

AUS DER ABTEILUNG FÜR IMMUNOLOGIE

(LEITER: PROF. DR. BERNHARD FLEISCHER)

BERNHARD-NOCHT-INSTITUT FÜR TROPENMEDIZIN

CHARAKTERISIERUNG DER T-ZELL-VERMITTELTEN
IMMUNANTWORT IN ULKUS UND PERIPHEREM BLUT
BEI PATIENTEN MIT BURULI ULKUS

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER
UNIVERSITÄT HAMBURG

VORGELEGT VON

KATHARINA BECKER

AUS HEIDELBERG

HAMBURG 2011

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.01.2012

Veröffentlicht mit der Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. B. Fleischer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. H.-W. Mittrücker

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. M. Jacobsen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
1 EINLEITUNG	1
1.1 Buruli Ulkus: Epidemiologie und Übertragung	1
1.2 Erreger: <i>Mycobacterium ulcerans</i>	3
1.3 Klinische Manifestation des BU	4
1.4 Therapie	6
1.5 Sozialmedizinische Bedeutung	7
1.6 Histopathologie	7
1.7 Immunologie der <i>M. ulcerans</i> -Infektion	9
1.8 Projekt und Arbeitshypothesen	13
2 MATERIAL, PATIENTENKOLLEKTIV, METHODEN	14
2.1 Material	14
2.1.1 Instrumente	14
2.1.2 Materialien zur Probengewinnung	14
2.1.3 Molekularbiologische Materialien	14
2.1.4 Zellbiologische Materialien	14
2.1.5 Oligonukleotide	15
2.1.6 Puffer und Stammlösungen	17
2.1.7 Stimulationsreagentien	17
2.1.8 Antikörper	18
2.1.9 Computerprogramme	19
2.2 Studiendesign und Patientenkollektiv	19
2.2.1 Rahmenbedingungen und Ethikantrag	19
2.2.2 Rekrutierung des Patientenkollektivs	19
2.2.3 Probenaufarbeitung	22
2.3 Zellbiologische Methoden	23
2.3.1 PBMC-Isolation aus Vollblut	23
2.3.2 T-Zell Linien aus Hautgewebe (TCL)	23
2.3.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität mit Trypanblau	24
2.3.4 Einfrieren der PBMC/TCL	24
2.3.5 Auftauen der PBMC/TCL	24
2.3.6 Stimulation durch Antigene und mykobakterielle Proteine und Lysate	24
2.3.7 Fixierung der PBMC	25
2.4 Durchflusszytometrische Zellanalyse	25

2.4.1	Intrazelluläre Färbung	26
2.4.2	Messung am Durchflusszytometer	26
2.4.3	Graphische Darstellung der Zytokinauswertung	26
2.5	Molekularbiologische Methoden	28
2.5.1	RNA-Isolation	28
2.5.2	Konzentrationsbestimmung der RNA	29
2.5.3	Reverse Transkription	30
2.5.4	Quantifizierung durch qPCR	30
2.5.5	Agarosegelelektrophorese	31
2.6	Übersicht über Probenaufarbeitung und Analyseverfahren	32
3	ERGEBNISSE	33
3.1	Systemische Immunantwort: Restimulation mit mykobakteriellen Proteinen und Lysaten	33
3.1.1	Zytokinexpression der M. ulcerans-spezifischen CD4 ⁺ - T-Zellsubpopulationen	33
3.1.2	Vergleich der Zytokinexpression zwischen Burulipatienten und Kontrollen	34
3.1.3	Die relative T-Zell-Antwort gegen mykobakterielle Antigene	35
3.1.4	Multizytokinproduktion nach Stimulation mit mykobakteriellen Antigenen	37
3.1.5	Korrelation der Immunantwort mit klinischen Parametern	39
3.2	Fallstudie: T-Zell-Charakterisierung von Proben eines 9 jährigen Patienten	42
3.2.1	Anamnese und Lokalbefund	42
3.2.2	Analyse des TCR-BV-Ketten-Repertoire	43
3.2.3	TCR-Subtypen, Differenzierungsstatus und Transkriptionsfaktoren	48
3.3	Lokale Immunantwort: Zytokinexpression von TCL der Läsion	48
4	DISKUSSION	51
4.1	Systemische Immunantwort	52
4.2	Lokale Immunantwort	57
5	ZUSAMMENFASSUNG	61
6	ANHANG	63
6.1	Formbogen zur Eingabe der Patientendaten in die Datenbank	63
6.2	Patientenaufklärung	65
6.3	Einwilligungserklärung	66
6.4	Einwilligungserklärung der Fallstudie des Patienten AP/KB/026/08	67
	Literaturverzeichnis	68
	Abbildungsverzeichnis	73
7	LEBENS LAUF	75
8	DANKSAGUNG	76
9	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	77

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APC	Antigen präsentierende Zelle (<i>Antigen Presenting Cell</i>)
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BNI	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
BU	Buruli Ulkus
BV	variable β -Kette
CCR	Chemokin Cytokin Rezeptor
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene (<i>Cluster of Differentiation</i>)
cDNA	Kopierte DNA (<i>copy Desoxyribonucleinacid</i>)
CMI	<i>Cell Mediated Immunology</i>
DC	Dendritische Zelle (<i>Dendritic Cell</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EU	Europäische Union
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer
FCS	Fötales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
foxp3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GUS-b	β -Glucuronidase
GATA-3	<i>Trans-acting T-cell-specific Transcription Factor</i> (Transkriptionsfaktor aus der GATA-Familie)
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HIE/HIF	Immunhistologie Ethanol/Formaldehyd
HS	Humanserum
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMGT	<i>ImMunoGeneTics</i> (Referenz für Immunogenetik und Immunoinformatik)
i.m.	intramuskulär
IS	<i>Insertion Sequence</i>
KCCR	<i>Kumasi Centre for Collaborative Research</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
Min	Minuten
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PBMC	Periphere Blutlymphozyten (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PHA	Phythämagglutinin
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PPDsens	<i>Purified Protein Derivative of Mycobacterium avium</i>
PPDtub	<i>Purified Protein Derivative of Mycobacterium tuberculosis</i>
qPCR	quantitative PCR
RORC	<i>RAR-related Orphan Receptor C</i>
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
sHsp	kleines Hitzeschockprotein (<i>small heat shock protein</i>)
TBE	Tris-Borat-EDTA
t-bet	<i>T-box expressed in T Cells</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T Cell Receptor</i>)
TCL	T-Zell-Linie (<i>T Cell Line</i>)

T _{CM}	zentrale Gedächtnis-T-Zelle (<i>Central Memory T Cell</i>)
T _{EM}	Effektor Gedächtnis-T-Zelle (<i>Effector Memory T Cell</i>)
T _{EF}	Effektor-T-Zelle (<i>Effector T Cell</i>)
T _{naiv}	naive T-Zelle
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Tb	Tuberkulose
U	Einheit (<i>Unit</i>)
UV	Ultra-Violett
Upm	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche
WHO	<i>World Health Organisation</i>

