauen Glühen einer Chinin-Lösung im Sonnenlicht. Chinin fluoresziert in saurer Lösung bei der Bestrahlung mit ultraviolettem (UV) Licht (365 nm) intensiv hellblau. Im Lauf der Jahre wurde eine Reihe fluoreszierender anorganischer Marker sowie Fluoreszenzproteine (FP) für den Gebrauch in der optischen Bildgebung entwickelt. Nicht zu unterschätzen ist die Rolle des grün fluoreszierenden Proteins GFP, das als Marker für unterschiedliche biologische Prozesse eingesetzt wird. Die meisten fluoreszierenden Reporter, die zu den GFP-Derivaten zählen, emittieren das Licht im blauen, grünen oder gelben Bereich des Lichtspektrums. Für Bildgebung im Gewebe bzw. in Kleintieren sind jedoch rot-fluoreszierende Farbstoffe bzw. Proteine aufgrund ihrer längeren Emissionswellenlängen (581-660 nm) des roten Lichtspektrums am besten geeignet, da das Licht dieser Wellenlängen das Gewebe besser durchdringen kann [161, 162]. Seit der Entdeckung des *DsRed* Proteins aus einer Koralle der Gattung *Discosoma* sp. (1999) wurden mehr als 40 Arten rot-fluoreszierender Proteine für den Gebrauch als Reporterstämme identifiziert [169]. Zu diesen optimierten Abkömmlingen von *DsRed* gehören die Reporterproteine mCherry, tdTomato [172], mKate, Turbo-635, tdKatushka [202] und mPlum [203]. Diese Reporter wurden erfolgreich in den eukaryotischen Systemen angewendet. Deren Derivate, wie z.B. Clontech *DsRed2* wurden in diversen mykobakteriellen Spezies eingesetzt [204-207]. Zu den wichtigsten FP gehören tdTomato und mCherry. Obwohl tdTomato über eine bemerkenswert starke Leuchtkraft (160 % der Leuchtkraft des parentalen *DsRed* Proteins) sowie über eine hohe

Aufbaugeschwindigkeit („*maturation speed*“, die zur vollständigen Ausbildung von Fluorophoreigenschaften benötigte Zeit) verfügt, weist es für die Bildgebung im Tier ungeeignete Anregungs- und Emissionswellenlängen (554/581 nm) auf. mCherry dagegen emittiert Licht der Wellenlänge ≥ 600 nm, schwächer aber als DsRed (27 %), ist genauso photostabil und verfügt über eine vergleichbare Aufbaugeschwindigkeit wie tdTomato. Unsere Kooperationspartner Carroll *et al.* entwickelten eine Reihe rekombinanter *M. tuberculosis* Stämme, die rot-fluoreszierende Reporterproteine (mCherry, mPlum, tdTomato und Turbo-635) exprimieren [171] und in dieser Arbeit in der Maus genutzt wurden.

Für die erfolgreiche Anwendung von FP bei der Bildgebung sollten sie folgende Kriterien erfüllen: sie sollten über passende Anregungs- und Emissionswellenlängen verfügen, im Idealfall eine robuste Photostabilität sowie eine stabile Leuchtkraft und die Aufbaugeschwindigkeit aufweisen. Die Photostabilität ist als die Zeit, in der die FP 50 % ihrer initialen Emission verlieren, definiert. Die Leuchtkraft ist proportional dem Produkt aus einem Quantum-Ertrag (Verhältnis der emittierten Photonen zu den absorbierten) und Extinktionskoeffizienten (Lichtmenge die von 1M Protein-Lösung bei dem Durchqueren einer Strecke von 1 cm absorbiert wird ($M^{-1}cm^{-1}$)) [167, 198, 208].

***M. tuberculosis* Cherry3, Cherry10 und Charge3 als geeignete Fluoreszenzreporterstämme in immundefizienten Mäusen.**

Derzeit existieren unterschiedliche Mausmodelle, mit deren Hilfe verschiedene Aspekte der menschlichen TB untersucht werden. Darunter solche die zur Untersuchung der Hypoxie und Granulom-Nekrose in C3HeB/FeJ Mäusen oder zur Untersuchung der chronischen oder latenten TB Infektion genutzt werden können [209]. Darüber hinaus wird die akute TB in SCID-Mäusen, die aufgrund fehlender B- und T-Zellen keine adaptive Immunität ausbilden können, erforscht [210]. Durch den Einsatz immundefizienter Tiere wird gewährleistet, dass die Infektion vom erworbenen Immunsystem nicht beeinträchtigt wird und somit bei Bedarf die Analyse verschiedener Parameter in Abwesenheit des vollständigen Immunsystems ermöglicht wird. Das hat den Vorteil, dass Infektionsvorgänge, wie z.B. Bakterienwachstum und -fitness in Abwesenheit einer Immunreaktion untersucht werden können.

Zunächst habe ich die Reporterstämme *M. tuberculosis* Cherry3, Cherry10 und Charge3, hinsichtlich ihrer Virulenz, Fitness und Leuchtkraft in immundefizienten SCID-Mäusen getestet. Die Bakterienzahl in den Lungen der mit *M. tuberculosis* Charge3 infizierten Mäusen lag am Tag 26 nach der Infektion mit etwa 8×10^8 Bakterien zwar deutlich niedriger im Vergleich zu den Keimzahlen von *M. tuberculosis* Cherry3 (ca. 1×10^9) und Cherry10 (ca. 3×10^{10}). Dafür war die Leuchtkraft von *M. tuberculosis* Charge3 stärker als die von *M. tuberculosis* Cherry10 bzw. *M. tuberculosis* Cherry3. Als Ergebnis dieser Analyse

wurden die Reporterstämme *M. tuberculosis* Cherry10 und *M. tuberculosis* Charge3 für weitere Analysen in einem immunkompetenten Mausmodell ausgewählt.

Alternativen zu fluoreszierenden Proteinen

Die Nutzung von genkodierte Markern ist für präklinische Untersuchungen in Tiermodellen von großer Bedeutung. Ihre Entwicklung nimmt jedoch eine lange Zeit in Anspruch. Ein weiterer Nachteil ist, dass sie keine klinische Anwendung finden. Leevy *et al.* berichteten über eine bessere Alternative zu den FP Reportern, die sog. NIR Zink-Carbocyanin-Komplexe. Dabei wurde der synthetische Zink-Komplex (Zink(II)dipicolylamine (Zn-DPA)), der sich an die anionische Oberfläche der Bakterien bindet, mit einem NIR Carbocyanin Fluorophor der Emissionswellenlänge 794 nm gekoppelt [211]. In einer weiteren Studie demonstrierten Leevy *et al.* die Anwendung von diesen Zink-Carbocyanin-Komplexen in *Staphylococcus aureus* Infektionen in einem Mausmodell [212]. Als Detektionslimit wurde die Bakterienzahl von 5×10^7 KBE infolge einer intramuskulären Injektion ins Mausbein sowie nach intravenöser Applikation von NIR-Reportern ermittelt. Die Bildgebung erfolgte aber in weniger tiefen Gewebebereichen sowie in isolierten Organen mit geringerem Hintergrund. Für die Bildgebung tieferer Gewebebereiche, bei der eine höhere Hintergrundfluoreszenz auftritt, ist eine Steigerung der Sensitivität, bedingt durch eine höhere Bakterienanzahl in der späteren Phase der Infektion, notwendig.

Ferner zeigten Kong *et al.* eine auf der konstitutiven Expression des Enzyms β -Lactamase basierte Anwendung eines Reportersystems zur Visualisierung der Mykobakterien in der Maus [213]. Durch β -Lactamase wird eine Spaltung eines fluorogenen Substrats katalysiert. Dadurch kommt es zur Lichtemission im NIR-Spektrum. Das exogen verabreichte Substrat besteht aus dem Fluorophor Cy5 bzw. Cy5.5, das durch einen β -Lactamring mit einem Quencher QSY21 verbunden ist. Der ungespaltene Cy5/Cy5.5-Quencher-Komplex ist nicht fluoreszent (FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) Effekt). Der Vorteil dieses Reportersystems liegt darin, dass die β -Lactamase auf der Oberfläche von *M. tuberculosis* lokalisiert ist und das Substrat im Unterschied zu den endogenen Enzymen das oberflächenassoziierte Enzym besser erreichen kann, da die bakterielle Zellwand nicht durchgedrungen werden muss.

Als eine weitere Alternative zu FP werden Quantum Dots (QDots) benutzt. QDots kleine fluoreszierende anorganische Nanokristalle, die über nützliche optische Eigenschaften, wie z.B. eine sehr starke Leuchtkraft und Photostabilität sowie breite Anregungs- und enge Emissionswellenlängen-Bereiche charakterisiert sind [214]. Ihre Emissionswellenlängen sind von der Größe der Nanopartikel abhängig und variieren in ihrer Strahlung von ultraviolett bis infrarot. Dem Zweck entsprechend können QDots verschiedener Größen hergestellt werden, die dann über

bestimmte Eigenschaften verfügen. Bei der Durchführung der Untersuchungen muss die Größe der Partikel berücksichtigt werden. Leevy *et al.* koppelten die oben beschriebenen Zn-DPA-Komplexe mittels Biotin/Streptavidin Linker an die fluoreszierenden QDots, die Emissionswellenlängen von 800 nm aufwiesen [211]. Nach der Verabreichung dieser Komplexe wurde festgestellt, dass die Bindung an Zielstrukturen auf *S. aureus* und „glatten“ *Escherichia coli* durch die Größe der QDots beeinträchtigt war. Zusätzlich wurde die Leuchtkraft der QDots gemindert. In einer „rauhem“ Mutante von *E. coli* wurde dagegen aufgrund der fehlenden O-Antigene der Polysaccharide der Zellwand, welche die Bindung von Zn-DPA-QDot-Komplexen an die tiefer gelegenen Lipid A Komponenten stören, eine effektivere Färbung erreicht. Nach der Injektion 10^8 vorgefärbter *E. coli* konnte ein erhöhtes Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*) im Vergleich zum Zn-DPA/NIR Reporter festgestellt werden. Obwohl eine Reduktion der Autofluoreszenz durch die Benutzung von NIR-emittierenden QDots erreicht wurde, konnten die nachteiligen Eigenschaften wie Absorption und Streuung des Anregungslichtes nicht beseitigt werden. Zudem absorbieren die QDots besonders intensiv das blaue Licht, was zu einer weiteren Abschwächung des Anregungslichtes führt [212]. Um dieses Problem zu lösen, entwickelten So *et al.* die sog. „self-illuminating“ QDots [215, 216]. Hierbei wurden die kommerziell erworbenen QDots in Verbindung mit der *Renilla* Luciferase (Luc^8) [217] eingesetzt. Bei der Katalyse des Substrats Coelenterazin wurde blaues Licht erzeugt, das zur Anregung der QDots diente (Biolumineszenz-Resonanz-Transfer). Dadurch konnte das Signal-Rausch-Verhältnis um das 1000-fache erhöht werden.

In immunkompetenten Tieren zeigte sich der Reporterstamm *M. tuberculosis* Charge3 für die IVIS Bildgebung als am besten geeignet.

Die Analyse der Impfstoffwirkung erfordert den Einsatz immunkompetenter Tiere. Aus diesem Grund wurden *M. tuberculosis* Reporter auf ihre Eignung für die IVIS Bildgebung in immunkompetenten SKH-1 Mäusen getestet. In diesen Analysen hat sich *M. tuberculosis* Charge3 für den Einsatz in weiteren Analysen zur Impfstoffeffizienz als optimal erwiesen. Allerdings kann die Impfstoffwirkung nur in den isolierten Organen getestet werden, da die Fluoreszenzsignale im lebenden Tier zu schwach sind, um den Brustkorb der Maus zu durchdringen. Die Minderung der Reportersignale kann zum einen durch die Absorption des Lichtes durch Gewebebestandteile, wie Hämoglobin, Lipide, Wasser sowie Luft in der Lunge verursacht werden. Zum anderen wird das emittierte Licht durch die Streuung abgeschwächt [198, 200]. Durch die Krankheitsprozesse, wie die Ausbildung der Granulome bzw. entzündlicher Infiltrate wird die Struktur des Lungengewebes ebenfalls verändert. Dadurch werden Absorption und die Streuung des Lichts beeinflusst. Ferner können durch die pathologischen Veränderungen im Lungengewebe die Expression der Fluoreszenzproteine oder die metabolische

Aktivität der Enzyme der Biolumineszenz-Reportersysteme beeinträchtigt werden. Auch die Studien zur Antibiotikawirkung zeigten, dass Fluoreszenzsignale von *M. tuberculosis* Charge3 nur in den isolierten Lungen optimal detektiert werden konnten [184].

Lumineszenz-Bildgebung

In der Krebsforschung kann mit Hilfe von Biolumineszenzmarkern das Wachstum von Tumoren bzw. die Bildung von Metastasen verfolgt werden [218, 219]. Biolumineszenz wurde ebenfalls zur Quantifizierung von Pathogenen im Wirtsorganismus benutzt [179, 220-222]. Ferner ermöglichen Luciferase-Luciferin-Systeme als Fusionsproteine oder gekoppelt an bestimmte Promotoren die Genexpression *in vitro* und *in vivo* zu visualisieren [223-225]. In der mykobakteriellen Forschung wird die Biolumineszenz bereits seit 20 Jahren angewendet. Das Luciferase-System des Glühwürmchens *Photinus pyralis* (Ffluc) ist im Vergleich zu bakteriellen Luciferase-Systemen (*luxCDABE*) und Systemen der Weichkoralle *Renilla reniformis* sowie des Flohkrebsschens *Gaussia princeps* (Gluc) das effizienteste lichterzeugende System [173, 175]. Ursprünglich wurde das Ffluc-System zur Analyse der Vitalität und zur Quantifizierung lebender Bakterien genutzt [226, 227]. Derzeit gibt es viele biolumineszenzbasierte Modelle, die Informationen zur Zellzahl und Lokalisation mikrobieller Pathogene im Organismus liefern. Darüber hinaus erlauben diese Modelle die Durchführung der Analysen zu Expressionsraten und Virulenz bestimmter mikrobieller Gene. Außerdem werden diese Modelle zu Untersuchungen von Antibiotika- bzw. Vakzin-Effizienz genutzt [198]. In Anbetracht der langsamen Vermehrung von Mykobakterien war es von Vorteil, neue alternative Methoden zur Ermittlung der Bakterienzahl zu entwickeln. Üblicherweise wird die Keimlast durch KBE ermittelt. Das nimmt jedoch viel Zeit in Anspruch, da die Kolonien erst 4-5 Wochen nach dem Ausplattieren der Bakterien ausgezählt werden können. Hierzu wurden diverse mykobakterielle Lumineszenz-Reporterstämme hergestellt (*M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG, und sogar *M. avium*, *M. intracellulare* und *M. aurum*) die entweder bakterielle (LuxAB)- oder Glühwürmchen (Ffluc)-Luciferasen exprimieren [228-234].

Darüber hinaus wurde die Nutzung von Luciferase-basierten Reporterphagen zur Analyse der Antibiotika-Suszeptibilität der klinischen Stämme bzw. zu diagnostischen Zwecken beschrieben [235-239]. Eine Vielzahl von Publikationen zeigt den Gebrauch biolumineszenter Reporter in Bakterien (*Bacillus anthracis* [240], *Listeria monocytogenes* [241], *Salmonella enterica* serovar Typhi [242], *Brucella melitensis* [222], *Neisseria meningitidis* [243]), in viralen Pathogenen (HSV-1 (Herpes Simplex Virus Typ 1) [244, 245], SV (Sindbis Virus) [246]) und in Pilzen (*Aspergillus fumigatus* [247], *Candida albicans* [248]) und Parasiten (*Trypanosoma* spp. [249], *Leishmania* spp. [250], *Toxoplasma gondii* [251-254], *Plasmodium berghei* [255, 256]).

In der TB-Forschung werden biolumineszente Stämme zur Visualisierung der Infektionskinetik sowie zu Effizienzanalysen von Antibiotika eingesetzt. Biolumineszenz-Bildgebung *in vivo* wurde zuerst 2009 anhand von biolumineszenten *M. bovis BCG* in immundefizienten Mäusen zur Analyse der mykobakteriellen Infektion angewendet [182]. Dieser Reporterstamm enthielt nur *luxAB* Gene, die das Enzym Luciferase kodierten. Zur Visualisierung von Bakterien wurde das toxische Aldehyd Decanal als Substrat in einer Mischung aus Olivenöl und Ethanol intraperitoneal injiziert. Dadurch wurde das Substrat nicht effizient zum Zielorgan Lunge transportiert. Das führte zu einer mangelhaften Visualisierung von *M. bovis BCG*. 2010 wurden die ersten Ergebnisse zur Anwendung von biolumineszenten *M. tuberculosis* publiziert [175]. Diese Studie zeigte eine erfolgreiche Detektion von *M. tuberculosis*, die entweder FFluc- oder Lux-Gene exprimierten. Es wurde zum ersten Mal gezeigt, dass das gesamte *lux* Operon in Mykobakterien erfolgreich exprimiert werden konnte. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass dieser autolumineszente *M. tuberculosis* Stamm, der das vollständige *lux* Operon, also sowohl die Gene, die für das Enzym Luciferase kodieren als auch die, die für die Enzyme zur Herstellung des Substrats kodieren, enthält, zum Testen der Wirkstoffe und Vakzine gegen TB genutzt werden konnte. Die Lumineszenz wurde dabei in homogenisierten Lungenlysaten im Luminometer gemessen. Andreu *et al.* haben die biolumineszenten *M. tuberculosis*, die ein FFluc-basiertes System zur Licht-Erzeugung aufweisen, in immundefizienten Mäusen zum Test des antimykobakteriellen Antibiotikums, Rifampicin, erfolgreich eingesetzt [185]. Ferner wurde unter Verwendung von Biolumineszenz die Wirkung von antimykobakteriellen Antibiotika Rifampizin und Isoniazid in einem immundefizienten Maus-Modell nach der Infektion von *M. bovis BCG* evaluiert [181,183]. In Vakzinierungsstudien wurden bisher keine biolumineszierenden *M. tuberculosis* Reporterstämme verwendet. Im Vakzinierungsfeld wurden bisher lumineszente *Brucella melitensis* [257], Salmonellen [258] und *B. anthracis* angewendet [259].