1 EINLEITUNG

Buruli Ulkus (BU) ist eine Infektionskrankheit der Haut, die durch *Mycobacterium (M.) ulcerans* hervorgerufen wird. Nach Lepra und Tuberkulose ist BU die dritthäufigste mykobakterielle Erkrankung bei immunkompetenten Menschen. Erste Beschreibungen von Hautulzera, die Krankheitsverläufe von BU ähneln, gehen bis ins 19. Jahrhundert zurück (Kampala, Uganda, Sir Albert Cook, 1897). Erst ein halbes Jahrhundert später gelang Peter MacCallum die erste Kultivierung des Erregers *M. ulcerans* aus der Wunde eines Burulipatienten aus Bairnsdale (Victoria, Australien, 1948) (MacCallum und Tolhurst, 1948), dort heute noch bekannt als Bairnsdale Ulkus. Die gleichen Krankheitsverläufe wurden in den 60er Jahren in verschiedenen Gegenden Afrikas beobachtet, wobei das Ulkus in Buruli County (heutiges Nakasongola, Uganda) am weitesten verbreitet war und nach dieser Gegend benannt wurde. Jahrzehntlang wurde die Erforschung und Therapie des BU vernachlässigt, bis 1998 die *Global Buruli Ulcer Initiative* durch die *World Health Organisation* (WHO) gegründet wurde. Deutliche Verbesserungen in Aufklärung, Diagnostik und Therapie des BU wurden dadurch erreicht. Dennoch stellt BU noch heute in vielen westafrikanischen Ländern ein großes medizinisches und soziales Problem dar (Wansbrough-Jones und Phillips, 2006).

1.1 Buruli Ulkus: Epidemiologie und Übertragung

Zu den von BU betroffenen Regionen zählt, neben einzelnen Herden in Asien, Lateinamerika und Australien, vor allem Westafrika mit den Ländern Ghana, Benin und Elfenbeinküste (Abbildung 1.1, WHO Asiedu *et al.*, 2000). Ein Großteil der Betroffenen stammt aus ländlichen, abgelegenen Gegenden, was eine zuverlässige Datenerhebung erschwert. Daher dürften die bisher publizierten Daten die Prävalenz und Inzidenz des BU unterschätzen. In einzelnen Gemeinden Ghanas wird die Prävalenz auf 22 % geschätzt (Amofah *et al.*, 1993). Eine Datenerhebung von 1999 in der Zou Region in Benin gibt eine Prävalenz für BU (21,5/100 000) an, die höher ist als für Lepra (13,4/100 000) und Tuberkulose (20,0/100 000) (Debacker *et al.*, 2004a). Insgesamt steigt die Erkrankungshäufigkeit und Verbreitung des BU deutlich. Abbildung 1.2 zeigt den Vergleich der betroffenen Länder in Afrika um 1980 und im Jahr 2000. Am häufigsten sind Kinder unter 15 Jahren von BU betroffen. Eine Geschlechterpräferenz ist in dieser Gruppe nicht bekannt, nur unter Erwachsenen erkranken Frauen häufiger. Die meisten Ulzera sind an den Extremitäten, wobei die unteren Extremitäten mehr als doppelt so häufig betroffen sind (Marston *et al.*, 1995; Debacker *et al.*, 2004b, WHO Asiedu *et al.*, 2000). Eine Studie in Benin zeigte einen Inzidenzgipfel bei Erwachsenen zwischen 75 und 79 Jah-

ren, den Debacker *et al.* (2004b) mit einer Reaktivierung einer latenten *M. ulcerans*-Infektion durch zunehmende Immunsuppression im Alter erklären. Die scheint mit einer milderen Klinik als bei den Kindern unter 15 Jahren einherzugehen (Debacker *et al.*, 2004b).

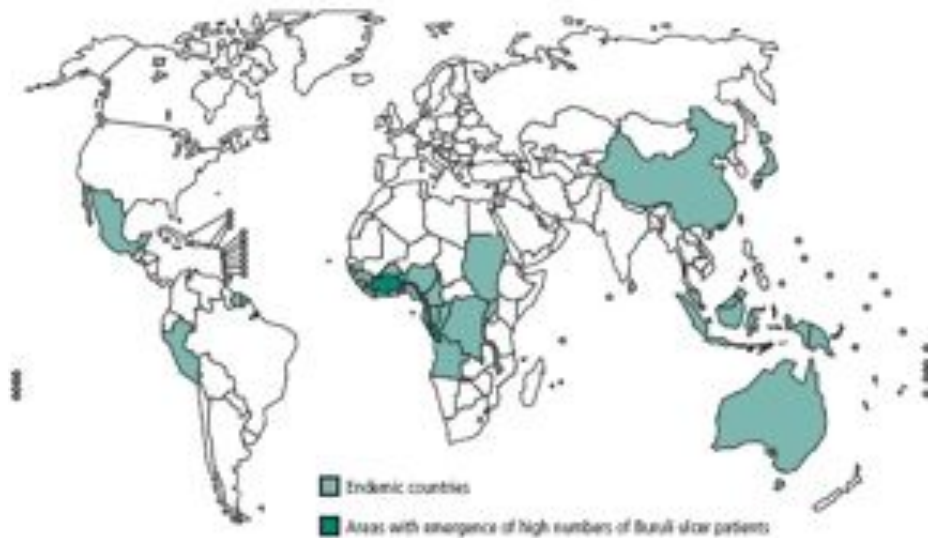


Abbildung 1.1: Endemiegebiet des Buruli Ulkus. Die Weltkarte zeigt die Endemiegebiete von Buruli Ulkus entlang eines Gürtels mit tropischem bis subtropischem Klima. Die höchste Prävalenz wird aus Benin, Elfenbeinküste und Ghana berichtet (WHO, 2005)

Unklar sind bisher die Übertragungswege. Beobachtet wurde allerdings ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen endemischen Herden und Umweltbedingungen bzw. Umweltveränderungen. So scheint feuchtes tropisches Klima in Kombination mit stehenden Gewässern die Ausbreitung der Erkrankung zu fördern und lässt einen geeigneten Lebensraum für *M. ulcerans* vermuten (WHO Asiedu *et al.*,

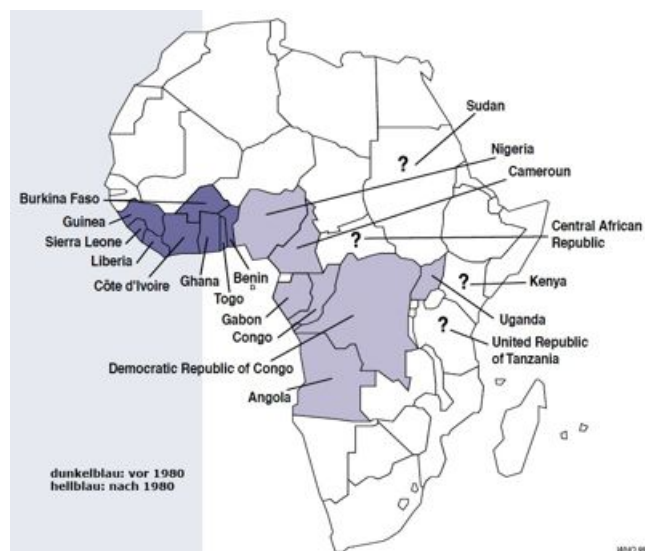


Abbildung 1.2: Zunahme der Endemie von Buruli Ulkus in Afrika. Die dunkelblau dargestellten Länder waren vor 1980 schon betroffen, die hellblau gekennzeichneten sind erst später hinzu gekommen (WHO, 2000).

2000). Beispielsweise tritt BU in dem ehemals hochendemischen Gebiet Nakosongola District in Uganda deutlich seltener auf (Stragier *et al.*, 2006), nachdem der Wasserspiegel des Viktoria Sees gesunken und das Überschwemmungsgebiet entlang des Victoria Nils trocken gelegt wurde.