Alternativ zu den fluoreszierenden Reporterstämmen habe ich in dieser Studie den biolumineszenten FFluc-exprimierenden *M. tuberculosis* Stamm (FFluc-RT) auf seine Eignung als Reporterstamm in einem immunkompetenten Mausmodell mittels IVIS Bildgebung getestet. Dabei konnte in den Lungenbereichen lebender Mäuse über die gesamte Dauer des Experiments von 80 Tagen keine Lumineszenz detektiert werden. In den entnommenen Lungen konnten die ersten Lumineszenzsignale am Tag 15 nach der Infektion gemessen werden. Am Tag 35 des Experiments wurde eine sehr schwache Lumineszenz detektiert (Abb. 4.6). Um die Funktionalität der Luciferase zu überprüfen, wurde das Substrat Luciferin erneut auf die explantierten Lungen pipettiert. 5-15 Minuten nach erneuter Gabe von Luciferin konnte die Lumineszenz in den Lungen detektiert werden (Abb. 4.6 D). Generell gelten biolumineszierende Reporter-Systeme als sensitiver als fluoreszierende [198]. Als eine der Ursachen für die fehlende Biolumineszenz im lebenden Tier könnte der Sauerstoffmangel in Granulom-ähnlichen Lungenbereichen in Betracht gezogen werden, da die

Oxidation des Substrats durch die Luciferase sauerstoffabhängig ist. Als weitere Ursache kann eine schlechte Diffusion des intraperitoneal verabreichten Luciferins zu dem Reaktionsort gelten. Zudem war die Bakterienzahl des FFluc-Stammes um eine logarithmische Stufe niedriger gegenüber dem Wildtypstamm H37Rv. Somit erwies sich dieser Stamm aufgrund seiner reduzierten Fitness und Leuchtkraft für die Impfstoffanalysen als nicht geeignet.

5.2 Das rekombinante Spaltvakzin H56-CAF01 zeigt eine schützende Wirkung nach der intranasalen Verabreichung

Die parenterale Verabreichung ist für die meisten Impfstoffe der klassische Applikationsweg. Eine Mehrzahl aller Infektionen beginnt auf mukosaler Ebene. Das führt zur Hypothese, dass eine geeignete mukosale Antwort gegen Pathogene, die über Schleimhäute in den Körper eindringen, zu einer besseren Abwehr beitragen könnte. Somit könnte für die Schutzwirkung gegen eine Lungeninfektion wie die Tuberkulose die intranasale Verabreichung, d.h. die Aufnahme über das Atemwegsepithel optimal sein. Die Art der Vakzinverabreichung kann eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung einer protektiven Immunantwort haben. Die intranasale Verabreichung könnte den Vorteil haben, dass der Impfschutz direkt an der Eintrittspforte des Erregers stimuliert werden könnte. Leider zeigen jedoch die meisten klinisch relevanten Impfstoffkandidaten nach mukosaler Verabreichung über die Atemwege nur schwache Immunantworten und haben darüber hinaus oft nicht die Fähigkeit biologische mukosale Barrieren zu überwinden.

Giri *et al.* zeigten, dass nach intranasaler Verabreichung des Antigens Ag85B, das mit dem Adjuvans DDA (Ag85B und DDA sind Bestandteile von H56) appliziert wurde, eine robuste schützende Wirkung gegen *M. tuberculosis* in der Maus induziert werden konnte [260]. In den Untersuchungen von Blazevic *et al.* wurde dagegen kein signifikanter Schutz nach einer Grundimmunisierung mit BCG und darauffolgender Boost-Immunsierung mit Ag85B, das mit dem Adjuvans CpG (Oligodeoxynukleotid mit unmethylierten Cytosin-Phosphat-Guanin-Motiven) verabreicht wurde, gegen eine Infektion mit dem GFP-exprimierenden BCG erreicht [261]. Todoroff und Kollegen haben ein homologes mykobakterielles Antigen Ag85A in Kombination mit verschiedenen mukosalen Adjuvantien (CpG, MPLA (Monophosphoryl Lipid A aus *Salmonella minnesota*) und LTB (B Untereinheit (subunit) des Hitze-stabilen Endotoxins von *Escherichia coli*) auf eine protektive Wirkung in BALB/c Mäusen getestet. Unter Anwendung von CpG und MPLA konnte eine Ausbildung der T_H1 -polarisierten Antwort mit der charakteristischen Produktion vom antigenspezifischen IFN- γ sowie eine Reduktion der Bakterienzahl in Lunge und Milz bewirkt werden. Durch LTB konnte dagegen nur eine Entzündung, jedoch keine Verminderung der Keimlast in der Lunge ausgelöst werden. MPLA löste

zusätzlich eine spezifische T_H17-basierte Immunantwort aus. Somit wurden mit CpG und MPLA zwei potentielle mukosale Adjuvantien identifiziert, die T_H1 und T_H17 Immunantworten in der Maus auslösen können [262].

T_H17-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr, besonders gegen Pathogene, die durch mukosale Oberflächen in den Körper gelangen. Durch die Produktion von IL-17 induzieren die T_H17-Zellen die Synthese von Chemokinen, wie IL-8, und antimikrobiellen Peptiden in Epithelzellen und tragen durch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zur Entzündung bei.

Für das Adjuvans CAF01 wurde gezeigt, dass es bei der Abwehr gegen *M. tuberculosis* neben der Induktion einer robusten T_H1 Immunantwort auch die T_H17 Antwort einleiten kann [263]. Dabei waren in C57BL/6 Mäusen nach intranasaler Verabreichung verschiedener Mykobakterien- und Chlamydien-Antigene in CAF01 Adjuvans eine Generierung von T_H1 und T_H17 Gedächtniszellen noch zwei Jahre nach der Immunisierung nachzuweisen. Als mykobakterielle Antigene dienten in dieser Studie H1 und H28, H1 ist ein Fusionsprotein, das Ag85B und ESAT-6 beinhaltet, H28 besteht aus einem RV2660c-Ag85B-TB10.4 Proteinkomplex. In einer weiteren Studie führte die Vakzinierung mit den *M. tuberculosis*-Antigenen Culp (*Cutinase-like proteins*)-1 und -6, sowie mit MPT83, die in Kombination mit dem Adjuvans Lipokel (Lipotek Pty Ltd.), welches den TLR2-Signalweg aktiviert, in Form eines Pulvers (dry powder) verabreicht wurden, zu einer erhöhten Zahl an spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten, mehr IFN- γ -produzierender Zellen und einer verstärkten IgG Produktion vier Wochen nach der Verabreichung [264].

Für Ag85A wurde gezeigt, dass in Verbindung mit einem alternativen Impfstoffträger (*Gum Nanoparticles*), bei einer oralen Vakzinierung gute mukosale und systemische Immunantworten induziert werden konnten [265].

Die Vakzinierung von nicht-humanen Primaten mit AERAS-402, das den Tieren durch Inhalieren verabreicht wurde, führte zu einer hohen Zahl an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut und der bronchoalveolaren Flüssigkeit [266]. Die orale Applikation von BCG Danish Vakzin bei den Dachsen hatte ebenfalls eine gute schützende Wirkung, die sich anhand der Bakterienlast in Lunge und Thorax-Lymphknoten, der pathologischen Veränderungen und der Produktion von IFN- γ äußerte [267].

Diese Befunde zeigen, dass die Wahl des Antigens sowie des Adjuvans in Verbindung mit einer optimalen Verabreichungsart eine entscheidende Rolle bei der Induktion der mukosalen/pulmonalen Immunität spielt. Leider existieren derzeit nicht viele wirksame mukosale Adjuvantien, die nicht entzündlich sind und gleichzeitig eine robuste zelluläre Antwort auslösen und nicht zur Toleranz gegenüber dem Impfstoff führen.

Ein weiterer Vorteil der intranasalen Impfstoffverabreichung besteht darin, dass der Impfstoff als Spray verabreicht werden kann. Die Bereitschaft des Menschen, sich auf diesem Wege der Impfung zu unterziehen, kann aufgrund unkomplizierter und schmerzfreier Verabreichung gesteigert werden. Außerdem hat die Anwendbarkeit eines solchen Sprays enorme Vorteile im Pandemiefall, wenn unter Umständen mehrere Personen gleichzeitig geimpft werden müssen. Außerdem kann das Risiko, Krankheiten durch unsachgemäßen Gebrauch von Spritzen zu übertragen, vermieden werden.

Die Schutzwirkung von TB-Impfstoffen kann durch die Anwendung unterschiedlicher Prime-Boost-Impfstrategien verstärkt werden [268-270]. Dabei werden verschiedene Immunisierungskombinationen getestet. In dieser Studie wurden zwei heterologe Prime-Boost-Impfstrategien miteinander verglichen. In der ersten wurden die Tiere mit BCG immunisiert (Prime-Vakzinierung), in der zweiten wurden die Tiere zunächst mit BCG vorimmunisiert, danach erfolgten zwei weitere Vakzinierungen mit H56-CAF01 (Boost-Vakzinierung). Durch die Vorimmunisierung mit BCG reduzierte sich die Zahl der Bakterien in den Lungen auf ca. 1×10^5 KBE und lag somit schon unter dem Detektionslimit der IVIS Bildgebung ($1 \times 10^6 / 1 \times 10^7$ KBE) (Abb. 4.12).

Anhand von IFN- γ und IL-2 ELISPOT Analysen (PBMC) wurde gezeigt, dass Tiere, die nach einem BCG/H56-CAF01 Prime-Boost-Schema geimpft wurden, besser geschützt waren als Tiere, die nur mit BCG immunisiert wurden [266]. Die Tiere wurden in diesem Experiment über einen Zeitraum von 65 Wochen nach der Infektion mit *M. tuberculosis* untersucht. Darüber hinaus waren Primaten, die auf diese Weise geimpft wurden, gegen eine Reaktivierung einer latenten Tuberkulose durch anti-TNF Antikörper-Behandlung geschützt.

Auch in Mausmodellen zeigten diverse Prime-Boost-Impfstrategien vielversprechende Ergebnisse. Verschiedene Prime-Boost-Vakzinierungsstrategien induzieren robuste T-Zell-Antworten und verstärken die Impfstoffwirkung von BCG [268]. Die meisten der neuen Impfstoffkandidaten sind so konstruiert, dass sie als Boost-Vakzine zur Verstärkung des BCG-Schutzeffekts eingesetzt werden.

Neben der Entwicklung von heterologen Prime-Boost-Impfschemen werden weitere Strategien zur Verbesserung des Schutzeffektes, wie z.B. die Art der Impfstoffverabreichung, ausgearbeitet. BCG wird normalerweise intradermal verabreicht, wird aber auch bezüglich intranasaler oder oraler Applikation getestet [268]. Mit dieser intranasalen Strategie soll die Aktivierung der regionalen Abwehrmechanismen in der Lunge, also am Wirkort des Erregers der Lungentuberkulose, erzielt werden. In dieser Studie wurden bei der Untersuchung der Schutzwirkung von H56-CAF01 zwei Applikationswege (subkutan und intranasal) angewendet, um einen für die Induktion der Schutzwirkung effektiveren Applikationsweg zu ermitteln. Nur im Fall der subkutanen Impfstoffverabreichung konnte eine signifikante Schutzwirkung von H56-CAF01 in IVIS Analysen sowie der Ermittlung der KBE festgestellt werden (Abb. 4.8). So löst die subkutane Vakzinierung eine

effektivere Abwehrreaktion gegen die experimentelle Tuberkulose aus. Das kann durch das länger bestehende Depot am Verabreichungsort „Haut“ im Gegensatz zur Lunge bedingt sein. Durch das respiratorische System werden die verabreichten Impfstoffe schneller ausgeschieden, wie es teilweise durch meine Ergebnisse zur Verteilung von Vakzinen gezeigt wurde (s. 4.3.2). Außerdem kann bei der intranasalen Applikation ein Teil des verabreichten Impfstoffs direkt in den Magen gelangen. Überdies sind die Aufnahme, Präsentation und der Transport von Impfstoffen durch antigenpräsentierende Zellen zu den sekundären immunologischen Organen (Lymphknoten, Milz) wichtig. In den subkutan vakzinierten Tieren war eine niedrigere Zahl der inflammatorischen Bereiche in den Lungen zu beobachten (Abb. 4.10, 4.14).

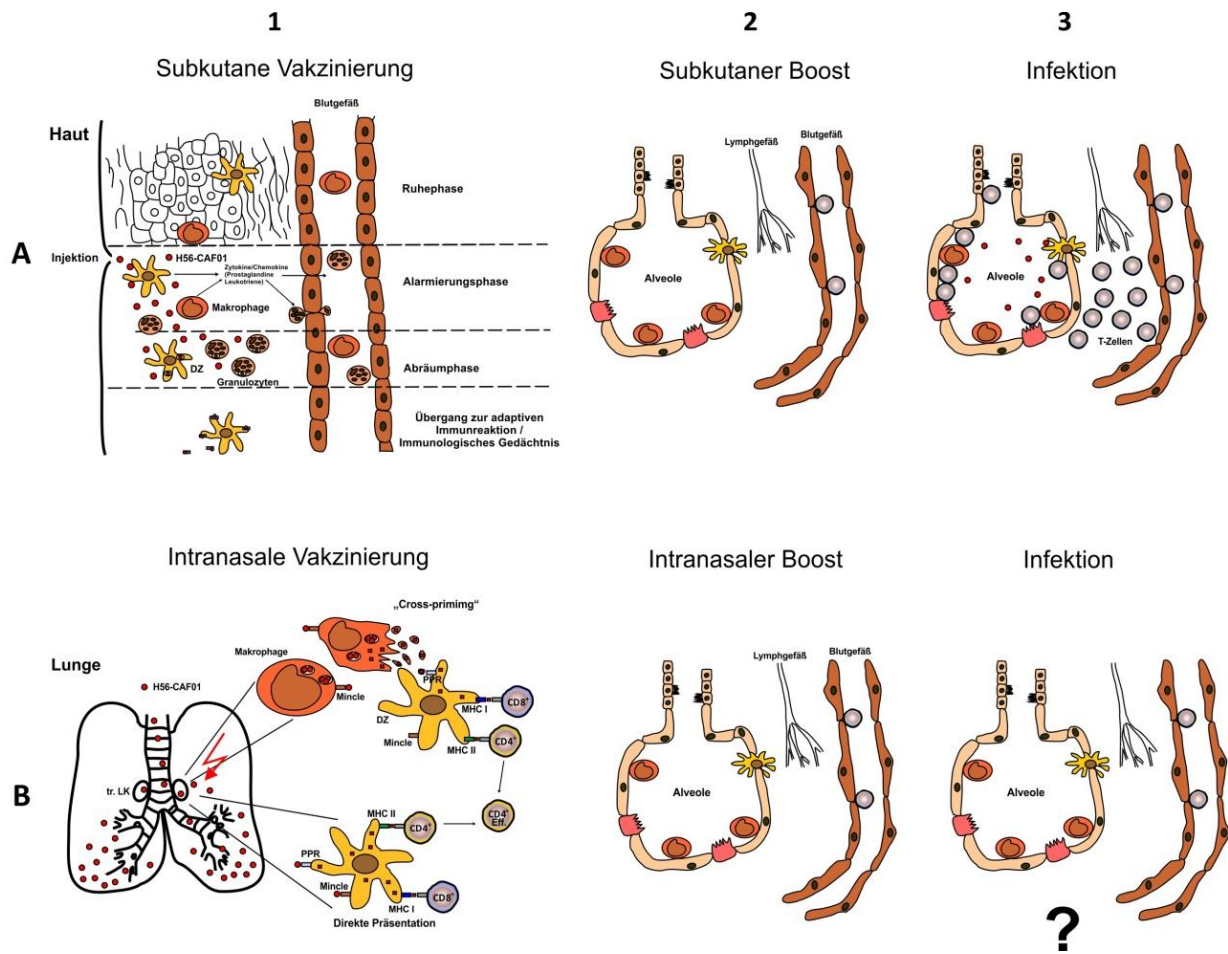


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Immunzellaktivierung und -rekrutierung entsprechend der Wege der Impfstoffverabreichung basierend auf unseren Daten.