Die Infektion mit *M. ulcerans* setzt ein Mikrotrauma der Epidermis voraus, so dass Tätigkeiten in Fischerei oder Landwirtschaft, die zu kleinen Schnittverletzungen der Haut führen können, zu den Risikofaktoren für BU zählen. *M. ulcerans* ist mittels IS (*insertion sequence*) 2404 - spezifischer PCR mehrfach in der Umwelt, vor allem in Wasserpflanzen und einigen Wasserinsekten, nachgewiesen worden (van der Werf *et al.*, 2005). Durch einen möglichen horizontalen Gentransfer von IS 2404 ist dieser Nachweis jedoch nicht vollkommen spezifisch für *M. ulcerans*. Daher war erst die gelungene Erregerkultivierung aus den Speicheldrüsen des Wasserinsekts *Hemiptera* (Wasserläufer, *Gerris sp.*) auch der endgültige Beweis für die Vermehrung von *M. ulcerans* im Insektenspeichel. Dies spricht für eine Verbreitung und Übertragung von *M. ulcerans* durch Insekten (Portaels *et al.*, 2008). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch hingegen wird als sehr unwahrscheinlich angenommen. Nur in zwei Fällen wurde dies in Betracht gezogen (van der Werf *et al.*, 2005).

1.2 Erreger: *Mycobacterium ulcerans*

M. ulcerans ist ein grampositives, langsam wachsendes, säurefestes Stäbchenbakterium, das zu den atypischen Mykobakterien (*Mycobacteria other than tuberculosis*, MOTT) gezählt wird. Seine optimale Wachstumstemperatur liegt bei 32° C (van der Werf *et al.*, 2005). Genetische Studien zeigen, dass *M. ulcerans* evolutionär von *M. marinum* abstammt (Demangel *et al.*, 2009). Klinisch manifestiert sich die *M. marinum*-Infektion ähnlich wie die *M. ulcerans*-Infektion meist an den Extremitäten als ein einzelner, roter, schmerzloser Knoten unter der Haut. Dieses sogenannte Schwimmbadgranulom ist je nach Immunlage selbstlimitierend oder führt zur Ulzeration (Gaglani und Ballay, 1999). Die Protein kodierenden DNA-Sequenzen von *M. ulcerans* stimmen mit dem Genom von *M. marinum* nahezu vollständig überein. Allerdings ist das genomische Material von *M. ulcerans* um 1,1 Mb drastisch reduziert. Damit geht bei *M. ulcerans* nicht nur die Fähigkeit bei Tageslicht und in anaerober Umgebung zu leben, sondern auch wichtige Oberflächenproteine verloren, die als Virulenzfaktoren entscheidend für Pathogenese und Granulombildung sind. Durch diesen als 'reduzierende Evolution' bezeichneten Vorgang ist *M. ulcerans* optimal an eine dunkle, aerobe Umgebung angepasst und wirkt weniger immunogen auf die Zellen der angeborenen Immunantwort (Demangel *et al.*, 2009).

Im Gegensatz zu *M. marinum* besitzt *M. ulcerans* das Virulenz-Plasmid pMUM001, das für den Syntheseweg des Mykolaktons kodiert (Abbildung 1.3). Dieses fettlösliche Makromolekül wirkt zytotoxisch und immunsuppressiv (Boulkroun *et al.*, 2010). Daher läuft eine Infektion mit *M. ulcerans* ohne die Kardinalsymptome der Entzündung ab. Es findet keine Infiltration von neutrophilen Granulozyten statt, die sich klinisch als eine gerötete, schmerzhafte Schwellung mit Eiterbildung darstellen würde. Damit ist das Mykolakton das entscheidende Pathogen für die für BU typische langwierige, chronische Infektion (Demangel *et al.*, 2009; Schütte und Pluschke, 2009).

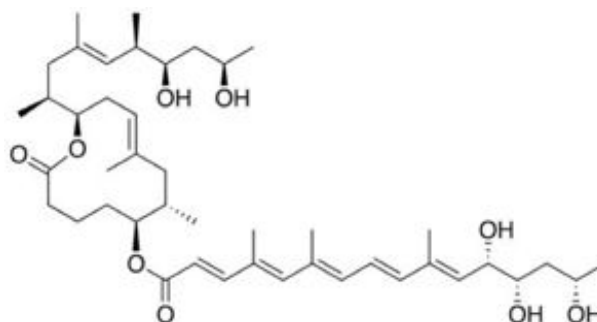


Abbildung 1.3: Strukturformel von Mykolakton B. (George et al., 1999)

Diese Wirkung ist auch durch bisherige Erkenntnisse auf molekularer Ebene erklärbar. Mykolakton scheint die Zellen des Immunsystems in einen anergischen Zustand - eine Art Ruhezustand - zu versetzen (George et al., 1999). Im Mausmodell führt Mykolakton in geringer Dosierung zur Arretierung von Fibroblasten in der G0/G1-Phase (George et al., 1999). Es diffundiert ins Zytosol und bindet dort an einen noch unbekanntem intrazellulären Rezeptor. Dies führt zum Funktionsverlust dendritischer Zellen und T-Zellen, ohne eine Apoptose auszulösen. Zellreifung und Zytokinproduktion sind deutlich gemindert (Demangel et al., 2009). Wahrscheinlich wird dies durch eine Interaktion des Mykolaktons mit Molekülen des NFκB-Signalwegs bewirkt. Eine durch Mykolakton verminderte IL-2-Produktion aktivierter T-Zellen, genauso wie eine verminderte TNFα- und IL-10-Produktion von Monozyten, wurde in *in-vitro*-Experimenten beobachtet (Pahlevan et al., 1999).

Der klinische Phänotyp des BU wird maßgeblich von der Mykolaktonproduktion bestimmt. So bewirkt die Injektion von Mykolakton sowohl eine Zerstörung von Nervenendigungen und damit verbundene Schmerzlosigkeit (Mausmodell, En et al. 2008) als auch eine BU-ähnliche Ulkusbildung (Meerschweinchenmodell, George et al. 1999).

1.3 Klinische Manifestation des BU

Eine aktive BU-Erkrankung zeigt einen variablen Krankheitsverlauf: Inkubationszeit, Zahl, Lokalisation und Größe der Ulzera sowie die Selbstheilungstendenz sind individuell sehr verschieden. Größtenteils einheitlich ist hingegen die klinische Manifestation des BU als eine stadienhaft ablaufende Hautkrankheit. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis drei Monaten beginnt das präulzerative Stadium, nachdem initial durch ein Mikrotrauma in der Epidermis der mykobakterielle Erreger in die Unterhaut gelangt war. Es bildet sich ein schmerzfreier Knoten oder Plaque bei intaktem Epithelgewebe (Abbildung 1.4, Portaels et al., 2009).

Mit zunehmender Krankheitsdauer geht die präulzerative in die ulzerative Phase über. Steigende Mykobakterienzahlen wirken sich durch steigenden Mykolaktongehalt zytotoxisch auf die umliegenden Zellen aus. Es kommt zu nekrotischen Veränderungen in der Subkutis mit anschließender zentraler Ulzeration des Epithelgewebes. Die radiäre Migration der Mykobakterien führt dazu, dass die Epidermis

des Ulkusränder bis zu einigen Zentimetern Tiefe untergraben wird (Portaels *et al.*, 2009).

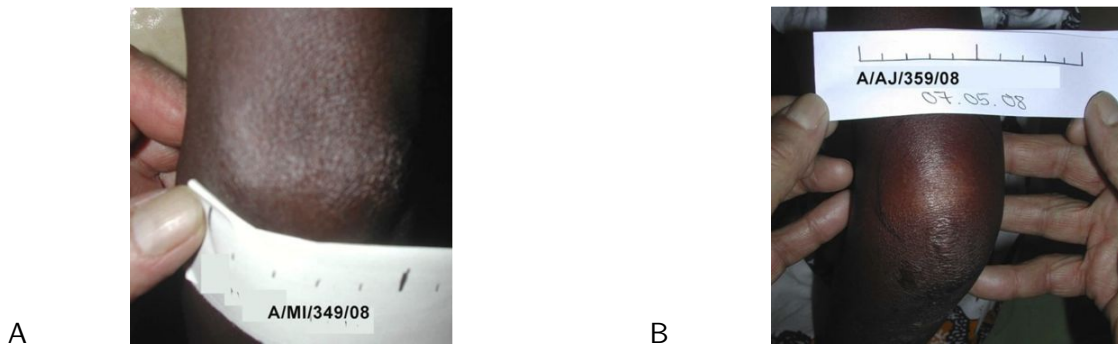


Abbildung 1.4: Präulzeratives Stadium des Buruli Ulkus. Der schmerzfreie Knoten (A) bzw. Plaque (B) in der Subkutis ist die erste klinische Manifestation einer *M. ulcerans*-Infektion (Photos: Karl-Heinz Herbinger).

Das klinische Spektrum des BU reicht von kleinen Ulzera (Abbildung 1.5 B), die spontan und defektlos ausheilen können, bis zu großen Ulzera mit disseminierten Herden (Abbildung 1.5 A). Heilen diese spontan aus, bleibt atrophes Narbengewebe mit Kontrakturen zurück oder es kommt zu persistierenden Hautdefekten. Bestimmte *M. ulcerans*-Stämme, die bei 37° C überleben, können eine Osteomyelitis auslösen. Irreversible Knochendeformitäten und Funktionsverlust von Gelenken sind die Folge (Portaels *et al.*, 2009; Eddyani und Portaels, 2007).



Abbildung 1.5: Unterschiedliche klinische Manifestation des ulzerativen Stadiums des Buruli Ulkus. (A) Der Patient hatte seit 5 Monaten ein offenes Ulkus auf der rechten Brust und wurde seit 19 Tagen antibiotisch behandelt. Es zeigte ein 15×8cm großes Ulkus mit untergrabenen Wundrändern. (A) Diese Patientin war seit 1,5 Monaten im Ulkusstadium und wurde seit 36 Tagen therapiert. Das ausheilende Ulkus des rechten Knies stellte sich mit Hyperpigmentierung des Randsaums dar. (Photos: Karl-Heinz Herbinger).

Von Koinfektionen mit HIV und *M. ulcerans* ist in einigen Fällen berichtet worden, ein gegenseitiger Einfluss auf Krankheitsverlauf oder Therapie konnte nicht gezeigt werden (WHO Asiedu *et al.*, 2000).

1.4 Therapie

Durch das bessere Verständnis der mikrobiologischen Pathomechanismen hat sich die Therapie des Buruli Ulkus in den letzten Jahren grundlegend gewandelt: Jahrelang galt in allen Stadien der Krankheit die großzügige chirurgische Wund-säuberung durch Geweberesektion als die einzige Behandlungsmöglichkeit. Bei schweren Fällen mit Osteomyelitis wurden befallene Gliedmaßen sogar amputiert. Während bei Knoten und Plaques die Therapie mit einer Operation beendet war, mussten große Ulzera durch Hauttransplantation gedeckt werden (Abbildung 1.6). Ho-



Abbildung 1.6: Zustand nach Hauttransplantation nach Buruli Ulkus. Transplantierte Spalthaut an der rechten Schulter eines ghanaischen Jungen (Photo: Karl-Heinz Herbing).

he Rückfallraten (47%) (O'Brien *et al.*, 2007), die die örtlichen Sozialsysteme vielfach überforderten, und lange Krankenhausaufenthalte waren die Folge der operativen Therapie. Im Jahr 2004 hat die WHO die achtwöchige antibiotische Therapie mit Rifampicin (10 mg/kg oral) und Streptomycin (15 mg/kg intramuskulär) als allgemeinen Standard eingeführt. Dadurch konnte nicht nur die Rückfallrate drastisch auf 1,4 % gesenkt werden (Chauty *et al.*, 2007, WHO Asiedu *et al.*, 2000, Schütte und Pluschke, 2009), sondern auch eine wesentliche Größenreduktion der Ulzera erzielt werden. Die medikamentöse Therapie führt zur Reepithelialisierung mit Hyperpigmentierung des Ulkusrandes. Dies ist ein Hinweis auf einen erfolgreichen Heilungsprozess (Abbildung 1.5, B, Schütte *et al.* 2007; Portaels *et al.* 2009). Am wirkungsvollsten ist die antibiotische Therapie, wenn sie bereits im Knotenstadium begonnen wird (Nienhuis *et al.*, 2010). Obwohl diese das Aufbrechen der Epidermis nicht verhindert, bleibt die Krankheit in einem sehr limitierten Stadium. Die geringgradige Ulzeration veranschaulicht, wie wirkungsvoll die frühzeitige antibiotische Therapie ist (vgl. Abbildung 1.5).

Ein kostengünstiges und leicht anwendbares Therapieverfahren stellt die lokale Wärmbehandlung des Ulkus dar. Junghanss *et al.* (2009) haben kommerziell erwerbliche Wärmekissen verwendet, die durch Kristallisation von Natriumacetat Temperaturen von 58 °C erreichen. Nach lokaler Applikation über 28 bis 55 Tage waren die Mykobakterien von der Hitze ausreichend geschädigt, dass es zur Ausheilung des Ulkus kam. Auch 18 Monate nach Behandlungsende wurde kein Rezidiv beobachtet (Junghanss *et al.*, 2009).

Vermutlich stellt die Kombination aus Thermotherapie und antibiotischer Therapie eine optimale Behandlungsmethode dar.

1.5 Sozialmedizinische Bedeutung

Am weitesten verbreitet ist BU in den ländlichen Regionen der Endemiegebiete. Fehlender örtlicher und sozialer Zugang zum professionellen Gesundheitssystem, hohe Behandlungskosten, ein kulturell anderes Krankheitsverständnis, mangelnde Aufklärung und Stigmatisierung durch entstellende Krankheitsbilder sind nur einige der Gründe, warum der erste Weg der BU-Patienten zum traditionellen Heiler und nicht ins Krankenhaus führt. Große Ulzera in fortgeschrittenem Stadium machen die Behandlung im Vergleich zum Anfangsstadium um ein Vielfaches beschwerlicher. Wesentliche Ziele der *Global Buruli Ulcer Initiative* sind die frühest mögliche Erkennung und Behandlung von Buruliknoten. Umfassende Information der Bevölkerung durch ausgebildete Gesundheitshelfer (*village health worker*), Standardisierung der Diagnostik, verbessertes Fallmanagement und Einführung der antibiotischen Therapie konnten bereits zu einer deutlichen Verbesserung beitragen (WHO Asiedu *et al.*, 2000). All dies hat unmittelbare Konsequenzen für die betroffenen Patienten: Besonders im Krankenhaus in Agogo in Ghana hat die Zahl der Patienten mit großen Hautläsionen in erstaunlichem Maße abgenommen. Vielen Kindern wird damit der mit großen finanziellen und seelischen Belastungen für die ganze Familie verbundene Krankenhausaufenthalt erspart.