Nach subkutaner Injektion des Impfstoffs setzen aktivierte Makrophagen und DZ Botenstoffe frei, die dazu führen, dass in benachbarten Gefäßen zirkulierende Leukozyten (neutrophile Granulozyten, Monozyten [die dann zu Makrophagen reifen]) an Endothelzellen anhaften, die Endothelschicht durchwandern (Transmigration) und ins Gewebe eindringen (**A**). Durch einen Chemokingradienten angezogen und durch Zytokine aktiviert, phagozytieren die eingewanderten Zellen die eingedrungenen Partikel und perpetuieren durch eigene Zyto-/Chemokin-Sekretion die Entzündung. DZ wandern über die Lymphe in den drainierenden Lymphknoten und präsentieren Peptide der aufgenommenen Antigene mittels MHC-Klasse-I/II-Moleküle den CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen, die dadurch aktiviert werden. Nach der Aufnahme des Impfstoffs durch APZ in der Lunge (**B**) werden diese aktiviert und wandern in die LK. Dort werden die prozessierten Antigene über MHC-Klasse-I/II-Moleküle den T-Zellen angeboten, die dadurch aktiviert werden. Eine intranasale Boost-Vakzinierung mit Antigen-CAF01 (**B2**) sollte zum vermehrten Einwandern Antigen-spezifischer T-Zellen in die Lunge im Vergleich zur subkutanen Boost-Vakzinierung (**A2**) führen. In meinen Untersuchungen wurde jedoch nur eine schützende Wirkung durch H56-CAF01 nach subkutaner Verabreichung des Impfstoffs festgestellt. Durch die intranasale Applikation wurde dagegen keine Schutzwirkung erzielt. Daraus schließen wir, dass trotz Atemwegs-assoziiertes Immunisierung und folgender Infektion keine Antigen-spezifischen T-Zellen in die Lunge rekrutiert wurden, interessanterweise aber nach subkutaner Immunisierung. Warum dies so ist, müssen zukünftige Studien zeigen.

5.3 Verteilung von Impfstoffen im Mauskörper

Makrophagen bilden als phagozytierende Zellen die erste Abwehrfront gegen Infektionen. Sie sind in der Lage nach ihrer Aktivierung durch Aufnahme von körperfremden Stoffen kostimulierende Moleküle sowie MHC-Klasse-II-Moleküle zu exprimieren. Dadurch fungieren sie als antigenpräsentierende Zellen, aktivieren jedoch die T-Zellen nicht so effizient wie dendritische Zellen. Dendritische Zellen sind die wichtigsten APZ, deren Hauptaufgabe darin besteht, Antigene aufzunehmen und durch deren Präsentation T-Zellen zu aktivieren. DZ nehmen an Verabreichungsorten bzw. an Infektionsherden die Antigene auf und werden aktiviert. Dadurch wandern sie anschließend ins lokale Lymphgewebe und reifen dort zu den Zellen heran, die den zirkulierenden T-Zellen die aufgenommenen Antigene präsentieren. Die Aktivierung einer naiven T-Zelle durch ihren Kontakt mit dem Antigen-MHC-Komplex bildet zusammen mit ihrer anschließenden Proliferation und Differenzierung die primäre Immunreaktion. Dabei entstehen T-Effektorzellen und in der Folge T-Gedächtniszellen. Die Aufgabe der Impfstoffe besteht darin, effektiv das immunologische Gedächtnis zu erzeugen, um den Organismus vor späteren Angriffen der Pathogene, die die gleichen Antigene aufweisen, zu schützen. Die Aufnahme von Impfstoffen kann zum einen von ihren Depoteigenschaften und zum anderen von ihrer Zusammensetzung abhängen. Rekombinante Spaltvakzine besitzen, aufgrund ihrer fehlenden PAMP-Strukturen und der Anfälligkeit für schnelleren proteolytischen Abbau durch Enzyme der Wirtszelle, oft nur schwache Immunogenität. Aus diesen Gründen werden sie gemeinsam mit Adjuvantien verabreicht. Die Art des Adjuvans beeinflusst die Aufnahme des Antigens durch APZ und deren Aktivierung. Die einzigen Adjuvantien, die für den Gebrauch im Menschen bereits seit 85 Jahren lizenziert sind, Aluminiumbasierte Mineralsalze (Präzipitate der Aluminiumphosphate und Aluminiumhydroxide, Alum) sind zwar wenig toxisch aber vor allem gute Auslöser für eine effiziente B-Zell Antwort. In den letzten 10 Jahren sind weitere Adjuvantien, wie Virosomen (bestehend aus viralen Proteinen, die in ein Phospholipid-Bilayer integriert sind; Fa. Crucell, Niederlande,) und „oil-in-water“ (o/w) Emulsion MF59® (Novartis, Schweiz,) für den Gebrauch in Menschen zugelassen worden [271-273]. In den letzten Jahren wurden die weiteren „Adjuvans Systeme“ AS03 (*squalen* o/w Emulsion) und AS04 (Aluminiumhydroxid in Kombination mit dem TLR-Agonisten Monophosphoryllipid A (MPL); GlaxoSmithKline Biologicals (GSK), Belgien) lizenziert [273, 274]. Die Wirkung dieser Adjuvantien ist in vielen Krankheiten limitiert, da sie nur schwache T_H1 und CTL (*Cytotoxic T-Lymphocyte*) Immunantworten, die eine entscheidende Rolle bei der Abwehr der intrazellulären Pathogene, wie *M. tuberculosis* spielen, induzieren. Durch die Entwicklung Liposomen-basierter Adjuvantien wurden wirkungsvolle Impfstoffträger entdeckt, mit deren Hilfe T_H1 und CTL Antworten induziert werden können. Für Liposomen wurde gezeigt, dass sie dank ihrer lipophilen Bestandteile mit den Membranen der Zielzellen fusionieren können [275]. Zudem können sie aufgrund ihrer partikulären

Natur von den professionellen phagozytierenden Immunzellen aufgenommen werden. Dabei kann die Aufnahme von der Größe und Ladung der Partikel abhängig sein. Darüber hinaus spielt die Art der Aufnahme eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung verschiedener intrazellulärer Mechanismen von APZ. Das hat den Vorteil, dass durch die Modifizierung der Liposomen bestimmte Endozytosewege induziert werden können. Dadurch wird eine spezifische Immunantwort, die sich in der Expression bestimmter relevanter kostimulatorischer Moleküle äußert, eingeleitet. Grundsätzlich können die Liposomen in ihrer Struktur so modifiziert werden, dass sie über unterschiedliche pharmakokinetische und bestimmte Depoteigenschaften verfügen, um eine effiziente Antigen-Präsentation zu gewährleisten.

Die meisten lizenzierten Adjuvantien assoziieren mit dem Antigen infolge der Adsorption nach dem einfachen Vermischen von Antigen und Adjuvans. Eine Ausnahme ist z.B. der Influenza-Impfstoff Inflexal® (Crucell), bei dem die viralen Antigene in ein Phospholipid-Bilayer integriert sind. Für die rekombinanten Antigene H1 (Ag85B-ESAT-6) und H56 (Ag85B-ESAT-6-Rv 2660c) wurde gezeigt, dass sie sich nach dem Vermischen mit CAF01 durch Adsorption mit ausreichender Effizienz ($\geq 95\%$) an die Oberfläche von Liposomen anlagerten und fast die komplette Oberfläche der Impfstoffträger bedeckten, ohne dass die physikalische Stabilität der Antigene beeinträchtigt wurde [276, 277]. Dabei stieg die Größe der Liposomen von 110-250 bis zu 335-400 nm an. Die Konzentration von H56 betrug dabei 0,1 mg/ml H56. Bei der Erhöhung der H56-Konzentration von 0,1 auf 0,2 mg/ml wurde die gesamte Struktur von CAF01 zerstört. Die Größe der Formulierungen erreichte dadurch mehr als 900 nm. Solche Veränderungen bezüglich der Größe der Antigen-Adjuvans-Formulierungen, bedingt durch unterschiedliche Antigen-Konzentration, müssen nicht nur bei der Herstellung sondern auch beim Applikationsweg der Impfstoffe berücksichtigt werden, da die Aufnahme und Prozessierung der Formulierungen durch die APZ davon beeinflusst werden können.

In Influenza-Studien im Frettschen-Modell wurde gezeigt, dass durch die orale Verabreichung kleinerer Vesikel (ca. 250 nm) eine T_H2 Immunantwort induziert werden konnte, wobei durch Applikation größerer Liposomen (ca. 980 nm) höhere $IFN-\gamma$ Konzentrationen und $IgG2$ Antikörpertiter, die typisch für eine T_H1 Immunantwort sind, eingeleitet wurden und damit ein besserer antiviraler Schutz [278].

In weiteren Studien wurde festgestellt, dass die Größe der Partikel signifikant die Antigenaufnahme, die Prozessierung der Antigene sowie deren Transport zu den drainierenden Lymphknoten beeinflusste. Manolova *et al.* beschrieben den Transport von Virosomen und Nanopartikeln verschiedener Größe nach deren Injektion in Mausfüße. Größere Partikel (0,5-2 μm) verblieben länger an der Injektionsstelle und nur diese großen Partikel wurden von DZ aufgenommen. Kleinere Partikel (< 200 nm) dagegen wurden durch die Lymphflüssigkeit in die Lymphknoten transportiert,

wo sie von den residenten Makrophagen und DZ aufgenommen wurden [279]. Diese Daten zeigen, dass der Ort der Aufnahme der Partikel durch APZ - Applikationsstelle oder Lymphknoten - ebenso von der Liposomengröße abhängig ist.

Bachmann *et al.* beobachteten, dass durch Antigen-TLR7/8-Agonisten-Komplexe, die klein genug waren, den Lymphknoten selbstständig zu erreichen, residente B-Zellen und CD8⁺ T-Zellen aktiviert wurden [280]. In *in vitro* Studien wurde gezeigt, dass positiv geladene Vesikel mit einem Durchmesser von 4,5 µm von den APZ effizienter als 1 µm große Partikel und negativ geladene Partikel aufgenommen wurden [281]. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Reifung von DZ, gemessen anhand der Expression des kostimulatorischen Moleküls CD83, durch kationische Liposomen besser als durch anionische Vesikel induziert werden konnte [282]. In einer weiteren Publikation wurde berichtet, dass nur positiv geladene Liposomen in der Lage waren, ein gutes Depot aufzubauen und T-Zell-vermittelte spezifische Immunantworten, charakterisiert durch IFN-γ und IL-17 Produktion und die Entstehung multifunktionaler T-Zellen, auszulösen [275].

Aus dem oben Gesagten resultiert, dass der gemeinsame Transport von Antigen und Adjuvans zu den Lymphknoten und der Milz für die Ausbildung einer effizienten und langanhaltenden Immunantwort wichtig ist [196, 276, 283-285]. Zur Visualisierung der Depotbildung und der Transportprozesse von Antigen-Adjuvans-Komplexen in der Maus habe ich fluoreszierende QDot-Ova-CAF01 Formulierungen generiert. Die Verteilung von diesen Formulierungen wurde vergleichend nach intranasaler bzw. subkutaner Verabreichung anhand IVIS Bildgebung und Fluoreszenz- bzw. lichtmikroskopischen Untersuchungen analysiert. Dabei war eine Reduktion der Fluoreszenz in den Lungenbereichen lebender Tiere bereits am Tag 4 nach intranasaler Verabreichung zu verzeichnen. Nach subkutaner Verabreichung war dieser Verlust an Fluoreszenz am Verabreichungsort in der Schwanzregion dagegen erst am Tag 15 zu beobachten. Die gemessene Fluoreszenz in den isolierten Lymphknoten deutete auf einen Transport von fluoreszierenden Impfstoffen zu sekundären lymphatischen Organen hin. Im Vergleich zu den trachealen LK (Fluoreszenzabnahme ab dem Tag 9) war eine deutlich länger anhaltende Fluoreszenz (bis zu 31 Tage nach subkutaner Applikation) in den inguinalen LK nachweisbar. Dabei wurde festgestellt, dass die Leuchtkraft der Formulierungen in Anwesenheit von Protein vermindert war. Die Verringerung der Fluoreszenzintensität durch Protein konnte auch durch einen weiteren Effekt, das sog. „Quenching“, bei dem die angeregten Photonen vom Protein eingefangen werden und die Fluoreszenz negativ beeinflussen, verursacht werden.

Um zu untersuchen, ob das Adjuvans CAF01 gemeinsam mit dem Modellantigen Ovalbumin zu den Lymphknoten transportiert wird, wurde das Adjuvans mit dem hydrophoben Fluoreszenzfarbstoff Lissamin Rhodamin (LissRhod) und dazu das Antigen mit fluoreszierenden QDots markiert (SSI). Die Verteilung der QDot-Ova-LissRhod-CAF01 Formulierungen wurde vergleichend nach intranasaler

bzw. subkutaner Verabreichung mit Hilfe von IVIS Bildgebung, Fluoreszenz- und lichtmikroskopischen Untersuchungen analysiert. Diese Untersuchungen zeigten zum einen, dass das Adjuvans gemeinsam mit dem Antigen am Verabreichungsort (Lunge und Haut) und im Depot (Haut) lokalisiert und zum anderen zu den trachealen bzw. inguinalen Lymphknoten transportiert wurde. Darüber hinaus konnte die Eignung von LissRhod neben QDots als fluoreszierende Reportersubstanz für *in* und *ex vivo* Bildgebung festgestellt werden.

Kamath *et al.* untersuchten den Transport des Tuberkuloseimpfstoffs H1 (Ag85B-ESAT6)-CAF01 bzw. seiner einzelnen Bestandteile, des Antigenhybrids H1 und des Adjuvans CAF01 [196]. Dabei wurde H1 mit dem fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 647 (AF647) und CAF01 mit einer fluoreszierenden Substanz 7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl (NBD) markiert. Das gleichzeitige separate Einspritzen von H1 und CAF01 an der gleichen Injektionsstelle im Vergleich zur Verabreichung von H1-CAF01-Komplexen resultierte zwar in einer vergleichbaren Antikörperproduktion, aber einer schwachen T_H2 Antwort. Die Ausbildung einer T_H1/T_H17 Antwort konnte dagegen nur durch das synchrone Verabreichen von H1 und CAF01 als Antigen-Adjuvans-Komplex erreicht werden.

Dabei wurde die gleiche Anzahl $Ag^+/Adjuvant^+$ DZ Populationen in den drainierenden Lymphknoten nach separater, genauso wie nach gemeinsamer Injektion von Antigen und Adjuvans gemessen. Allerdings wurde nach separater Injektion eine $Ag^+/Adjuvant^-$ nicht aktivierte DZ Population beobachtet. Die gleiche $Ag^+/Adjuvant^-$ DZ Population konnte im Lymphknoten nach Verabreichung von H1 (ohne Adjuvans) und 24 Stunden später erfolgter H1-CAF01 Injektion nachgewiesen werden. Diese Studie legt nahe, dass frühzeitige Generierung von $Ag^+/Adjuvant^-$ DZ durch das asynchrone Verabreichen, bevor die Aktivierung $Ag^+/Adjuvant^+$ DZ stattgefunden hat, sich nachteilig für die Erzeugung einer optimalen T_H1/T_H17 Immunantwort auswirkt. Das Ausbleiben einer T_H1/T_H17 Immunantwort kann durch die induzierte T-Zell-Toleranz aufgrund fehlender Aktivierung der APZ durch immunstimulierende Bestandteile des Adjuvans bzw. unzureichender Aktivierung durch das Antigen alleine erklärt werden. In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass die Antigenpräsentation, ohne aktivierende Signale zu T-Zell-Toleranzen führt. Dabei wurde die Differenzierung zu tolerogenen DZ durch die Bindung der freien Antigene an die CD205 DZ-Rezeptoren angeregt. Solche tolerogenen DZ Populationen, wie $CD103^+$ -gastro-intestinale und pneumonale DZ sowie $CD103^-CD24^-CD11b^+$ Haut-DZ und $CD8^+$ Milz-DZ wurden bereits in den früheren Publikationen beschrieben [286, 287]. Ein optimaler Impfstoff sollte die Auslösung tolerogener DZ Populationen vermeiden.

5.4 Antigenaufnahme durch myeloide Zellen nach Impfung

DZ bilden keine homologe Population. Ursprünglich wurden sie in myeloide und plasmazytoide DZ gegliedert. Mittlerweile werden die unterschiedlichen DZ-Subpopulationen nach Kriterien, wie Entwicklungsstufe (Prä-DZ, DZ), Wanderungsverhalten (migratorisch, resident, zirkulierend), Milieuvoraussetzungen (*steady-state*, inflammatorisch) bzw. Aktivierungsgrad klassifiziert [288]. DZ entstehen aus Lin⁻CD117⁺Sca-1⁺ Vorläuferzellen, die sich im Knochenmark befinden. Diese entwickeln sich über die Stufen der Lin⁻CD117⁺Sca-1⁻CD16/32⁻CD34⁺ *common myeloid progenitor* (CMP) und CD117^{int/lo}CX3CR1⁺CD135⁺ *common lymphoid progenitor* (CLP) zu CD34^{+/}-CD16/32^{+/}-CD117⁺CD11c⁻MHC-II⁻ pro-DZ und CD34⁺CD16/32⁺CD115⁺CD117⁺CD135⁺ *macrophage dendritic cell precursor* (MPD) [289]. MPD unterscheiden sich zudem von pro-DZ in ihrer Expression des Rezeptors *fms-like tyrosine kinase 3* (Flt3) (CD135) und ihrer Fähigkeit während der Differenzierung Kolonien zu bilden. MPD sind die Vorläufer inflammatorischer CD11c⁺CD11b⁺Ly6C^{lo}MHC-II⁺ DZ, die aus Monozyten differenzieren, jedoch nicht von *steady-state* konventionellen DZ (kDZ). Diese entstehen aus pro-DZ, die weiter zu CD11c⁺CD11b⁺MHC-II⁻CX3CR1⁺CD115⁺CD135⁺ prä-DZ differenzieren. Prä-DZ wandern aus dem Knochenmark über die Blutbahn in die Peripherie und bilden den Langzeitspeicher von DZ-Vorläufern. Im Entzündungszustand können diese Zellen schnell mobilisiert werden und die regionalen LK erreichen, dabei differenzieren sie überwiegend zu kDZ.

Migratorische DZ befinden sich in den peripheren Geweben, wie z.B. Lunge, Haut und Darm, wo sie Pathogene und fremde Antigene, wie Impfstoffe sowie Allergene aufnehmen können. Typische Vertreter dieser DZ-Subpopulation sind die Langerhanszellen der Epidermis [290]. Charakteristisch für diese Zellen ist die Expression der Marker CD11c, CD11b, MHC-II, Langerin und CD103 [291-294]. In der Lunge überwiegen drei DZ-Typen: plasmazytoide DZ und zwei migratorische Subpopulationen: CD103⁺ und CD11b^{hi} DZ [295-297]. CD103⁺ Zellen präsentieren die Antigene mit Hilfe von MHC-Klasse-I-Molekülen und aktivieren somit CD8⁺ T-Zell-Antworten, wobei die Antigenpräsentation der CD11b^{hi}-Zellen über MHC-Klasse-II-Moleküle erfolgt und anschließend in der Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen resultiert.

Abgesehen von einer Vielzahl der Studien zu DZ-Migration und Antigen-Transport von der Lunge zu den regionalen Lymphknoten, ist es noch wenig bekannt, wie DZ mit den in deutlicher Überzahl in der Lunge vorkommender Makrophagen um die inhalierten Partikel konkurrieren. Eine Reihe von Publikationen beschreiben, dass die DZ normalerweise unter der Epithelschicht vorkommen, aber in der Lage sind durch die epithelialen *Tight Junctions* in den Luftraum herauszuragen, um Antigene aufzunehmen [298].

Es wird angenommen, dass eine Mehrzahl partikulärer Antigene mit Hilfe von DZ in die Lymphknoten transportiert wird [299]. Vermaelen *et al.* berichteten, dass Diphtheria Toxin-vermittelte Depletion

von Lungen-DZ in einer deutlich reduzierten Antigen-Transportrate zu den Lymphknoten resultierte [300]. Derzeit werden unterschiedliche Anstrengungen unternommen, die Aufnahme und den Transport von diversen partikulären Antigenen von den DZ, Makrophagen sowie Epithelzellen zu erforschen.

Zur Identifizierung der am CAF01-Transport beteiligten Zellen wurde in dieser Arbeit das Gewebe der inguinalen Lymphknoten mit anti-CD11b⁺ spezifischen Antikörpern gefärbt. Anhand dieser immunhistologischen Färbung konnte eine mit der Zeit zunehmende Infiltration von CD11b⁺-Zellen in den inguinalen Lymphknoten nach der subkutanen Verabreichung von QDot-Ova-CAF01 Formulierungen beobachtet werden. Vorwiegend war diese vermehrte Anzahl von CD11b⁺-Zellen in den Sinus- und Mark-Regionen des Lymphknotens zu finden. Diese Beobachtungen deuten auf eine entzündliche Reaktion im Lymphknoten hin.

Die durchflusszytometrische Analyse der Lymphknotenzellen und Splenozyten nach intranasaler bzw. subkutaner Impfstoffverabreichung ergab, dass vor allem CD11c⁺CD11b⁺ Subpopulationen den Impfstoff (QDot-Ova-CAF01) tragen. Dabei haben sich in den LK eine CD11c^{int}CD11b^{hi/hi} Subpopulation und in der Milz zwei CD11c^{hi}CD11b^{int} und CD11c^{int}CD11b^{low/int} als dominante Impfstoffträger erwiesen.

In meiner Untersuchung der Impfstoffeffizienz von H56-CAF01 konnte nur nach subkutaner Impfstoffverabreichung ein signifikanter Schutz erzeugt werden (Abb. 4.8). Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass nach intranasaler Verabreichung die Zahl der CD11c⁺CD11b⁺ impfstofftragenden Zellen in den trachealen Lymphknoten im Vergleich zu den inguinalen Lymphknoten nach subkutaner Applikation signifikant erhöht war (Abb. 4.38). Die Aufnahme von Impfstoffen durch APZ könnte durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Impfstoffe bestimmt und so die Immunantwort beeinflusst werden. Nicht nur die Anzahl, sondern auch die Zusammensetzung und die Effizienz der myeloiden Zellen spielt bei der Ausbildung der Immunabwehr eine Rolle. So ist eine effektivere Schutzwirkung durch eine geringere Anzahl myeloider CD11c⁺CD11b⁺ Zellen denkbar. Die gleichzeitige Rekrutierung myeloider Suppressorzellen (MDSC, *myeloid derived suppressor cells*) durch Impfstoffkomponenten kann auch die Ausbildung einer protektiven Immunantwort hemmen [301]. Die Studie von Behnett *et al.* zeigt, dass BCG die Ausbildung von MDSC auslösen kann [302]. Zum besseren Verstehen dieser Immunprozesse sind weitere detaillierte funktionelle Analysen der beteiligten myeloiden APZ Populationen in Abhängigkeit von Antigen, Impfstoffträger und Applikationsweg erforderlich.

5.5 Ausblick

Weitere Optimierung rekombinanter fluoreszierender bzw. lumineszierender Reporterstämme könnte zur besseren Visualisierung der Infektionsprozesse mithilfe der in dieser Arbeit etablierten Bildgebungsmethode beitragen. Alternativ dazu ist die Anwendung eines sensitiveren lumineszierenden *M. tuberculosis* FFluc Stammes denkbar. Darüber hinaus könnten alternative Reportersysteme, z.B. basierend auf der Expression des endogenen β -Lactamase eingesetzt werden. Eine weitere Verbesserung der Sensitivität optischer Bildgebung zum Nachweis von weniger als 10^6 Mykobakterien könnte durch die Entwicklung besserer sensitiverer Detektionssysteme, wie z.B. empfindlicherer CCD-Kameras möglich.

Um die Verteilung der Impfstoffe im Körper besser zu verfolgen, ist der Einsatz weiterer fluoreszierender Substanzen neben QDots und LissRhodamin, wie z.B. Alexa Fluor 647 zur Markierung mykobakterieller Antigene oder anderer fluoreszierender Lipide zur Markierung der Liposome von Bedeutung. Seit kurzer Zeit existieren sog. biolumineszente „self illuminating“ QDots für die *in vivo* Bildgebung. Hierfür werden QDots an Renilla-Luciferase gekoppelt und das Phänomen des Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfers (BRET) ausgenutzt. Beim Umsatz des Substrats Coelenteracin durch die Luciferase regt die freigesetzte Energie die benachbarten Fluorophore zur Lichtemission an. Der Vorteil dieses Systems ist, dass eine externe Lichtquelle zur Anregung überflüssig ist. Dadurch könnte die Intensität der Reportersignale gesteigert werden.

Ferner ist zum besseren Verständnis der Immunantworten eine weitere detaillierte Analyse der Subpopulationen der APZ, die die Impfstoffe aufnehmen und die Antigene zu drainierenden Lymphknoten tragen und präsentieren, notwendig. Dazu sollte vor allem die Funktion einzelner Subpopulationen untersucht werden, d.h. inwieweit sie effiziente APZ sind oder eher suppressiv oder Antigen-degradierend sind. Um die APZ Effizienz zu steigern, könnten alternative Adjuvantien, die über verschiedene strukturelle Modifikationen verfügen, welche zur besseren Erkennung und Aufnahme von Antigenen durch diverse Mustererkennungsrezeptoren der Zellen der angeborenen Immunität und somit zur Steigerung der Immunabwehr beitragen könnten, eingesetzt werden bzw. effiziente APZ rekrutieren.

5.6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Nutzbarkeit eines speziellen nicht invasiven bildgebenden Verfahrens (IVIS Bildgebung) in Verbindung mit fluoreszierenden und lumineszierenden *M. tuberculosis* Reporterstämmen zur Visualisierung der Schutzwirkung neuer Impfstoffe untersucht. Dabei hat sich herausgestellt, dass Fluoreszenz und Lumineszenz der Reporterstämmen in immunkompetenten Tieren nur in den isolierten Organen (Lunge, tracheale und inguinale Lymphknoten), jedoch nicht im lebenden Tier detektiert werden konnte. Somit war eine lückenlose Darstellung des Infektionsverlaufs und der Keimzahlentwicklung nach einer Impfung in einem individuellen Organismus über eine längere Zeit nicht möglich. Damit trägt dieses Verfahren nicht zur Verringerung der Tierzahl in Impfversuchen bei, beschleunigt aber die Analysen als Alternative zur Keimzahlbestimmung, da KBE und Fluoreszenzsignalstärke gut korrelieren. Die bildgebenden Analysen ergaben ein Detektionslimit von ca. 1×10^6 KBE in der Lunge. Die Analysen zur Schutzwirkung des Tuberkuloseimpfstoffs H56-CAF01 ergaben, dass nur im Fall der subkutanen Impfstoffverabreichung im Gegensatz zur intranasalen Applikation ein signifikanter Schutz gegen die mykobakterielle Infektion erreicht wurde. Die Anwendung einer heterologen Prime-Boost-Impfstrategie ergab, dass bereits durch die Vorimmunisierung mit BCG eine signifikante Reduktion der Bakterienzahl erreicht wurde. Die infolge der schützenden Wirkung der BCG-Vorimmunisierung schon geringere Keimzahl war an bzw. unter der Detektionsgrenze der Bildgebung.

Die Untersuchungen zum Impfstofftransport in der Maus zeigten zum einen ein länger bestehendes Depot am Verabreichungsort „Haut“ im Vergleich zur Lunge. Zum anderen wurden Antigen H56 und Adjuvans CAF01 zusammen lokalisiert. Außerdem wurde ein gemeinsamer Transport beider Impfstoffbestandteile in die drainierenden trachealen bzw. inguinalen Lymphknoten beobachtet, was für eine Immunaktivierung nötig ist. Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass CD11c/CD11b doppel-positive myeloide Zellen, die den Impfstoff aufgenommen haben, die Hauptpopulation im Lymphknoten darstellten. Inwieweit diese Zellen eine effiziente T-Zellaktivierung ermöglichen, müssen zukünftige Studien zeigen. Nach der subkutanen Applikation von QDot-Ova-CAF01 war ein Influx entzündlicher CD11b⁺ Zellen in den Lymphknoten zu beobachten, das auf eine stattfindende entzündliche Reaktion schließen lässt.

Bei der histologischen Untersuchung der Verabreichungsorte nach der subkutanen bzw. intranasalen Immunisierung anhand der HE-Färbung war eine stärkere Einwanderung entzündlicher Zellen in die Haut im Vergleich zur Lunge zu beobachten. Die infolge der subkutanen Immunisierung stärkere

Entzündung könnte zur Ausbildung des beobachteten besseren Immunschutzes gegen die Tuberkulose geführt haben.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass nach subkutaner Applikation die Impfstoffe für eine längere Zeit am Verabreichungsort erhalten bleiben und somit dauerhafter für antigenpräsentierende Zellen, die für eine effektive Auslösung einer schützenden Immunabwehr wichtig sind, zur Verfügung stehen. Diese Beobachtung könnte den besseren Schutz durch H56-CAF01 nach subkutaner Immunisierung erklären.

Generell konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das IVIS Bildgebungsverfahren dazu beitragen kann, Impfstoffe und ihre Verabreichungsformen zu testen.

6 Abstract

Tuberculosis (TB) is a major global health problem, with an estimated 8.7 million cases and 1.4 million death in 2011 (WHO, 2012). *Mycobacterium (M.) bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG), which was developed at the beginning of the 20th century, remains the only available vaccine against TB. BCG protects children against severe forms of the disease but fails to protect against the most prevalent form of TB, namely pulmonary TB in adults (Colditz et al., 1994). In order to control TB, vaccines that prevent productive *M. tuberculosis* infection are needed. The main focus of this work was to combine novel imaging approaches (IVIS Kinetic analysis) with recombinant *M. tuberculosis* reporter strains and fluorescent labeled vaccine carrier nanoparticles to assess and monitor the efficacy and biodistribution of novel vaccine formulations against TB.

The nanoparticle-based vaccine formulations analysed were based on the recombinant fusion protein H56 comprising Ag85B and ESAT-6, which are two of the *M. tuberculosis* antigens secreted in the acute phase of infection, and the nutrient stress-induced antigen Rv2660c linked to cationic liposomes (CAF01) containing cationic surfactant the dimethyldioctadecylammonium (DDA) bromide and the immunomodulator trehalose 6'-dibehenate (TDB) as adjuvant. Apart from the accelerated assessment of the protective vaccine efficacy this approach should promote optimization of vaccine formulations and candidates. Fluorescent and luminescent strains of *M. tuberculosis* were employed to observe the prophylactic vaccine efficacy in the murine tuberculosis model by imaging individual animals and excised lungs thereof using IVIS Kinetic analysis.

The detection limit of fluorescent *M. tuberculosis* in living mice was below IVIS Kinetic detection limit, however, it was possible to monitor the infection in excised lungs and to assess mycobacterial load. Fluorescent signals and CFU counts correlated well indicating the usability of the reporter system for vaccine testing. The detection limit was around 10^6 *M. tuberculosis* in an excised lung. The subunit vaccine H56-CAF01 used as priming and boosting vaccine, induced protection against *M. tuberculosis* but only when given subcutaneously (s.c) but not via the intranasal (i.n.) administration route. Using H56-CAF01 as a boost for BCG primed immunity, revealed that BCG alone already induced a protection leading to reduced mycobacterial loads, which were at or below the detection limit of IVIS imaging, which is less sensitive than the classical CFU assay.

In order to assess the differential efficacy of the s.c. versus the i.n. vaccination route, the biodistribution of the vaccine carriers and the delivery to draining lymphoid organs, which is a prerequisite for T cell priming, were analysed. Fluorescent far-red-emitting Quantum Dots and fluorescent lipid lissamine rhodamine were used as tags to monitor the vaccine carrier fate upon i.n.

compared to s.c. vaccination. Upon i.n. vaccination, IVIS imaging revealed that fluorescent signals quickly (<4 days) faded from the lungs whereas some fluorescent signals were retained in the tracheal lymph nodes (LN) up to day 10. Upon s.c. application, the dermal signal faded at around 15 days after administration but draining inguinal LN retained strong vaccine carrier signals at least till day 30 after vaccination. Immunohistology and FACS analysis of draining LN showed a strong influx of CD11b⁺ macrophages and identified CD11b/CD11c double positive myeloid cells as the predominant vaccine-carrying population. These data suggest that the superiority of the s.c. over the i.n. vaccination route was determined by extended vaccine retention in draining LN upon s.c. application.

In conclusion IVIS imaging can be used to monitor and evaluate the efficacy of new vaccine candidates as well as the course of *M. tuberculosis* infection in excised lungs and to characterize vaccine delivery and biodistribution in the mouse in order to assess immune defense against TB.

7 Literaturverzeichnis

1. WHO 2012. World Health Organization report 2012. Global tuberculosis control. www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr12, (2012).
2. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Archives of internal medicine*, 163(9), 1009-1021 (2003).
3. Loddenkemper R, Hauer B. Drug-resistant tuberculosis: a worldwide epidemic poses a new challenge. *Deutsches Arzteblatt international*, 107(1-2), 10-19 (2010).
4. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 20(1), 21-54 (2001).
5. Korb DS, Schneider BE, Schaible UE. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 10(9), 995-1004 (2008).
6. Krutzik SR, Modlin RL. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Seminars in immunology*, 16(1), 35-41 (2004).
7. Quesniaux V, Fremont C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yeremeev V, Bihl F, Erard F, Botha T, Drennan M, Soler MN, Le Bert M, Schnyder B, Ryffel B. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 6(10), 946-959 (2004).
8. Ben-Ali M, Barbouche MR, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K. Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 11(3), 625-626 (2004).
9. Salgame P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. *Current opinion in immunology*, 17(4), 374-380 (2005).
10. Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of experimental medicine*, 202(12), 1715-1724 (2005).
11. Pecora ND, Gehring AJ, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. Mycobacterium tuberculosis LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(1), 422-429 (2006).
12. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(25), 14459-14463 (1999).
13. Tsolaki AG. Innate immune recognition in tuberculosis infection. *Advances in experimental medicine and biology*, 653, 185-197 (2009).
14. Ernst JD. Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infection and immunity*, 66(4), 1277-1281 (1998).
15. Gaynor CD, McCormack FX, Voelker DR, McGowan SE, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by a direct interaction with human macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(11), 5343-5351 (1995).