1.6 Histopathologie

Der klinisch einfach zu beurteilende Verlauf vom präluzerativen zum ulzerativen Stadium des BU kann auch in der histopathologischen Beurteilung voneinander abgegrenzt werden. Das präluzerative Stadium ist durch Koagulationsnekrosen in der Subkutis, Ansammlungen aus extrazellulären säurefesten Stäbchen und geringe Zellinfiltration gekennzeichnet (Walsh *et al.*, 2005). In der pathophysiologischen Entwicklung zum ulzerativen Stadium ist das zentrale Element das Mykolakton. Nimmt die Mykolaktonlast zu, reagieren die Adipozyten des Unterhautfettgewebes mit Apoptose auf das Toxin und werden zu „fetten Zellgeistern“. Im histologischen Präparat befinden sie sich im Randwall des beginnenden Ulkus, also dem Übergang von nekrotischem zu intaktem Hautgewebe. Nach innen hin angrenzend

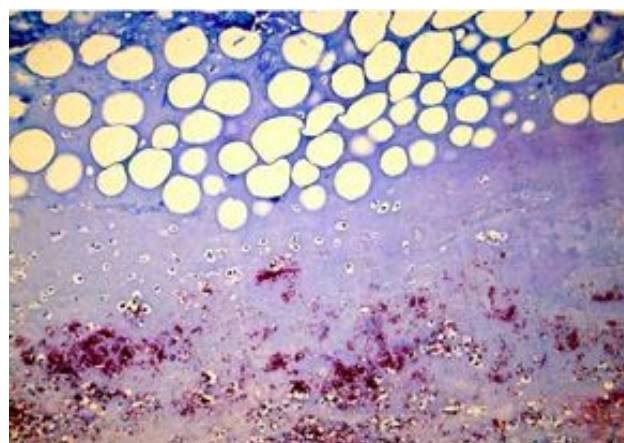


Abbildung 1.7: Histologisches Präparat eines im Subkutis-Niveau geschnittenen Ulkusrandes (Ziehl-Neelsen-Färbung). An die zentrale Nekrose mit in Konglomeraten angeordneten säurefeste Stäbchen (untere Bildhälfte) grenzen tote Adipozyten (obere Bildhälfte) (Portaels *et al.*, 2009).

an die Pakete aus toten Adipozyten bildet sich ein Saum aus Mykobakterien (Abbildung 1.7). Diese wandern von der zentralen Nekrose radiär nach außen, wodurch auch die mykobakterielle Zellmasse

vom Läsionszentrum nach außen kontinuierlich und mit der Krankheitsdauer zunimmt (Portaels *et al.*, 2009; Schütte *et al.*, 2007; Dobos *et al.*, 2001).

Der Heilungsprozess beginnt im Ulkusrand und wird durch die Infiltration weiterer Zellsubpopulationen gekennzeichnet. Dazu gehört die massive T-Zell-Infiltration ins Gewebe, es entstehen follikelartige Strukturen um Blutgefäße und die Bakterienzahl nimmt ab. Ein wesentlicher Unterschied zum Anfangsstadium ist auch die für Mykobakterien typische wiedergewonnene Fähigkeit der intrazellulären Vermehrung und Granulombildung (Abbildung 1.8). Nach der Endozytose durch Gewebsmakrophagen können sie durch Inhibition der zellulären Vesikelreifung der Abtötung entgehen. Im weiteren Verlauf verschmelzen die Makrophagen zu mehrkernigen Riesenzellen, deren Zentrum aus dermalen dendritischen Zellen und aus Langerhanszellen besteht. Ein Saum aus T-Zellen umgibt diesen Komplex, der als Granulom bezeichnet wird. Anders als bei der *M. tuberculosis*-Infektion entsteht keine zentrale Nekrose im Granulom. Diese Veränderungen werden auf die im Zuge der Therapie abnehmende Toxinlast und damit wiedergewonnene Funktion der Phagozyten zurückgeführt (Schütte *et al.*, 2007).

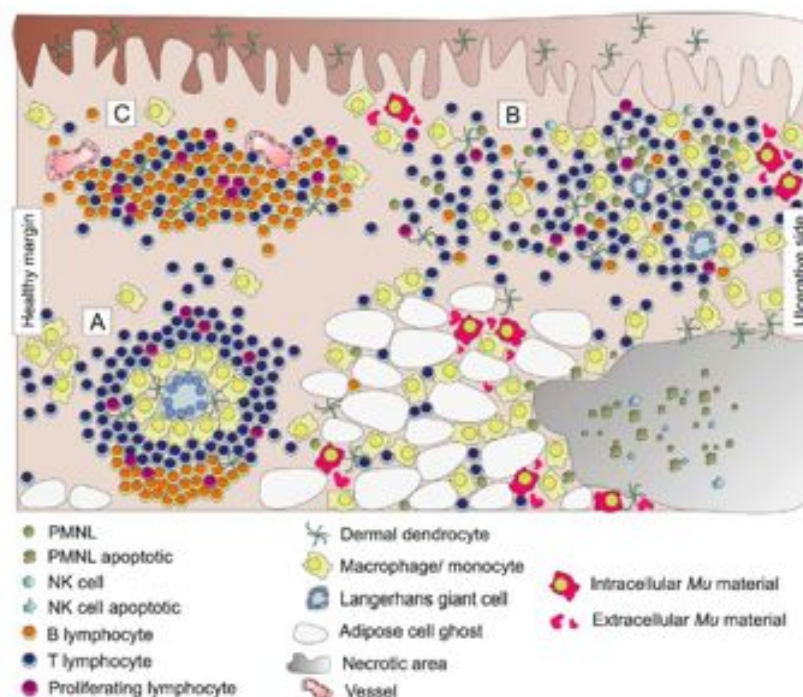


Abbildung 1.8: Schema der Zellinfiltration eines heilenden Ulkusrandes. (A) Granulom: Zusammenschluss von Makrophagen, die zentral von dermalen Dendrozyten und Langerhanszellen, radiär von T- und B-Zellen umsäumt sind. (B) Diffuse heterogene Zellinfiltration aus T-, B-Zellen, Makrophagen, Langerhanszellen, dermalen dendritischen Zellen, polymorphnukleären neutrophilen Leukozyten (PMNL) (apoptotisch und nicht apoptotisch), natürlichen Killerzellen (NK) (apoptotisch und nicht apoptotisch), proliferierenden Lymphozyten, intra- und extrazellulären Mykobakterien. (C) Lymphfollikelähnliche Herde rund um Blutgefäße aus B- und T-Zellen (auch proliferierend) (Schütte *et al.*, 2007).