16. Hossain MM, Norazmi MN. Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection--the double-edged sword? *BioMed research international*, 2013, 179174 (2013).
17. Armstrong JA, Hart PD. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *The Journal of experimental medicine*, 142(1), 1-16 (1975).
18. Le Cabec V, Cols C, Maridonneau-Parini I. Nonopsonic phagocytosis of zymosan and Mycobacterium kansasii by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infection and immunity*, 68(8), 4736-4745 (2000).
19. Gatfield J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5471), 1647-1650 (2000).
20. Ehlers S. DC-SIGN and mannosylated surface structures of Mycobacterium tuberculosis: a deceptive liaison. *European journal of cell biology*, 89(1), 95-101 (2010).
21. Sasindran SJ, Torrelles JB. Mycobacterium Tuberculosis Infection and Inflammation: what is Beneficial for the Host and for the Bacterium? *Frontiers in microbiology*, 2, 2 (2011).
22. Pieters J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 3(3), 249-255 (2001).
23. van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Advances in experimental medicine and biology*, 531, 241-247 (2003).
24. Desel C, Werninghaus K, Ritter M, Jozefowski K, Wenzel J, Russkamp N, Schleicher U, Christensen D, Wirtz S, Kirschning C, Agger EM, Prazeres da Costa C, Lang R. The Mincle-activating adjuvant TDB induces MyD88-dependent Th1 and Th17 responses through IL-1R signaling. *PloS one*, 8(1), e53531 (2013).
25. Schoenen H, Bodendorfer B, Hitchens K, Manzanero S, Werninghaus K, Nimmerjahn F, Agger EM, Stenger S, Andersen P, Ruland J, Brown GD, Wells C, Lang R. Cutting edge: Mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(6), 2756-2760 (2010).
26. Ferwerda G, Girardin SE, Kullberg BJ, Le Bourhis L, de Jong DJ, Langenberg DM, van Crevel R, Adema GJ, Ottenhoff TH, Van der Meer JW, Netea MG. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS pathogens*, 1(3), 279-285 (2005).
27. Kersse K, Bertrand MJ, Lamkanfi M, Vandenabeele P. NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(5-6), 257-276 (2011).
28. Cohn ZA. The fate of bacteria within phagocytic cells. II. The modification of intracellular degradation. *The Journal of experimental medicine*, 117, 43-53 (1963).
29. Desjardins M. Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends in cell biology*, 5(5), 183-186 (1995).
30. Vergne I, Chua J, Singh SB, Deretic V. Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome. *Annual review of cell and developmental biology*, 20, 367-394 (2004).
31. Rohde K, Yates RM, Purdy GE, Russell DG. Mycobacterium tuberculosis and the environment within the phagosome. *Immunological reviews*, 219, 37-54 (2007).
32. Ehlers S. Pathomorphogenesis of tubercular histologic changes: mechanisms of granuloma formation, maintenance and necrosis. *Der Internist*, 44(11), 1363-1373 (2003).
33. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annual review of immunology*, 19, 93-129 (2001).

34. Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, Modlin RL, Brinkmann V, Kaufmann SH. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nature medicine*, 9(8), 1039-1046 (2003).
35. Cooper AM, Khader SA. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunological reviews*, 226, 191-204 (2008).
36. Kaufmann SH, Schaible UE. Antigen presentation and recognition in bacterial infections. *Current opinion in immunology*, 17(1), 79-87 (2005).
37. Heath VL, Kurata H, Lee HJ, Arai N, O'Garra A. Checkpoints in the regulation of T helper 1 responses. *Current topics in microbiology and immunology*, 266, 23-39 (2002).
38. Roach DR, Briscoe H, Saunders B, France MP, Riminton S, Britton WJ. Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *The Journal of experimental medicine*, 193(2), 239-246 (2001).
39. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature reviews. Immunology*, 1(1), 20-30 (2001).
40. Flesch I, Kaufmann SH. Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 138(12), 4408-4413 (1987).
41. Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, Hara H, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(8), 4414-4422 (2010).
42. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of experimental medicine*, 203(10), 2271-2279 (2006).
43. Scriba TJ, Kalsdorf B, Abrahams DA, Isaacs F, Hofmeister J, Black G, Hassan HY, Wilkinson RJ, Walzl G, Gelderbloem SJ, Mahomed H, Hussey GD, Hanekom WA. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(3), 1962-1970 (2008).
44. Cooper AM. T cells in mycobacterial infection and disease. *Current opinion in immunology*, 21(4), 378-384 (2009).
45. Torrado E, Cooper AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine & growth factor reviews*, 21(6), 455-462 (2010).
46. Ten Berge B, Paats MS, Bergen IM, van den Blink B, Hoogsteden HC, Lambrecht BN, Hendriks RW, Kleinjan A. Increased IL-17A expression in granulomas and in circulating memory T cells in sarcoidosis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 51(1), 37-46 (2012).
47. Cruz A, Fraga AG, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Torrado E, Saraiva M, Pereira DR, Randall TD, Pedrosa J, Cooper AM, Castro AG. Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of experimental medicine*, 207(8), 1609-1616 (2010).
48. Teitelbaum R, Cammer M, Maitland ML, Freitag NE, Condeelis J, Bloom BR. Mycobacterial infection of macrophages results in membrane-permeable phagosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 15190-15195 (1999).
49. Ulrichs T, Kaufmann SH. Immunology of tuberculosis: impact on the development of novel vaccines. *Der Internist*, 44(11), 1374-1384 (2003).

50. Serbina NV, Liu CC, Scanga CA, Flynn JL. CD8+ CTL from lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(1), 353-363 (2000).
51. Stenger S, Modlin RL. T cell mediated immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Current opinion in microbiology*, 2(1), 89-93 (1999).
52. Tascon RE, Stavropoulos E, Lukacs KV, Colston MJ. Protection against Mycobacterium tuberculosis infection by CD8+ T cells requires the production of gamma interferon. *Infection and immunity*, 66(2), 830-834 (1998).
53. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*, 8(3), 223-246 (2003).
54. Kaufmann SH. gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6), 2272-2279 (1996).
55. Morita CT, Mariuzza RA, Brenner MB. Antigen recognition by human gamma delta T cells: pattern recognition by the adaptive immune system. *Springer seminars in immunopathology*, 22(3), 191-217 (2000).
56. Shen Y, Zhou D, Qiu L, Lai X, Simon M, Shen L, Kou Z, Wang Q, Jiang L, Estep J, Hunt R, Clagett M, Sehgal PK, Li Y, Zeng X, Morita CT, Brenner MB, Letvin NL, Chen ZW. Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5563), 2255-2258 (2002).
57. Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annual review of immunology*, 17, 297-329 (1999).
58. Ulrichs T, Porcelli SA. CD1 proteins: targets of T cell recognition in innate and adaptive immunity. *Reviews in immunogenetics*, 2(3), 416-432 (2000).
59. Behar SM, Porcelli SA. CD1-restricted T cells in host defense to infectious diseases. *Current topics in microbiology and immunology*, 314, 215-250 (2007).
60. Larson RP, Shafiani S, Urdahl KB. Foxp3(+) regulatory T cells in tuberculosis. *Advances in experimental medicine and biology*, 783, 165-180 (2013).
61. Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G, Ishida-Tsubota K, Fontenot JD, Rudensky AY, Bevan MJ, Urdahl KB. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *The Journal of experimental medicine*, 204(9), 2159-2169 (2007).
62. Burl S, Hill PC, Jeffries DJ, Holland MJ, Fox A, Lugos MD, Adegbola RA, Rook GA, Zumla A, McAdam KP, Brookes RH. FOXP3 gene expression in a tuberculosis case contact study. *Clinical and experimental immunology*, 149(1), 117-122 (2007).
63. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nature reviews. Immunology*, 11(2), 119-130 (2011).
64. Chen X, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, Wu C, Larmonier N, Zhang W, Zhang H, Wang H, Katsanis E. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 123(1), 50-59 (2007).
65. Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (*). *Annual review of immunology*, 27, 551-589 (2009).
66. Hougardy JM, Place S, Hildebrand M, Drowart A, Debie AS, Loch C, Mascart F. Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 176(4), 409-416 (2007).
67. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 30(5), 636-645 (2009).

68. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual review of immunology*, 30, 531-564 (2012).
69. Welsh KJ, Risin SA, Actor JK, Hunter RL. Immunopathology of postprimary tuberculosis: increased T-regulatory cells and DEC-205-positive foamy macrophages in cavitory lesions. *Clinical & developmental immunology*, 2011, 307631 (2011).
70. Glatman-Freedman A. The role of antibody-mediated immunity in defense against *Mycobacterium tuberculosis*: advances toward a novel vaccine strategy. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 86(3-4), 191-197 (2006).
71. Glatman-Freedman A, Casadevall A. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews*, 11(3), 514-532 (1998).
72. Tsai MC, Chakravarty S, Zhu G, Xu J, Tanaka K, Koch C, Tufariello J, Flynn J, Chan J. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cellular microbiology*, 8(2), 218-232 (2006).
73. Gonzalez-Juarrero M, Turner OC, Turner J, Marietta P, Brooks JV, Orme IM. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity*, 69(3), 1722-1728 (2001).
74. Maglione PJ, Xu J, Chan J. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(11), 7222-7234 (2007).
75. Bosio CM, Gardner D, Elkins KL. Infection of B cell-deficient mice with CDC 1551, a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: delay in dissemination and development of lung pathology. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(12), 6417-6425 (2000).
76. Dheda K, Booth H, Huggett JF, Johnson MA, Zumla A, Rook GA. Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*, 192(7), 1201-1209 (2005).
77. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews. Immunology*, 3(1), 23-35 (2003).
78. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology*, 15, 323-350 (1997).
79. Shiloh MU, Nathan CF. Reactive nitrogen intermediates and the pathogenesis of *Salmonella* and mycobacteria. *Current opinion in microbiology*, 3(1), 35-42 (2000).
80. Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Current opinion in immunology*, 14(1), 129-135 (2002).
81. Chan J, Tanaka K, Carroll D, Flynn J, Bloom BR. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity*, 63(2), 736-740 (1995).
82. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *The Journal of experimental medicine*, 174(6), 1549-1555 (1991).
83. Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 151(3), 1224-1234 (1993).
84. Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infection and immunity*, 69(7), 4195-4201 (2001).
85. Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM, Warmington K, Kunkel SL. Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF-alpha-inducible intercellular adhesion molecule-1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 152(12), 5883-5889 (1994).

86. Appelberg R. Protective role of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in Mycobacterium tuberculosis and M. avium infections. *Immunobiology*, 191(4-5), 520-525 (1994).
87. Ogawa T, Uchida H, Kusumoto Y, Mori Y, Yamamura Y, Hamada S. Increase in tumor necrosis factor alpha- and interleukin-6-secreting cells in peripheral blood mononuclear cells from subjects infected with Mycobacterium tuberculosis. *Infection and immunity*, 59(9), 3021-3025 (1991).
88. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, Siegel JN, Braun MM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *The New England journal of medicine*, 345(15), 1098-1104 (2001).
89. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, Smolen J, Emery P, Harriman G, Feldmann M, Lipsky P. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet*, 354(9194), 1932-1939 (1999).
90. Ulrichs T, Kaufmann SH. Immunology of tuberculosis: impact on the development of novel vaccines. *Der Internist*, 44(11), 1374-1384 (2003).
91. Russell DG, Barry CE, Flynn JL. Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5980), 852-856 (2010).
92. Kaufmann SH. Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later. *The Lancet infectious diseases*, 11(8), 633-640 (2011).
93. Cowley SC, Elkins KL. CD4+ T cells mediate IFN-gamma-independent control of Mycobacterium tuberculosis infection both in vitro and in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(9), 4689-4699 (2003).
94. Gallegos AM, van Heijst JW, Samstein M, Su X, Pamer EG, Glickman MS. A gamma interferon independent mechanism of CD4 T cell mediated control of M. tuberculosis infection in vivo. *PLoS pathogens*, 7(5), e1002052 (2011).
95. Soares AP, Scriba TJ, Joseph S, Harbacheuski R, Murray RA, Gelderbloem SJ, Hawkrigde A, Hussey GD, Maecker H, Kaplan G, Hanekom WA. Bacillus Calmette-Guerin vaccination of human newborns induces T cells with complex cytokine and phenotypic profiles. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(5), 3569-3577 (2008).
96. Pitt JM, Stavropoulos E, Redford PS, Beebe AM, Bancroft GJ, Young DB, O'Garra A. Blockade of IL-10 signaling during bacillus Calmette-Guerin vaccination enhances and sustains Th1, Th17, and innate lymphoid IFN-gamma and IL-17 responses and increases protection to Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(8), 4079-4087 (2012).
97. Trapnell BC, Whitsett JA. Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annual review of physiology*, 64, 775-802 (2002).
98. Sonnenberg P, Glynn JR, Fielding K, Murray J, Godfrey-Faussett P, Shearer S. How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners. *The Journal of infectious diseases*, 191(2), 150-158 (2005).
99. Murray J, Sonnenberg P, Nelson G, Bester A, Shearer S, Glynn JR. Cause of death and presence of respiratory disease at autopsy in an HIV-1 seroconversion cohort of southern African gold miners. *AIDS (London, England)*, 21 Suppl 6, S97-s104 (2007).
100. Jung JY, Madan-Lala R, Georgieva M, Rengarajan J, Sohaskey CD, Bange FC, Robinson CM. The intracellular environment of human macrophages that produce nitric oxide promotes growth of mycobacteria. *Infection and immunity*, 81(9), 3198-3209 (2013).

101. Weinberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA, Wood ER, Smith GK, McDonald B, Bachus KE, Haney AF, Granger DL. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood*, 86(3), 1184-1195 (1995).
102. Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 8841-8848 (2000).
103. Aston C, Rom WN, Talbot AT, Reibman J. Early inhibition of mycobacterial growth by human alveolar macrophages is not due to nitric oxide. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 157(6 Pt 1), 1943-1950 (1998).
104. Calmette A. Protective inoculation against tuberculosis with BCG. *Am Rev Tuberc*, 19, 567-572 (1929).
105. Calmette A, Guérin C, Boquet A, Nègre L. La vaccination préventive contre la tuberculose par le "BCG". *Masson, Paris.*, (1927).
106. Huebner RE. BCG vaccination in the control of tuberculosis. *Current topics in microbiology and immunology*, 215, 263-282 (1996).
107. Doherty TM, Andersen P. Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 687-702 (2005).
108. Andersen P, Doherty TM. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature reviews. Microbiology*, 3(8), 656-662 (2005).
109. Andersen P, Doherty TM. Learning from BCG: Designing a better tuberculosis vaccine. *Discovery medicine*, 5(28), 383-387 (2005).
110. Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*, 346(8986), 1339-1345 (1995).
111. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *Journal of bacteriology*, 178(5), 1274-1282 (1996).
112. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5419), 1520-1523 (1999).
113. Hess J, Kaufmann SH. Vaccination strategies against intracellular microbes. *FEMS immunology and medical microbiology*, 7(2), 95-103 (1993).
114. Kaufmann SH, Andersen P. Immunity to mycobacteria with emphasis on tuberculosis: implications for rational design of an effective tuberculosis vaccine. *Chemical immunology*, 70, 21-59 (1998).
115. Andersen P, Kaufmann SH. Novel Vaccination Strategies against Tuberculosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(6) (2014).
116. Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Zimny-Arndt U, Raupach B, Mattow J, Halada P, Lamer S, Hagens K, Kaufmann SH. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Molecular microbiology*, 33(6), 1103-1117 (1999).
117. Handfield M, Levesque RC. Strategies for isolation of in vivo expressed genes from bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 23(1), 69-91 (1999).
118. Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nature medicine*, 2(8), 888-892 (1996).

119. Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery DL, Yawman AM, Deck RR, DeWitt CM, Orme IM, Baldwin S, D'Souza C, Drowart A, Lozes E, Vandebussche P, Van Vooren JP, Liu MA, Ulmer JB. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nature medicine*, 2(8), 893-898 (1996).
120. Tanghe A, Lefevre P, Denis O, D'Souza S, Braibant M, Lozes E, Singh M, Montgomery D, Content J, Huygen K. Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccines encoding putative phosphate transport receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(2), 1113-1119 (1999).
121. Walsh GP, Tan EV, dela Cruz EC, Abalos RM, Villahermosa LG, Young LJ, Cellona RV, Nazareno JB, Horwitz MA. The Philippine cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nature medicine*, 2(4), 430-436 (1996).
122. Pelicic V, Jackson M, Reyrat JM, Jacobs WR, Jr., Gicquel B, Guilhot C. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), 10955-10960 (1997).
123. Berthet FX, Lagranderie M, Gounon P, Laurent-Winter C, Ensergueix D, Chavarot P, Thouron F, Maranghi E, Pelicic V, Portnoi D, Marchal G, Gicquel B. Attenuation of virulence by disruption of the *Mycobacterium tuberculosis* *erp* gene. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5389), 759-762 (1998).
124. Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu YQ, Hickey MJ, Sherman DR, Barry CE. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), 9578-9583 (1998).
125. Guleria I, Teitelbaum R, McAdam RA, Kalpana G, Jacobs WR, Jr., Bloom BR. Auxotrophic vaccines for tuberculosis. *Nature medicine*, 2(3), 334-337 (1996).
126. Murray PJ, Aldovini A, Young RA. Manipulation and potentiation of antimycobacterial immunity using recombinant bacille Calmette-Guerin strains that secrete cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(2), 934-939 (1996).
127. Hess J, Miko D, Catic A, Lehmsiek V, Russell DG, Kaufmann SH. *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin strains secreting listeriolysin of *Listeria monocytogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), 5299-5304 (1998).
128. Zhu X, Venkataprasad N, Ivanyi J, Vordermeier HM. Vaccination with recombinant vaccinia viruses protects mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology*, 92(1), 6-9 (1997).
129. Hess J, Kaufmann SH. Live antigen carriers as tools for improved anti-tuberculosis vaccines. *FEMS immunology and medical microbiology*, 23(2), 165-173 (1999).
130. Hess J, Kaufmann SH. Development of novel tuberculosis vaccines. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 322(11), 953-958 (1999).
131. Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, Tameris MD1, Hatherill M, Landry BS, Scriba TJ, Snowden MA, Lockhart S, Shea JE, McClain JB, Hussey GD, Hanekom WA, Mahomed H, McShane H. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet*, 381(9871), 1021-1028 (2013).
132. Hoang T, Aagaard C, Dietrich J, Cassidy JP, Dolganov G, Schoolnik GK, Lundberg CV, Agger EM, Andersen P. ESAT-6 (EsxA) and TB10.4 (EsxH) based vaccines for pre- and post-exposure tuberculosis vaccination. *PloS one*, 8(12), e80579 (2013).

133. Aagaard C, Hoang T, Dietrich J, Cardona PJ, Izzo A, Dolganov G, Schoolnik GK, Cassidy JP, Billeskov R, Andersen P. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nature medicine*, 17(2), 189-194 (2011).
134. Gram GJ, Karlsson I, Agger EM, Andersen P, Fomsgaard A. A novel liposome-based adjuvant CAF01 for induction of CD8(+) cytotoxic T-lymphocytes (CTL) to HIV-1 minimal CTL peptides in HLA-A*0201 transgenic mice. *PloS one*, 4(9), e6950 (2009).
135. Lin PL, Dietrich J, Tan E, Abalos RM, Burgos J, Bigbee C, Bigbee M, Milk L, Gideon HP, Rodgers M, Cochran C, Guinn KM, Sherman DR, Klein E, Janssen C, Flynn JL, Andersen P. The multistage vaccine H56 boosts the effects of BCG to protect cynomolgus macaques against active tuberculosis and reactivation of latent Mycobacterium tuberculosis infection. *The Journal of clinical investigation*, 122(1), 303-314 (2012).
136. Lindenstrom T, Agger EM, Korsholm KS, Darrah PA, Aagaard C, Seder RA, Rosenkrands I, Andersen P. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(12), 8047-8055 (2009).
137. Kaufmann SH. Tuberculosis vaccines-a new kid on the block. *Nature medicine*, 17(2), 159-160 (2011).
138. Agger EM, Rosenkrands I, Hansen J, Brahimi K, Vandahl BS, Aagaard C, Werninghaus K, Kirschning C, Lang R, Christensen D, Theisen M, Follmann F, Andersen P. Cationic liposomes formulated with synthetic mycobacterial cordfactor (CAF01): a versatile adjuvant for vaccines with different immunological requirements. *PloS one*, 3(9), e3116 (2008).
139. Werninghaus K, Babiak A, Gross O, Hölscher C, Dietrich H, Agger EM, Mages J, Mocsai A, Schoenen H, Finger K, Nimmerjahn F, Brown GD, Kirschning C, Heit A, Andersen P, Wagner H, Ruland J, Lang R. Adjuvanticity of a synthetic cord factor analogue for subunit Mycobacterium tuberculosis vaccination requires FcRgamma-Syk-Card9-dependent innate immune activation. *The Journal of experimental medicine*, 206(1), 89-97 (2009).
140. Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, Toyonaga K, Yamada H, Takeuchi O, Kinoshita T, Akira S, Yoshikai Y, Yamasaki S. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *The Journal of experimental medicine*, 206(13), 2879-2888 (2009).
141. Huwyler J, Drewe J, Krahenbuhl S. Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs. *International journal of nanomedicine*, 3(1), 21-29 (2008).
142. Dass CR, Choong PF. Targeting of small molecule anticancer drugs to the tumour and its vasculature using cationic liposomes: lessons from gene therapy. *Cancer cell international*, 6, 17 (2006).
143. Dabbas S, Kaushik RR, Dandamudi S, Kuesters GM, Campbell RB. Importance of the liposomal cationic lipid content and type in tumor vascular targeting: physicochemical characterization and in vitro studies using human primary and transformed endothelial cells. *Endothelium : journal of endothelial cell research*, 15(4), 189-201 (2008).
144. Stone WL, Smith M. Therapeutic uses of antioxidant liposomes. *Molecular biotechnology*, 27(3), 217-230 (2004).
145. Wu J, Lee A, Lu Y, Lee RJ. Vascular targeting of doxorubicin using cationic liposomes. *International journal of pharmaceuticals*, 337(1-2), 329-335 (2007).
146. Lincopan N, Mamizuka EM, Carmona-Ribeiro AM. In vivo activity of a novel amphotericin B formulation with synthetic cationic bilayer fragments. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52(3), 412-418 (2003).
147. van Dalen EC, Michiels EM, Caron HN, Kremer LC. Different anthracycline derivatives for reducing cardiotoxicity in cancer patients. *The Cochrane database of systematic reviews*, (5), CD005006 (2010).

148. Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *The Journal of biological chemistry*, 270(32), 18997-19007 (1995).
149. Safinya CR. Structures of lipid-DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery. *Current opinion in structural biology*, 11(4), 440-448 (2001).
150. Torchilin VP. Lipid-core micelles for targeted drug delivery. *Current drug delivery*, 2(4), 319-327 (2005).
151. Lasic DD. Novel applications of liposomes. *Trends in biotechnology*, 16(7), 307-321 (1998).
152. Laverman P, Boerman OC, Oyen WJ, Dams ET, Storm G, Corstens FH. Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. *Advanced drug delivery reviews*, 37(1-3), 225-235 (1999).
153. Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological reviews*, 51(4), 691-743 (1999).
154. Chang DK, Chiu CY, Kuo SY, Lin WC, Lo A, Wang YP, Li PC, Wu HC. Antiangiogenic targeting liposomes increase therapeutic efficacy for solid tumors. *The Journal of biological chemistry*, 284(19), 12905-12916 (2009).
155. Harashima H, Tsuchihashi M, Iida S, Doi H, Kiwada H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of antitumor agents encapsulated into liposomes. *Advanced drug delivery reviews*, 40(1-2), 39-61 (1999).
156. Pedroso de Lima MC, Simoes S, Pires P, Faneca H, Duzgunes N. Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Advanced drug delivery reviews*, 47(2-3), 277-294 (2001).
157. El Ouahabi A, Thiry M, Pector V, Fuks R, Ruyschaert JM, Vandenbranden M. The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *FEBS letters*, 414(2), 187-192 (1997).
158. Mineo C, Anderson RG. Potocytosis. Robert Feulgen Lecture. *Histochemistry and cell biology*, 116(2), 109-118 (2001).
159. Thurston G, McLean JW, Rizen M, Baluk P, Haskell A, Murphy TJ, Hanahan D, McDonald DM. Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice. *The Journal of clinical investigation*, 101(7), 1401-1413 (1998).
160. Bremer C, Ntziachristos V, Mahmood U, Tung CH, Weissleder R. Progress in optical imaging. *Der Radiologe*, 41(2), 131-137 (2001).
161. Delpy DT, Cope M, van der Zee P, Arridge S, Wray S, Wyatt J. Estimation of optical pathlength through tissue from direct time of flight measurement. *Physics in medicine and biology*, 33(12), 1433-1442 (1988).
162. Gratton G, Maier JS, Fabiani M, Mantulin WW, Gratton E. Feasibility of intracranial near-infrared optical scanning. *Psychophysiology*, 31(2), 211-215 (1994).
163. Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov KA. Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends in biotechnology*, 23(12), 605-613 (2005).
164. Gross S, Piwnica-Worms D. Molecular imaging strategies for drug discovery and development. *Current opinion in chemical biology*, 10(4), 334-342 (2006).
165. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology*, 59, 223-239 (1962).
166. Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of microscopy*, 217(1), 1-15 (2005).

167. Shaner NC, Lin MZ, McKeown MR, Steinbach PA, Hazelwood KL, Davidson MW, Tsien RY. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature methods*, 5(6), 545-551 (2008).
168. Ai HW, Shaner NC, Cheng Z, Tsien RY, Campbell RE. Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins. *Biochemistry*, 46(20), 5904-5910 (2007).
169. Alieva NO, Konzen KA, Field SF, Meleshkevitch EA, Hunt ME, Beltran-Ramirez V, Miller DJ, Wiedenmann J, Salih A, Matz MV. Diversity and evolution of coral fluorescent proteins. *PloS one*, 3(7), e2680 (2008).
170. Gross LA, Baird GS, Hoffman RC, Baldrige KK, Tsien RY. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 11990-11995 (2000).
171. Carroll P, Schreuder LJ, Muwanguzi-Karugaba J, Wiles S, Robertson BD, Ripoll J, Ward TH, Bancroft GJ, Schaible UE, Parish T. Sensitive detection of gene expression in mycobacteria under replicating and non-replicating conditions using optimized far-red reporters. *PloS one*, 5(3), e9823 (2010).
172. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 22(12), 1567-1572 (2004).
173. Gheysens O, Mottaghy FM. Method of bioluminescence imaging for molecular imaging of physiological and pathological processes. *Methods (San Diego, Calif.)*, 48(2), 139-145 (2009).
174. Tannous BA, Kim DE, Fernandez JL, Weissleder R, Breakefield XO. Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 11(3), 435-443 (2005).
175. Andreu N, Zelmer A, Fletcher T, Elkington PT, Ward TH, Ripoll J, Parish T, Bancroft GJ, Schaible U, Robertson BD, Wiles S. Optimisation of bioluminescent reporters for use with mycobacteria. *PloS one*, 5(5), e10777 (2010).
176. Hastings JW. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene*, 173(1 Spec No), 5-11 (1996).
177. Ando Y, Niwa K, Yamada N, Irie T, Enomoto T, Kubota H, Ohmiya Y, Akiyama H. Development of a quantitative bio/chemiluminescence spectrometer determining quantum yields: re-examination of the aqueous luminol chemiluminescence standard. *Photochemistry and photobiology*, 83(5), 1205-1210 (2007).
178. Contag CH, Contag PR, Mullins JI, Spilman SD, Stevenson DK, Benaron DA. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Molecular microbiology*, 18(4), 593-603 (1995).
179. Rocchetta HL, Boylan CJ, Foley JW, Iversen PW, LeTourneau DL, McMillian CL, Contag PR, Jenkins DE, Parr TR Jr. Validation of a noninvasive, real-time imaging technology using bioluminescent *Escherichia coli* in the neutropenic mouse thigh model of infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(1), 129-137 (2001).
180. Mortin LI, Li T, Van Praagh AD, Zhang S, Zhang XX, Alder JD. Rapid bactericidal activity of daptomycin against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* peritonitis in mice as measured with bioluminescent bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(5), 1787-1794 (2007).
181. Kadurugamuwa JL, Modi K, Yu J, Francis KP, Orihuela C, Tuomanen E, Purchio AF, Contag PR. Noninvasive monitoring of pneumococcal meningitis and evaluation of treatment efficacy in an experimental mouse model. *Molecular imaging*, 4(2), 137-142 (2005).

182. Heuts F, Carow B, Wigzell H, Rottenberg ME. Use of non-invasive bioluminescent imaging to assess mycobacterial dissemination in mice, treatment with bactericidal drugs and protective immunity. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 11(14-15), 1114-1121 (2009).
183. Kadurugamuwa JL, Sin L, Albert E, Yu J, Francis K, DeBoer M, Rubin M, Bellinger-Kawahara C, Parr Jr TR Jr, Contag PR. Direct continuous method for monitoring biofilm infection in a mouse model. *Infection and immunity*, 71(2), 882-890 (2003).
184. Zelmer A, Carroll P, Andreu N, Hagens K, Mahlo J, Redinger N, Robertson BD, Wiles S, Ward TH, Parish T, Ripoll J, Bancroft GJ, Schaible UE. A new in vivo model to test anti-tuberculosis drugs using fluorescence imaging. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(8), 1948-1960 (2012).
185. Andreu N, Zelmer A, Sampson SL, Ikeh M, Bancroft GJ, Schaible UE, Wiles S, Robertson BD. Rapid in vivo assessment of drug efficacy against Mycobacterium tuberculosis using an improved firefly luciferase. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(9), 2118-2127 (2013).
186. Unge A, Tombolini R, Molbak L, Jansson JK. Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dual gfp-luxAB marker system. *Applied and environmental microbiology*, 65(2), 813-821 (1999).
187. Qazi SN, Counil E, Morrissey J, Rees CE, Cockayne A, Winzer K, Chan WC, Williams P, Hill PJ. agr expression precedes escape of internalized Staphylococcus aureus from the host endosome. *Infection and immunity*, 69(11), 7074-7082 (2001).
188. Tamagnini I, Guglielmetti S, Mora D, Parini C, Canzi E, Karp M. Generation and comparison of bioluminescent and fluorescent Bacillus licheniformis. *Current microbiology*, 57(3), 245-250 (2008).
189. Troy T, Jekic-McMullen D, Sambucetti L, Rice B. Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. *Molecular imaging*, 3(1), 9-23 (2004).
190. Taroni P, Pifferi A, Torricelli A, Comelli D, Cubeddu R. In vivo absorption and scattering spectroscopy of biological tissues. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 2(2), 124-129 (2003).
191. Rice BW, Cable MD, Nelson MB. In vivo imaging of light-emitting probes. *Journal of biomedical optics*, 6(4), 432-440 (2001).
192. Bruchez M, Jr., Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5385), 2013-2016 (1998).
193. Alivisatos AP, Gu W, Larabell C. Quantum dots as cellular probes. *Annual review of biomedical engineering*, 7, 55-76 (2005).
194. Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature methods*, 5(9), 763-775 (2008).
195. Pinaud F, Michalet X, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Iyer G, Weiss S. Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. *Biomaterials*, 27(9), 1679-1687 (2006).
196. Kamath AT, Mastelic B, Christensen D, Rochat AF, Agger EM, Pinschewer DD, Andersen P, Lambert PH, Siegrist CA. Synchronization of dendritic cell activation and antigen exposure is required for the induction of Th1/Th17 responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(10), 4828-4837 (2012).
197. Colditz GA. Overview of the epidemiology methods and applications: strengths and limitations of observational study designs. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50 Suppl 1, 10-12 (2010).

198. Andreu N, Zelmer A, Wiles S. Noninvasive biophotonic imaging for studies of infectious disease. *FEMS microbiology reviews*, 35(2), 360-394 (2011).
199. Deliolanis NC, Kasmieh R, Wurdinger T, Tannous BA, Shah K, Ntziachristos V. Performance of the red-shifted fluorescent proteins in deep-tissue molecular imaging applications. *Journal of biomedical optics*, 13(4), 044008 (2008).
200. Zelmer A, Ward TH. Noninvasive fluorescence imaging of small animals. *Journal of microscopy*, 252(1), 8-15 (2013).
201. Herschel JFW. *Phil. Trans. R. Soc. London*, 133, 143-145 (1845).
202. Shcherbo D, Murphy CS, Ermakova GV, Solovieva EA, Chepurnykh TV, Shcheglov AS, Verkhusa VV, Pletnev VZ, Hazelwood KL, Roche PM, Lukyanov S, Zaraisky AG, Davidson MW, Chudakov DM. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *The Biochemical journal*, 418(3), 567-574 (2009).
203. Wang L, Jackson WC, Steinbach PA, Tsien RY. Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(48), 16745-16749 (2004).
204. Cosma CL, Humbert O, Ramakrishnan L. Superinfecting mycobacteria home to established tuberculous granulomas. *Nature immunology*, 5(8), 828-835 (2004).
205. Cosma CL, Humbert O, Sherman DR, Ramakrishnan L. Trafficking of superinfecting Mycobacterium organisms into established granulomas occurs in mammals and is independent of the Erp and ESX-1 mycobacterial virulence loci. *The Journal of infectious diseases*, 198(12), 1851-1855 (2008).
206. Kaps I, Ehrt S, Seeber S, Schnappinger D, Martin C, Riley LW, Niederweis M. Energy transfer between fluorescent proteins using a co-expression system in Mycobacterium smegmatis. *Gene*, 278(1-2), 115-124 (2001).
207. Sun J, Deghmane AE, Soualhine H, Hong T, Bucci C, Solodkin A, Hmama Z. Mycobacterium bovis BCG disrupts the interaction of Rab7 with RILP contributing to inhibition of phagosome maturation. *Journal of leukocyte biology*, 82(6), 1437-1445 (2007).
208. Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature methods*, 2(12), 905-909 (2005).
209. Harper J, Skerry C, Davis SL, Tasneen R, Weir M, Kramnik I, Bishai WR, Pomper MG, Nuermberger EL, Jain SK. Mouse model of necrotic tuberculosis granulomas develops hypoxic lesions. *The Journal of infectious diseases*, 205(4), 595-602 (2012).
210. Patel K, Jhamb SS, Singh PP. Models of latent tuberculosis: their salient features, limitations, and development. *Journal of laboratory physicians*, 3(2), 75-79 (2011).
211. Leevy WM, Lambert TN, Johnson JR, Morris J, Smith BD. Quantum dot probes for bacteria distinguish Escherichia coli mutants and permit in vivo imaging. *Chemical communications (Cambridge, England)*, (20), 2331-2333 (2008).
212. Leevy WM, Gammon ST, Johnson JR, Lampkins AJ, Jiang H, Marquez M, Piwnica-Worms D, Suckow MA, Smith BD. Noninvasive optical imaging of staphylococcus aureus bacterial infection in living mice using a Bis-dipicolylamine-Zinc(II) affinity group conjugated to a near-infrared fluorophore. *Bioconjugate chemistry*, 19(3), 686-692 (2008).
213. Kong Y, Yao H, Ren H, Subbian S, Cirillo SL, Sacchetti JC, Rao J, Cirillo JD. Imaging tuberculosis with endogenous beta-lactamase reporter enzyme fluorescence in live mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27), 12239-12244 (2010).
214. Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature materials*, 4(6), 435-446 (2005).