1.7 Immunologie der *M. ulcerans*-Infektion

Die Abwehr eines mikrobiellen Erregers beginnt mit der angeborenen Immunantwort. Epitheliale Barriere und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) verhindern das Eindringen des Erregers in Gewebe und Blutbahn. Diese Reaktion ist schnell und unspezifisch. Überwindet ein Erreger die Mechanismen der angeborenen Immunantwort, gelangt dieser mit dem Lymphabfluss in die lymphatischen Organe. Dort bildet sich innerhalb weniger Tage die adaptive Immunantwort aus. Diese setzt sich aus einer humoralen und einer zell-vermittelten Komponente zusammen. Die humorale Immunantwort basiert auf von B-Zellen sezernierten Antikörpern, die zunächst bestimmte Komponenten wie Polysaccharide, Lipide oder Proteine von extrazellulären Erregern binden und zur Neutralisierung und Phagozytose des Erregers führen. Die zell-vermittelte Immunantwort besteht aus zytotoxischen CD8⁺T-Zellen und CD4⁺T-Helferzellen. Jede kernhaltige Zelle präsentiert endogene, an MHC I-Molekülen gebundene Peptide auf der Zelloberfläche. Dabei handelt es sich um Spaltprodukte des zelleigenen Proteasoms, damit die Proteinbiosynthese jeder Zelle durch das Immunsystem kontrolliert wird. Die zytotoxischen CD8⁺T-Zellen erkennen zellfremde Peptide über solche Peptid-MHC I-Molekül-Komplexe und eliminieren die infizierte Zelle. Nutzt ein Erreger nicht den zelleigenen Proteinbiosyntheseapparat, sondern wird durch antigenpräsentierende Zellen (APC) als Endosom aufgenommen, initiieren die APC Erkennung und Elimination dieses Antigens. APC besitzen zusätzlich zum MHC I-Rezeptor einen MHC II-Rezeptor, an den exogene, lysosomal prozessierte Peptide gebunden und auf der Oberfläche präsentiert werden. Über den T-Zell-Rezeptor (TCR) wird dieser Komplex von CD4⁺T-Helferzellen erkannt.

Bei den CD4⁺T-Helferzellen werden Th₁-Zellen von Th₂-Zellen unterschieden. Th₁-Zellen sind an der zellulären Immunantwort beteiligt, indem sie Makrophagen aktivieren. Neben der initialen Antigenpräsentation und massiver Zytokinproduktion ist eine wesentliche Funktion der Makrophagen die Phagozytose intrazellulärer Erreger, wie zum Beispiel von *M. tuberculosis*. Aktivierte Th₂-Zellen dagegen führen zur humoralen Immunantwort. Sie stimulieren B-Zellen zur Sekretion und Produktion von Antikörpern, die gegen die gleichen extrazellulären Proteine gerichtet sind, die zuvor von der B-Zelle prozessiert wurden. Durch Umgehung der genannten Abwehrmechanismen führt *M. ulcerans* zur Infektion. Zunächst überwindet *M. ulcerans* über einen Epitheldefekt die epitheliale Barriere und gelangt in die Subkutis. Das dort sezernierte immunsuppressive Mykolakton verteilt sich diffus im subkutanen Gewebe und verhindert die Phagozytose des Erregers durch APC, NK-Zellen und Makrophagen (Oliveira *et al.*, 2005; Adusumilli *et al.*, 2005). Infolge dessen bleiben die angeborene Immunantwort und ein rechtzeitiger Beginn der adaptiven Immunantwort aus.

Die systemische Immunantwort

Der morphologische, auf solitäre oder multiple Ulzera beschränkte Befund charakterisiert das BU als eine auf lokalisierte Pathomechanismen beschränkte Erkrankung. Dennoch bilden die meisten BU-Patienten im Laufe der Zeit auch eine erfolgreiche systemische Immunantwort aus (Portaels

et al., 2009). Diese beginnt mit der Erkennung von *M. ulcerans* durch APC. Dazu gehören neben den erwähnten Makrophagen und B-Zellen auch dendritische Zellen (DC), die sich in inneren und äußeren Epithelien des Körpers befinden. In der Haut werden sie Langerhanszellen genannt. Durch inflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ beginnt die DC zu reifen und migriert in den nächstgelegenen Lymphknoten. Dorthin rezirkulieren ebenfalls die naiven CD4^+ -T-Zellen, da sie auf der Zelloberfläche den Chemokinrezeptor CCR7 exprimieren, der sie zum Eintritt in die lymphatischen Organe befähigt. Im Lymphknoten findet die Antigenpräsentation auf der Oberfläche der DC und die Erkennung des Antigens durch die entsprechende naive CD4^+ -T-Zelle statt. Dadurch wird diese zur Effektor T-Zelle aktiviert und exprimiert anstelle des CCR7-Rezeptors verschiedene Integrine, die die sofortige Infiltration in das entzündete Gewebe ermöglichen. Sezerniert die DC IL-12, findet eine Differenzierung der Effektor CD4^+ -T-Zellen in die proinflammatorischen CD4^+ - Th_1 -Zellen statt. Ohne den Stimulus IL-12 kommt es zur Differenzierung in antiinflammatorische CD4^+ - Th_2 -Zellen. Des Weiteren ist eine dritte CD4^+ -T-Helferzellpopulation in die adaptive zelluläre Immunantwort involviert. IL-1, IL-6 und IL-23, sezerniert von Makrophagen und DC, lösen die Differenzierung in die CD4^+ - Th_{17} -Zellen aus. Diese sind durch Sekretion von IL-17 und IL-22 ebenfalls an der proinflammatorischen Immunantwort gegen bakterielle Antigene beteiligt. Die das entzündete Gewebe infiltrierende *M. ulcerans*-spezifische CD4^+ - Th_1 -Zelle erkennt das entsprechende auf Gewebsmakrophagen präsentierte Antigen und aktiviert durch die Produktion von $\text{IFN}\gamma$ die Makrophagen. Dies löst die Abtötung der phagozytierten Mikroorganismen aus und bewirkt die verstärkte Expression von MHC-Molekülen sowie verschiedenen Zytokinen wie GM-CSF und $\text{TNF}\alpha$. GM-CSF führt zur Differenzierung von Monozyten in dendritische Zellen und fördert die Rekrutierung von Monozyten aus dem Knochenmark. $\text{TNF}\alpha$ ermöglicht u.a. durch Endothelaktivierung die Zellmigration neutrophiler Granulozyten und weiterer Monozyten. Gleichzeitig sezernieren CD4^+ - Th_1 -Zellen IL-2, das die Autoproliferation und die Differenzierung von CD4^+ -Zellen fördert. Unter den proinflammatorischen Zytokinen spielt $\text{IFN}\gamma$ eine Schlüsselrolle im Th_1/Th_2 -Wechselspiel, indem es die Differenzierung einer T-Helferzelle zur Th_2 -Zelle und damit die antiinflammatorische Immunantwort inhibiert. (Prévot et al., 2004; Phillips et al., 2006a,b). Fehlt hingegen eine starke $\text{IFN}\gamma$ -Antwort, so kommt es über die Präsentation von prozessierten Antigenen auf MHC II-Molekülen der B-Zelle zur erfolgreichen Interaktion einer CD4^+ - Th_2 -Zelle mit entsprechender B-Zelle. Das für die Th_2 -Antwort charakteristische antiinflammatorische Zytokinmilieu aus IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 bewirkt nicht nur die Aktivierung und weitere Ausdifferenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen, sondern stimuliert auch Mastzellen, eosinophile und basophile Granulozyten. IL-10 ist als antiinflammatorisches Zytokin der Gegenspieler zum proinflammatorischen Zytokin $\text{IFN}\gamma$, da es die Makrophagenaktivierung und damit die Ausbildung einer Th_1 -Antwort hemmt.