215. So MK, Loening AM, Gambhir SS, Rao J. Creating self-illuminating quantum dot conjugates. *Nature protocols*, 1(3), 1160-1164 (2006).
216. So MK, Xu C, Loening AM, Gambhir SS, Rao J. Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging. *Nature biotechnology*, 24(3), 339-343 (2006).
217. Loening AM, Fenn TD, Wu AM, Gambhir SS. Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 19(9), 391-400 (2006).
218. Bianchi A, Dufort S, Fortin PY *et al.* In vivo MRI for effective non-invasive detection and follow-up of an orthotopic mouse model of lung cancer. *NMR in biomedicine*, (2014).
219. Adisheshaiah PP, Patel NL, Ileva LV, Kalen JD, Haines DC, McNeil SE. Longitudinal imaging of cancer cell metastases in two preclinical models: a correlation of noninvasive imaging to histopathology. *International journal of molecular imaging*, 2014, 102702 (2014).
220. Francis KP, Yu J, Bellinger-Kawahara C, Joh D, Hawkinson MJ, Xiao G, Purchio TF, Caparon MG, Lipsitch M, Contag PR. Visualizing pneumococcal infections in the lungs of live mice using bioluminescent *Streptococcus pneumoniae* transformed with a novel gram-positive lux transposon. *Infection and immunity*, 69(5), 3350-3358 (2001).
221. Wiles S, Clare S, Harker J, Huett A, Young D, Dougan G, Frankel G. Organ specificity, colonization and clearance dynamics in vivo following oral challenges with the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Cellular microbiology*, 6(10), 963-972 (2004).
222. Rajashekara G, Glover DA, Krepps M, Splitter GA. Temporal analysis of pathogenic events in virulent and avirulent *Brucella melitensis* infections. *Cellular microbiology*, 7(10), 1459-1473 (2005).
223. Wright JS, 3rd, Jin R, Novick RP. Transient interference with staphylococcal quorum sensing blocks abscess formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), 1691-1696 (2005).
224. Lane MC, Alteri CJ, Smith SN, Mobley HL. Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(42), 16669-16674 (2007).
225. Steinhuber A, Landmann R, Goerke C, Wolz C, Fluckiger U. Bioluminescence imaging to study the promoter activity of hla of *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 298(7-8), 599-605 (2008).
226. Prioli RP, Tanna A, Brown IN. Rapid methods for counting mycobacteria--comparison of methods for extraction of mycobacterial adenosine triphosphate (ATP) determined by firefly luciferase assay. *Tubercle*, 66(2), 99-108 (1985).
227. Janaszek W, Aleksandrowicz J, Sitkiewicz D. The use of the firefly bioluminescent reaction for the rapid detection and counting of mycobacterium BCG. *Journal of biological standardization*, 15(1), 11-16 (1987).
228. Andrew PW, Roberts IS. Construction of a bioluminescent mycobacterium and its use for assay of antimycobacterial agents. *Journal of clinical microbiology*, 31(9), 2251-2254 (1993).
229. Cooksey RC, Crawford JT, Jacobs WR, Jr., Shinnick TM. A rapid method for screening antimicrobial agents for activities against a strain of *Mycobacterium tuberculosis* expressing firefly luciferase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(6), 1348-1352 (1993).
230. Cooksey RC, Morlock GP, Beggs M, Crawford JT. Bioluminescence method to evaluate antimicrobial agents against *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(3), 754-756 (1995).
231. Arain TM, Resconi AE, Hickey MJ, Stover CK. Bioluminescence screening in vitro (Bio-Siv) assays for high-volume antimycobacterial drug discovery. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(6), 1536-1541 (1996).

232. Gordon S, Chung G, Andrew P. The application of bacterial luciferase as a reporter gene in mycobacteria. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 101, 235-243 (1998).
233. Deb DK, Srivastava KK, Srivastava R, Srivastava BS. Bioluminescent Mycobacterium aurum expressing firefly luciferase for rapid and high throughput screening of antimycobacterial drugs in vitro and in infected macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 279(2), 457-461 (2000).
234. Shawar RM, Humble DJ, Van Daltsen JM, Stover CK, Hickey MJ, Steele S, Mitscher LA, Baker W. Rapid screening of natural products for antimycobacterial activity by using luciferase-expressing strains of Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium intracellulare. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(3), 570-574 (1997).
235. Carriere C, Riska PF, Zimhony O, Kriakov J, Bardarov S, Burns J, Chan J, Jacobs WR Jr. Conditionally replicating luciferase reporter phages: improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 35(12), 3232-3239 (1997).
236. Riska PF, Jacobs WR, Jr. The use of luciferase-reporter phage for antibiotic-susceptibility testing of mycobacteria. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 101, 431-455 (1998).
237. Bardarov S, Jr., Dou H, Eisenach K, Banaiee N, Ya Su, Chan J, Jacobs WR Jr, Riska PF. Detection and drug-susceptibility testing of M. tuberculosis from sputum samples using luciferase reporter phage: comparison with the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) system. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 45(1), 53-61 (2003).
238. Pai M, Kalantri SP. Bacteriophage-based tests for tuberculosis. *Indian journal of medical microbiology*, 23(3), 149-150 (2005).
239. Banaiee N, January V, Barthus C, Lambrick M, Roditi D, Behr MA, Jacobs WR Jr, Steyn LM. Evaluation of a semi-automated reporter phage assay for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis isolates in South Africa. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 88(1), 64-68 (2008).
240. Glomski IJ, Piris-Gimenez A, Huerre M, Mock M, Goossens PL. Primary involvement of pharynx and peyer's patch in inhalational and intestinal anthrax. *PLoS pathogens*, 3(6), e76 (2007).
241. Hardy J, Francis KP, DeBoer M, Chu P, Gibbs K, Contag CH. Extracellular replication of Listeria monocytogenes in the murine gall bladder. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5659), 851-853 (2004).
242. Levine MM, Black RE, Lanata C. Precise estimation of the numbers of chronic carriers of Salmonella typhi in Santiago, Chile, an endemic area. *The Journal of infectious diseases*, 146(6), 724-726 (1982).
243. Sjolinder H, Jonsson AB. Imaging of disease dynamics during meningococcal sepsis. *PloS one*, 2(2), e241 (2007).
244. Luker GD, Leib DA. Luciferase real-time bioluminescence imaging for the study of viral pathogenesis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 292, 285-296 (2005).
245. Luker KE, Schultz T, Romine J, Leib DA, Luker GD. Transgenic reporter mouse for bioluminescence imaging of herpes simplex virus 1 infection in living mice. *Virology*, 347(2), 286-295 (2006).
246. Cook SH, Griffin DE. Luciferase imaging of a neurotropic viral infection in intact animals. *Journal of virology*, 77(9), 5333-5338 (2003).
247. Brock M, Jouvion G, Droin-Bergere S, Dussurget O, Nicola MA, Ibrahim-Granet O. Bioluminescent Aspergillus fumigatus, a new tool for drug efficiency testing and in vivo monitoring of invasive aspergillosis. *Applied and environmental microbiology*, 74(22), 7023-7035 (2008).

248. Doyle TC, Nawotka KA, Purchio AF, Akin AR, Francis KP, Contag PR. Expression of firefly luciferase in *Candida albicans* and its use in the selection of stable transformants. *Microbial pathogenesis*, 40(2), 69-81 (2006).
249. Hyland KV, Asfaw SH, Olson CL, Daniels MD, Engman DM. Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection. *International journal for parasitology*, 38(12), 1391-1400 (2008).
250. Lang T, Goyard S, Lebastard M, Milon G. Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. *Cellular microbiology*, 7(3), 383-392 (2005).
251. Hitziger N, Dellacasa I, Albiger B, Barragan A. Dissemination of *Toxoplasma gondii* to immunoprivileged organs and role of Toll/interleukin-1 receptor signalling for host resistance assessed by in vivo bioluminescence imaging. *Cellular microbiology*, 7(6), 837-848 (2005).
252. Saeij JP, Boyle JP, Grigg ME, Arrizabalaga G, Boothroyd JC. Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. *Infection and immunity*, 73(2), 695-702 (2005).
253. Vyas A, Kim SK, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(15), 6442-6447 (2007).
254. Lambert H, Hitziger N, Dellacasa I, Svensson M, Barragan A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cellular microbiology*, 8(10), 1611-1623 (2006).
255. Franke-Fayard B, Djokovic D, Dooren MW, Ramesar J, Waters AP, Falade MO, Kranendonk M, Martinelli A, Cravo P, Janse CJ. Simple and sensitive antimalarial drug screening in vitro and in vivo using transgenic luciferase expressing *Plasmodium berghei* parasites. *International journal for parasitology*, 38(14), 1651-1662 (2008).
256. Ploemen IH, Prudencio M, Douradinha BG, Ramesar J, Fonager J, van Gemert GJ, Luty AJ, Hermsen CC, Sauerwein RW, Baptista FG, Mota MM, Waters AP, Que I, Lowik CW, Khan SM, Janse CJ, Franke-Fayard BM. Visualisation and quantitative analysis of the rodent malaria liver stage by real time imaging. *PloS one*, 4(11), e7881 (2009).
257. Rajashekara G, Glover DA, Banai M, O'Callaghan D, Splitter GA. Attenuated bioluminescent *Brucella melitensis* mutants GR019 (virB4), GR024 (galE), and GR026 (BMEI1090-BMEI1091) confer protection in mice. *Infection and immunity*, 74(5), 2925-2936 (2006).
258. Burns-Guydish SM, Olomu IN, Zhao H, Wong RJ, Stevenson DK, Contag CH. Monitoring age-related susceptibility of young mice to oral *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection using an in vivo murine model. *Pediatric research*, 58(1), 153-158 (2005).
259. Glomski IJ, Corre JP, Mock M, Goossens PL. Noncapsulated toxinogenic *Bacillus anthracis* presents a specific growth and dissemination pattern in naive and protective antigen-immune mice. *Infection and immunity*, 75(10), 4754-4761 (2007).
260. Giri PK, Verma I, Khuller GK. Adjunct immunotherapy with Ag85 complex proteins based subunit vaccine in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunotherapy*, 1(1), 31-37 (2009).
261. Blazevic A, Eickhoff CS, Stanley J, Buller MR, Schriewer J, Kettelson EM, Hoft DF. Investigations of TB vaccine-induced mucosal protection in mice. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 16(1), 73-79 (2014).
262. Todoroff J, Lemaire MM, Fillee C, Jurion F, Renauld JC, Huygen K, Vanbever R. Mucosal and systemic immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A following its co-delivery with CpG, MPLA or LT62 to the lungs in mice. *PloS one*, 8(5), e63344 (2013).

263. Lindenstrom T, Woodworth J, Dietrich J, Aagaard C, Andersen P, Agger EM. Vaccine-induced th17 cells are maintained long-term postvaccination as a distinct and phenotypically stable memory subset. *Infection and immunity*, 80(10), 3533-3544 (2012).
264. Tyne AS, Chan JG, Shanahan ER, ER, Atmosukarto I, Chan HK, Britton WJ, West NP. TLR2-targeted secreted proteins from Mycobacterium tuberculosis are protective as powdered pulmonary vaccines. *Vaccine*, 31(40), 4322-4329 (2013).
265. Kaur M, Malik B, Garg T, Rath G, Goyal AK. Development and characterization of guar gum nanoparticles for oral immunization against tuberculosis. *Drug delivery*, (2014).
266. Hokey DA, Wachholder R, Darrah PA, Bolton DL, Barouch DH, Hill K, Dheenadhayalan V, Schwander S, Godin CS, Douoguih M, Pau MG, Seder RA, Roederer M, Sadoff JC, Sizemore D. A nonhuman primate toxicology and immunogenicity study evaluating aerosol delivery of AERAS-402/Ad35 Vaccine: Evidence for transient t cell responses in peripheral blood and robust sustained responses in the lungs. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(8) (2014).
267. Murphy D, Costello E, Aldwell FE, Lesellier S, Chambers MA, Fitzsimons T, Corner LA, Gormley E. Oral vaccination of badgers (*Meles meles*) against tuberculosis: Comparison of the protection generated by BCG vaccine strains Pasteur and Danish. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, (2014).
268. Hoft DF. Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *Lancet*, 372(9633), 164-175 (2008).
269. McConkey SJ, Reece WH, Moorthy VS, Webster D, Dunachie S, Butcher G, Vuola JM, Blanchard TJ, Gothard P, Watkins K, Hannan CM, Everaere S, Brown K, Kester KE, Cummings J, Williams J, Heppner DG, Pathan A, Flanagan K, Arulanantham N, Roberts MT, Roy M, Smith GL, Schneider J, Peto T, Sinden RE, Gilbert SC, Hill AV. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nature medicine*, 9(6), 729-735 (2003).
270. Vuola JM, Keating S, Webster DP, Berthoud T, Dunachie S, Gilbert SC, Hill AV. Differential immunogenicity of various heterologous prime-boost vaccine regimens using DNA and viral vectors in healthy volunteers. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(1), 449-455 (2005).
271. O'Hagan DT. Recent advances in vaccine adjuvants for systemic and mucosal administration. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 50(1), 1-10 (1998).
272. Frey SE, Houghton M, Coates S, Abrignani S, Chien D, Rosa D, Pileri P, Ray R, Di Bisceglie AM, Rinella P, Hill H, Wolff MC, Schultze V, Han JH, Scharschmidt B, Belshe RB. Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine*, 28(38), 6367-6373 (2010).
273. Henriksen-Lacey M, Korsholm KS, Andersen P, Perrie Y, Christensen D. Liposomal vaccine delivery systems. *Expert opinion on drug delivery*, 8(4), 505-519 (2011).
274. Garcon N, Chomez P, Van Mechelen M. GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert review of vaccines*, 6(5), 723-739 (2007).
275. Henriksen-Lacey M, Christensen D, Bramwell VW, Lindenstrøm T, Agger EM, Andersen P, Perrie Y. Liposomal cationic charge and antigen adsorption are important properties for the efficient deposition of antigen at the injection site and ability of the vaccine to induce a CMI response. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 145(2), 102-108 (2010).
276. Korsholm KS, Agger EM, Foged C, Christensen D, Dietrich J, Andersen CS, Geisler C, Andersen P. The adjuvant mechanism of cationic dimethyldioctadecylammonium liposomes. *Immunology*, 121(2), 216-226 (2007).

277. Hamborg M, Kramer R, Schante CE, Agger EM, Christensen D, Jorgensen L, Foged C, Middaugh CR. The physical stability of the recombinant tuberculosis fusion antigens h1 and h56. *Journal of pharmaceutical sciences*, 102(10), 3567-3578 (2013).
278. Mann JF, Shakir E, Carter KC, Mullen AB, Alexander J, Ferro VA. Lipid vesicle size of an oral influenza vaccine delivery vehicle influences the Th1/Th2 bias in the immune response and protection against infection. *Vaccine*, 27(27), 3643-3649 (2009).
279. Manolova V, Flace A, Bauer M, Schwarz K, Saudan P, Bachmann MF. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European journal of immunology*, 38(5), 1404-1413 (2008).
280. Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature reviews. Immunology*, 10(11), 787-796 (2010).
281. Thiele L, Rothen-Rutishauser B, Jilek S, Wunderli-Allenspach H, Merkle HP, Walter E. Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 76(1-2), 59-71 (2001).
282. Steinman RM. Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. *Immunity*, 29(3), 319-324 (2008).
283. Sporri R, Reis e Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nature immunology*, 6(2), 163-170 (2005).
284. Blander JM, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature*, 440(7085), 808-812 (2006).
285. Joffre O, Nolte MA, Sporri R, Reis e Sousa C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological reviews*, 227(1), 234-247 (2009).
286. Pulendran B, Tang H, Manicassamy S. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nature immunology*, 11(8), 647-655 (2010).
287. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 351-358 (2002).
288. Naik SH. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunology and cell biology*, 86(5), 439-452 (2008).
289. Zwierzina H, Schollenberger S, Herold M, Schmalzl F, Besemer J. Endogenous serum levels and surface receptor expression of GM-CSF and IL-3 in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia research*, 16(12), 1181-1186 (1992).
290. Takeuchi S, Furue M. Dendritic cells: ontogeny. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 56(3), 215-223 (2007).
291. Merad M, Manz MG. Dendritic cell homeostasis. *Blood*, 113(15), 3418-3427 (2009).
292. Ginhoux F, Collin MP, Bogunovic M, Abel M, Leboeuf M, Helft J, Ochando J, Kissenpfennig A, Malissen B, Grisotto M, Snoeck H, Randolph G, Merad M. Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *The Journal of experimental medicine*, 204(13), 3133-3146 (2007).
293. Poulin LF, Henri S, de Bovis B, Devilard E, Kissenpfennig A, Malissen B. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine*, 204(13), 3119-3131 (2007).
294. Sung SS, Fu SM, Rose CE, Jr., Gaskin F, Ju ST, Beaty SR. A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(4), 2161-2172 (2006).

295. Kirby AC, Raynes JG, Kaye PM. CD11b regulates recruitment of alveolar macrophages but not pulmonary dendritic cells after pneumococcal challenge. *The Journal of infectious diseases*, 193(2), 205-213 (2006).
296. Jakubzick C, Tacke F, Ginhoux F, Wagers AJ, van Rooijen N, Mack M, Merad M, Randolph GJ. Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103+ and CD103- pulmonary dendritic cell populations. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(5), 3019-3027 (2008).
297. Vermaelen K, Pauwels R. Accurate and simple discrimination of mouse pulmonary dendritic cell and macrophage populations by flow cytometry: methodology and new insights. *Cytometry. Part A : The journal of the International Society for Analytical Cytology*, 61(2), 170-177 (2004).
298. Jahnsen FL, Strickland DH, Thomas JA, Tobagus IT, Napoli S, Zosky GR, Turner DJ, Sly PD, Stumbles PA, Holt PG. Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(9), 5861-5867 (2006).
299. Byersdorfer CA, Chaplin DD. Visualization of early APC/T cell interactions in the mouse lung following intranasal challenge. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(12), 6756-6764 (2001).
300. Vermaelen KY, Carro-Muino I, Lambrecht BN, Pauwels RA. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *The Journal of experimental medicine*, 193(1), 51-60 (2001).
301. Ribechini E, Greifenberg V, Sandwick S, Lutz MB. Subsets, expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells. *Med Microbiol Immunol.*, 199(3):273-81. doi: 10.1007/s00430-010-0151-4. Epub (2010).
302. Bennet IA, Rao VS, Mitchell MS. Systemic bacillus Calmette-Guerin (BCG) activates natural suppressor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(10):5142-4 (1978).

A Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Neue Impfstoffkandidaten derzeit in klinischen Studien.....	17
Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien	27
Tabelle 3.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 3.3: Puffer, Lösungen und Medien.....	30
Tabelle 3.4: Verwendete Antikörper	32
Tabelle 3.5: FP, Plasmide	32
Tabelle 3.6: Verwendete Mausstämme	33
Tabelle 3.7: Geräte	33
Tabelle 3.8: Software.....	34

B Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Geschätzte Inzidenzraten der Tuberkulose 2010 weltweit (Quelle: WHO Report 2012).	2
Abbildung 1.2: Granulomausbildung und – Nekrose (modifiziert nach [91]).	10
Abbildung 1.3: Schematischer Vergleich der Immunantwort gegen <i>M. tuberculosis</i> und der hypothetischen Immunantwort gegen das Adjuvans-assoziierte Spaltvakzin H56-CAF01 gegen TB.13	
Abbildung 1.4: Vakzinierungsstrategien gegen TB.....	18
Abbildung 1.5: Aufbau des Liposoms CAF01.	21
Abbildung 1.6: IVIS Bildgebungssystem (Perkin Elmer Inc.).	24
Abbildung 4.1: Test der <i>M. tuberculosis</i> Reporterstämme in immundefizienten Mäusen.	47
Abbildung 4.2: Titration von <i>M. tuberculosis</i> Charge3, Cherry3 und H37Rv.....	49
Abbildung 4.3: Nachweis der <i>M. tuberculosis</i> Reporterstämme Charge3 und Cherry10 in immunkompetenten SKH-1 Mäusen.....	50
Abbildung 4.4: Nachweis der fluoreszierenden <i>M. tuberculosis</i> Charge3 bzw. Cherry3 Bakterien in den Lungen immunkompetenter SKH-1 Mäuse.....	51
Abbildung 4.5: Nachweis von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, Charge3 und Cherry10 im Lungengewebe immunkompetenter SKH-1 Mäuse anhand der Anfärbung der säurefesten Mykobakterien.	52
Abbildung 4.6: Nachweis des <i>M. tuberculosis</i> Reporterstamms FFlucRT in immunkompetenten BALB/c Mäusen.....	54
Abbildung 4.7: Versuchsaufbau zur Analyse der Schutzwirkung des H56-CAF01-Impfstoffs nach zwei unterschiedlichen Immunisierungswegen.	56
Abbildung 4.8: Die Schutzwirkung des Impfstoffs H56-CAF01 ist von der Art der Impfstoffverabreichung abhängig.	58
Abbildung 4.9: Nachweis fluoreszierender <i>M. tuberculosis</i> Charge3 Bakterien im Lungengewebe der CB6F1 Mäuse.	58

Abbildung 4.10: Entzündliche Infiltrate in den Lungen immunisierter Mäuse.	59
Abbildung 4.11: Versuchsaufbau zur Analyse der Schutzwirkung des H56-CAF01-Impfstoffes in zwei Immunisierungsmodellen nach der Grundimmunisierung mit BCG.....	60
Abbildung 4.12: Schützende Wirkung des H56-CAF01-Impfstoffes nach Grundimmunisierung mit BCG.....	62
Abbildung 4.13: Nachweis der fluoreszierenden <i>Mtb</i> Charge3 Bakterien im Lungengewebe der CB6F1 Mäuse.	63
Abbildung 4.14: Nachweis der <i>M. tuberculosis</i> Charge3 Bakterien im Lungengewebe der CB6F1 Mäuse.....	64
Abbildung 4.15: Herstellung der fluoreszierenden QDot-Ova-CAF01 Konjugate.	66
Abbildung 4.16: Western Blot Analyse der fluoreszierenden QDot-Ova-CAF01 Konjugate.....	66
Abbildung 4.17: Test der fluoreszierenden QDot-Ova-CAF01 Formulierungen im IVIS.....	67
Abbildung 4.18: Nachweis von Ovalbumin im Lungengewebe.....	67
Abbildung 4.19: Zeitliche Verteilung von QDot-Ova-CAF01 (20 pmol Qdot/Dosis) in der Maus nach intranasaler Verabreichung.	69
Abbildung 4.20: Verteilung der Fluoreszenzsignale im Lungengewebe der SKH-1 Mäuse nach intranasaler Verabreichung von QDot-Ova-CAF01.	70
Abbildung 4.21: Analyse der Verteilung von QDot-Ova-CAF01 im Lungengewebe der SKH-1 Mäuse nach intranasaler Verabreichung.	71
Abbildung 4.22: Zeitliche Verteilung von QD-Ova-CAF01 in der Maus nach intranasaler Verabreichung.....	73
Abbildung 4.23: Zeitliche Verteilung von QDot-Ova-CAF01 in lebenden SKH-1 Mäusen und isolierten inguinalen Lymphknoten nach subkutaner Verabreichung.	75
Abbildung 4.24. Nachweis von QDot-Ova-CAF01 in inguinalen Lymphknoten nach subkutaner Verabreichung.....	76
Abbildung 4.25: Nachweis von QDot-Ova-CAF01 in der Haut nach subkutaner Verabreichung.....	76
Abbildung 4.26: Zeitliche Verteilung von QDot-Ova-CAF01 (100 pmol QDot/Dosis) in der Maus nach subkutaner Verabreichung.	78
Abbildung 4.27: Lokalisation von LissRhod-CAF01 in RAW 264.7 Makrophagen.....	79
Abbildung 4.28: Schema der Herstellung der fluoreszierenden Impfstoffkonjugate (QDot-Ova-LissRhod-CAF01).....	80
Abbildung 4.29: Zeitliche Verteilung von QDot-Ova-CAF01 und QDot-Ova-LissRhod-CAF01 in der Maus.	81
Abbildung 4.30: Zeitliche Verteilung von LissRhod-CAF01 in der Maus.	82
Abbildung 4.31: Detektion des fluoreszenzmarkierten Impfstoffträgers CAF01 in Lungen und trachealen Lymphknoten.....	83
Abbildung 4.32: Detektion von Impfstoffträgern CAF01 in Lungen und trachealen Lymphknoten..	84
Abbildung 4.33: Detektion des fluoreszenzmarkierten Impfstoffträgers CAF01 in der Haut und inguinalen Lymphknoten.	85
Abbildung 4.34: Detektion von Impfstoffträgern CAF01 in der Haut und inguinalen Lymphknoten.	86

Abbildung 4.35: Vermehrtes Auftreten von CD11b+ Zellen in inguinalen Lymphknoten nach subkutaner Verabreichung von QDot-Ova-CAF01.	87
Abbildung 4.36: Lokalisation der QDots im Lymphknotengewebe.	88
Abbildung 4.37: Analyse der Subpopulationen QDot-tragender Zellen in Lymphknoten.....	90
Abbildung 4.38: Analyse der Subpopulationen QDot-tragender Zellen in der Milz.	92
Abbildung 4.39: Quantifizierung QDot-tragender Zellen in Lymphknoten.....	93
Abbildung 4.40: Quantifizierung QDot-tragender Zellen in der Milz.	94
Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Immunzellaktivierung und –rekrutierung entsprechend der Wege der Impfstoffverabreichung basierend auf unseren Daten.	107

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Publikationen:

Zelmer A., Carroll P., Andreu N., Hagens K., Mahlo J., **Redinger N.**, Robertson B.D., Wiles S., Ward T.H., Parish T., Ripoll J., Bancroft G.J., **Schaible U.E.** 2012 A new *in vivo* model to test anti-tuberculosis drugs using fluorescence imaging. *J Antimicrobial Chemotherapy* Aug; 67(8):1948-60. Epub May 25

Redinger N., Carroll P., Hagens K., Meyer D., **Christensen D.**, **Andersen P.L.**, Parish T., **Schaible U.E.** „Bioimaging reveals superiority of subcutaneous vs. intranasal subunit vaccination against tuberculosis“. In Vorbereitung.

Poster und Vorträge

Natalja Redinger, Andrea Zelmer, Paul Carroll, Kristine Hagens, Jaqueline Eich, **Dennis Christensen**, Theresa H. Ward, Brian D. Robertson, Nuria Andreu-Martin, Jorge Rippoll, Siouxsie Wiles, **Peter L. Andersen**, Tanya Parish, Gregory J. Bancroft, Ulrich E. **Schaible** „Novel vaccine carrier development and assessment by *in vivo* imaging“, Deutsche Gesellschaft für Immunologie, 2nd Autumn School, Current Concepts in Immunology, Bad Schandau, Deutschland, 03-08.10.2010, Vortrag.

Natalja Redinger, Andrea Zelmer, Paul Carroll, Kristine Hagens, Jaqueline Eich, **Dennis Christensen**, Theresa H. Ward, Brian D. Robertson, Nuria Andreu-Martin, Jorge Rippoll, Siouxsie Wiles, **Peter L. Andersen**, Tanya Parish, Gregory J. Bancroft, **Ulrich E. Schaible** „Novel vaccine carrier development and assessment by *in vivo* imaging“, Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, Lübeck, Deutschland, 26.06-29.06.2011, Poster.

Natalja Redinger, Andrea Zelmer, Paul Carroll, Kristine Hagens, Jaqueline Eich, **Dennis Christensen**, Theresa H. Ward, Brian D. Robertson, Nuria Andreu-Martin, Jorge Rippoll, Siouxsie Wiles, **Peter L. Andersen**, Tanya Parish, Gregory J. Bancroft, **Ulrich E. Schaible** „Novel vaccine carrier development and assessment by *in vivo* imaging“, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V., Congress Center Hamburg, Deutschland, 30.09-03.10.2012, Poster.

Natalja Redinger, Andrea Zelmer, Paul Carroll, Kristine Hagens, Jaqueline Eich, **Dennis Christensen**, Theresa H. Ward, Brian D. Robertson, Nuria Andreu-Martin, Jorge Rippoll, Siouxsie Wiles, **Peter L. Andersen**, Tanya Parish, Gregory J. Bancroft, **Ulrich E. Schaible** „Novel vaccine carrier development and assessment by *in vivo* imaging“, 35th Symposium of the North German Immunologists, Borstel, Deutschland, 23.11.2012, Poster.

Natalja Redinger, Andrea Zelmer, Paul Carroll, Kristine Hagens, Jaqueline Eich, **Dennis Christensen**, Theresa H. Ward, Brian D. Robertson, Nuria Andreu-Martin, Jorge Rippoll, Siouxsie Wiles, **Peter L. Andersen**, Tanya Parish, Gregory J. Bancroft, **Ulrich E. Schaible** „Novel vaccine carrier development and assessment by *in vivo* imaging“, Beiratsitzung, Borstel, Deutschland, 10.12.2012, Poster (Poster Award 2012, FZB Scientific Advisory Board).

Natalja Redinger, Andrea Zelmer, Paul Carroll, Kristine Hagens, Jaqueline Eich, **Dennis Christensen**, Theresa H. Ward, Brian D. Robertson, Nuria Andreu-Martin, Jorge Rippoll, Siouxsie Wiles, **Peter L. Andersen**, Tanya Parish, Gregory J. Bancroft, **Ulrich E. Schaible** „Novel vaccine carrier development and assessment by *in vivo* imaging“, 17. Minisymposium "Infection und Immunabwehr", Burg Rothenfels, Deutschland, 21.03-23.03.2013, Vortrag.

XII Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Natalja Redinger, Andrea Zelmer, Paul Carroll, Kristine Hagens, Jaqueline Eich, **Dennis Christensen**, **Peter L. Andersen**, Tanya Parish, **Ulrich E. Schaible** „Novel vaccine carrier development and assessment by *in vivo* imaging", The Ninth Elsinore Meeting on Infection Immunity, LO-Skolen, Elsinore, Denmark, 29.05-31.05 2013, Poster.

Natalja Redinger, Andrea Zelmer, Paul Carroll, Kristine Hagens, Jaqueline Eich, **Dennis Christensen**, **Peter L. Andersen**, Tanya Parish, **Ulrich E. Schaible** „Novel vaccine carrier development and assessment by *in vivo* imaging", 36th Symposium of the North-German Immunologists, Borstel, Deutschland, 22.11.2013, Vortrag.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Ulrich E. Schaible** für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe diese Doktorarbeit durchführen zu können, für seine stete Unterstützung, seine Motivationskraft, Geduld und Optimismus und dafür, dass er immer Rat wusste.

Herrn **Prof. Dr. Tamás Laskay** danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und **Prof. Dr. Stefan Taube** für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Zweitbetreuer **Prof. Dr. Holger Heine** für fruchtbare Diskussionen und sein Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt zudem **Kristine Hagens, Jacqueline Eich, Dagmar Meyer** für ihre praktische Unterstützung im Labor. **Kristine**, vielen Dank, dass Du mich in das Arbeiten mit Versuchstieren eingeführt hast, für Deine tatkräftige Hilfe bei *in vivo* Experimenten im S3-Labor und für die vielen fachlichen und philosophischen Gespräche zwischendurch. Bei **Jacqueline** bedanke ich mich für die Unterstützung am Mikroskop und bei **Dagmar** für Anfertigung der histologischen Schnitte. Für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung von durchflusszytometrischen Experimenten möchte ich mich sehr bei **Dr. Jochen Behrends** bedanken.

Bei allen weiteren Mitarbeitern des **Arbeitskreises „Zelluläre Mikrobiologie“**, **Dr. Yeojun Yun, Dr. Tobias Dallenga, Anna Christina Geffken, Carlotta Ober-Blöbaum, Steffi Renk, Maike Burmeister, Bhesh Paudyal, Nadine Harmel, Dr. Christian Alexander, Nina Grohmann, Dr. Nicole Zehethofer** sowie bei **Dr. Bianca Schneider** und **Jannike Blank**, möchte ich mich für das großartige Arbeitsklima, den ein oder anderen kleinen Tip, für die Beantwortung der kleinen Fragen zwischendurch und den Spaß, den ich während der Arbeit hatte, ganz herzlich bedanken.

Ganz besonders danke ich **Alexander** und **Konstantin** für ihr Verständnis und ihre Geduld und **meinen Eltern** für die stete Unterstützung in jeder Lebenslage.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Hamburg, den 25.06.2014

A handwritten signature in black ink, reading "N. Redinger". The signature is written in a cursive style with a large initial "N" and a long, sweeping underline.

Natalja Redinger