Patienten mit BU bilden die Immunantwort abhängig vom Krankheitsstadium aus. Zu Beginn der *M. ulcerans*-Infektion kommt es noch zu einer starken, systemischen Th_1 -Antwort. Im ulzerativen Stadium hingegen scheint eine systemische Th_2 -Antwort vorherrschend zu sein. Aufgrund der durch das Mykolakton gestörten angeborenen Immunantwort bleibt eine starke IL-12- und $\text{IFN}\gamma$ -Expression aus und die antiinflammatorische Immunantwort überwiegt (Schütte und Pluschke, 2009). Der erfolg-

reiche Heilungsprozess ist wiederum mit einer proinflammatorischen Abwehr assoziiert worden (Prévot *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2006a; Westenbrink *et al.*, 2005; Schipper *et al.*, 2007).

Die humorale Immunantwort wurde bisher wenig untersucht, da die erfolgreiche Immunantwort mit der Internalisierung in Makrophagen und damit einer zell-vermittelten Immunantwort verbunden ist. Dennoch wurden im Serum von BU-Patienten spezifische Antikörper gegen das mykobakterielle, stark immunogene Zellwand-Hitzeschockprotein sHsp 18 gefunden. Nicht erkrankte Haushaltskontakte wiesen zwar ähnlich hohe Serumspiegel auf, bei Kontrollen aus nicht-endemischen Gebieten konnten allerdings keine sHsp 18-Antikörper gemessen werden (Diaz *et al.*, 2006). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weswegen einige Krankheitsverläufe nicht über das Knotenstadium hinausgehen oder einige im Endemiegebiet lebende Menschen nie erkranken (Schütte und Pluschke, 2009).

Nach Ablauf der akuten Immunantwort bildet sich eine weitere T-Zell-Subpopulation, die Gedächtnis-T-Zellen. Diese exprimieren CD45RO statt CD45RA auf der Zellmembran, das ihnen im Falle der Restimulation eine schnellere Interaktion mit dem passenden Antigen ermöglicht. Am schnellsten können unter den Gedächtnis-T-Zellen die Effektor-Gedächtnis-T-Zellen reagieren, da sie nicht den CCR7-Rezeptor tragen und sich bereits außerhalb der lymphatischen Organe befinden. In unmittelbarer Folge werden die zentralen Gedächtnis-T-Zellen aktiviert. Sie tragen den CCR7-Rezeptor, um - ähnlich wie naive T-Zellen - durch die lymphatischen Organe zu zirkulieren. Nach Aktivierung durch die DC mit dem passenden Antigen migrieren sie als Effektor-Gedächtnis-T-Zellen an den Ort der Entzündung. Auch bei Patienten mit ausgeheilten Ulzera ist eine starke persistierende IFN γ -Expression zu beobachten, was die Hypothese der erfolgreichen Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses unterstützt (Phillips *et al.*, 2006a; Schipper *et al.*, 2007).

Die lokale Immunantwort

Der ständige Antigenkontakt im Ulkusrand bewirkt nicht nur die Ausbildung einer systemischen adaptiven Immunantwort, sondern auch die lokale Infiltration von Zellen des adaptiven Immunsystems. Die Antigenerkennung und Aktivierung von naiven T-Zellen im Lymphknoten führt zu klonaler Expansion mit Infiltration der Effektor-T-Zellen an den Ort der Entzündung. Dabei ist die Konzipierung des TCR die entscheidende Schnittstelle beim Übergang von angeborener in die adaptive Immunantwort. Der TCR ist ein Heterodimer aus zwei Untereinheiten, wobei meist die Kombination $\alpha\beta$, weniger häufig $\gamma\delta$ auftritt. Jede Kette enthält jeweils eine konstante (C) und eine variable (V) Region. Dabei setzt sich die V-Region der α -Untereinheit aus einem V (*variable*)- und J (*joining*)-Segment zusammen, die V-Region der β -Untereinheit besitzt zusätzlich noch ein D (*diversifying*)-Segment. Während der T-Zellreifung kommt es zu somatischer Rekombination aus V(D)J-Segmenten, so dass jede T-Zelle einen anderen hypervariablen *complementary determining region* Bereich, die CDR 3-Region, aufweist. Über diesen Bereich erfolgt die Antigenerkennung der auf MHC II-Molekülen präsentierten Antigene durch die spezifische T-Helferzelle. Diese löst gezielt die klonale Expansion eben dieser T-Zelle aus. Wie selektiv dieser Mechanismus ist, zeigt die Analyse der variablen Region der β -Kette (BV) des

TCR. Handelt es sich um eine multiklonale Expansion, ist ein breites TCR-BV-Repertoire zu finden. Handelt es sich dagegen um eine oligo- oder monoklonale Expansion, sind nur wenige bzw. ist nur eine BV-Kette angereichert. Wie geartet das TCR-BV-Ketten -Spektrum im Zuge der Abwehr von *M. ulcerans* ist, wurde noch nicht untersucht.

Zusätzlich gibt das Zytokinprofil Aufschluss über den Status der lokalen Immunantwort: Das Wechselspiel pro- und antiinflammatorischer Zytokine wurde mehrfach untersucht. Zwei wesentliche Beobachtungen scheinen evident zu sein: Im prä-ulzerativen Knotenstadium ist die IFN γ -Produktion höher als die IL-10-Produktion, während sich das Verhältnis im Ulkusstadium umkehrt (Prévot *et al.*, 2004). Granulomatöse Formationen gehen mit der Expression von viel IFN γ und wenig IL-10 einher (Kiszewski *et al.*, 2006; Schipper *et al.*, 2007).

Immunmodulation durch Mykolakton und Antibiotikatherapie

Im oft langwierigen Verlauf der *M. ulcerans*-Infektion verändert sich der Typ der Immunantwort. Diese setzt oft erst sehr spät ein und ist von Patient zu Patient sehr verschieden, was vermuten lässt, dass noch weitere Faktoren eine Rolle spielen. Demangel *et al.* (2009) haben ein Modell vorgeschlagen, welches eine Erklärung der deutlich veränderten und verzögerten Immunantwort bietet (Abbildung 1.9). Bei einer Infektion ist die IFN γ -Expression der infizierten Phagozyten für eine proinflammatorische Immunantwort entscheidend. Die massive Toxinproduktion der proliferierenden Mykobakterien verhindert ihre Phagozytose und damit die Induktion einer Th₁-Antwort. Zwar wirkt das Mykolakton aus *M. ulcerans* nur in hohen Konzentrationen zytotoxisch auf dendritische Zellen und infiltrierende T-Zellen, dennoch bleiben humorale und weitere adaptive Immunantwort aus. Dieser Effekt soll auf eine systemische Immunmodulation zurückzuführen sein, die zur Anergie von dendritischen Zellen und T-Zellen führt (Demangel *et al.*, 2009). Gestützt wird diese Hypothese durch Beobachtungen bei antibiotisch behandelten Patienten: So sehen Schütte und Pluschke (2009) bereits nach zwei Wochen antibiotischer Therapie eine Internalisierung der Mykobakterien durch Makrophagen. Am Ende der vierten

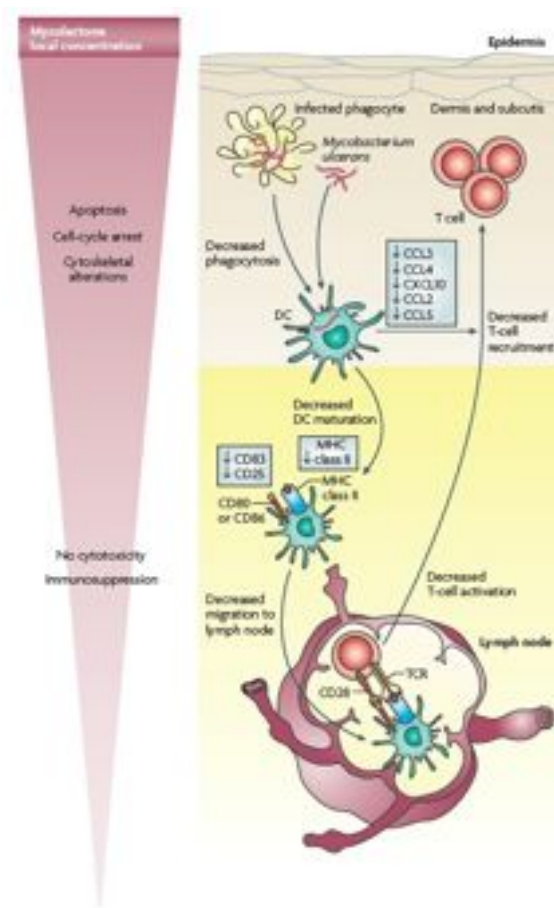


Abbildung 1.9: Modell des zytotoxischen und apoptotischen Effekts des Mykolaktons auf das Immunsystem (Demangel *et al.*, 2009)

Therapiewoche sind diese vollständig abgetötet und nur noch Reste von säurefesten Stäbchen innerhalb des nekrotischen Gewebes umrandet von massiven Zellinfiltraten zu finden. Nach achtwöchiger Antibiotikatherapie besteht der Ulkusrand aus Herden von dermalen dendritischen Zellen, antigenpräsentierenden Zellen, B- und T-Zellen, sowie organisierten granulomatösen Strukturen. Die ohne antibiotische Behandlung erst nach Monaten einsetzende spezifische Immunantwort gegen *M. ulcerans* ist auf diese Weise bereits nach 8 Wochen vollständig ausgebildet. Schütte und Pluschke (2009) vermuten hier eine Interaktion zwischen Antibiotikum und Mykolaktonproduktion im bakteriellen Metabolismus. Denn ohne das Toxin gelingt dem Immunsystem die - bei mykobakteriellen Infektionen typische - Internalisierung des Erregers durch Makrophagen und erfolgreiche Granulombildung.

1.8 Projekt und Arbeitshypothesen

Es ist bekannt, dass die meisten BU-Patienten erst im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf eine erfolgreiche Th₁-Zell-vermittelte Immunantwort gegen *M. ulcerans* ausbilden. Trotz hoher Kreuzreaktivitäten nach Infektionen mit atypischen Mykobakterien der Umwelt oder nach Impfung mit BCG-Impfstoff wird eine antigenspezifische Immunantwort vermutet. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der systemischen Immunantwort und deren Abhängigkeit von klinischen Parametern wie der antibiotischen Therapie.

Des Weiteren ist bisher wenig über das lokale Expansionsmuster der antigenspezifischen T-Zellen im Ulkusrand geforscht worden. Im zweiten Teil soll die Analyse des TCR-BV-Ketten-Repertoires in verschiedenen Zonen des Ulkusrandes behandelt werden. Die funktionellen Tests sollen klären, durch welches Zytokinexpressionsmuster sich die lokalen T-Zellen auszeichnen und inwiefern sie sich von T-Zellen des peripheren Blutes unterscheiden.

Dazu sollen von Burulipatienten aus der Ashanti Region in Ghana (Agogo, Dunkwa und Apromasi) Blut- und Hautgewebeproben entnommen werden, am *Kumasi Centre for Collaborative Research* (KCCR) für den Stickstofftransport vorbereitet und am *Bernhard-Nocht-Institut* (BNI) zur endgültigen Analyse aufgearbeitet werden. Dies beinhaltet die PBMC-Isolation aus Vollblut, deren Stimulation, Fixierung und intrazelluläre Färbung mit anschließender Messung der Zytokinexpressionsstärken im Durchflusszytometer. Aus im Rahmen einer operativen Wundsäuberung vom Ulkusrand entnommenem Hautgewebe sollen durch die Inkubation in IL-2 T-Zell-Linien generiert und wie die PBMC untersucht werden. Zusätzlich soll RNA aus Hautgewebe isoliert und eine qPCR-Methode etabliert werden. Anhand von 29 verschiedenen TCR-BV-Ketten soll das klonale Verteilungsmuster in einzelnen Zonen des Ulkusrandes, in TCL und im peripheren Blut erfasst werden. Damit kann analysiert werden, in welchen Kompartimenten des Körpers sich antigenspezifische T-Zell-Klone einer bestimmten TCR-BV-Kette anreichern.

2 MATERIAL, PATIENTENKOLLEKTIV, METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Instrumente

Corbett Research Rotor-Gene 6000

Qiagen, Hilden

LSR II

BD Biosciences, Heidelberg

2.1.2 Materialien zur Probengewinnung

S-Monovette[®] NH₄-Heparin, 5,5 ml

Sarstedt, Nümbrecht

Multifly[®]-Kanüle

Sarstedt, Nümbrecht

Xylocain[®]- 2% Injektionslösung (Wirkstoff: Lidocain)

Astrazeneca GmbH, Wedel

2.1.3 Molekularbiologische Materialien

Cybr-Green

Applied BioSystem, Darmstadt

dNTP _ 18bp (Lösung)

Fermentas, St. Leon-Rot

GeneRuler[™] 100bp Plus DNA Ladder

Fermentas, St. Leon-Rot

Hot Star Taq DNA Polymerase 1000 units Kit

Qiagen, Hilden

Oligo-Primer (DT)

Roche, Mannheim

RNeasy mini Kit

Qiagen, Hilden

Superscript II Reverse Transkriptase

Invitrogen, Karlsruhe

Trizol Reagent

Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Zellbiologische Materialien

Biocoll-Lösung

Biochrom AG, Berlin

Brefeldin A (1 mg/ml gelöst in 99 % igem Ethanol)

Sigma, Hamburg

DPBS

PanBiotech GMBH, Aidenbach

Cytofix/Cytoperm TM -Lösung	BD Pharmingen, Heidelberg
DMSO	Sigma, Deisenhofen
EDTA-Lösung (2mM)	Roth, Karlsruhe
FCS	Seromed, Berlin
Gentamycin	PAA, Linz, Österreich
HEPES	PAA, Linz, Österreich
Humanserum	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Gripco Invitrogen GmbH, Kalsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA, Linz
Perm/Wash TM - Lösung	BD Pharmingen, Heidelberg
RPMI 1640-Kulturmedium ohne L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Trypanblau	Serva Feinbiochemika, Heidelberg

2.1.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotid-Primer wurden von MWG Biotech AG, Ebersberg synthetisiert. Für das TCR-BV-Ketten-Repertoire wurden die Sequenzen modifiziert nach Walters und Alexander (2004) verwendet. Die übrigen Primersequenzen wurden anhand der mRNA-Referenzsequenzen aus der NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) - Datenbank konstruiert:

Primer	Sequenz (5' → 3')
BV 2	GAAATCTCAGAGAAGTCTGAAATATTCG
BV 3-1	CCTAAATCTCCAGACAAAGCTCACT
BV 4	CCTGAATGCCCAACAGC
BV 5-3	ACCTGATCAAAACGAGAGGACAG
BV 6	CTCTCCTGTGGGCAGGTCC
BV 7-2	GTTTTTAATTTACTTCCAAGGCAACA
BV 7-3	CAAGGCACGGGTGCG
BV 7-6	ACTTACTTCAATTATGAAGCCCAACA
BV 7-7	GAGTCATGCAACCCTTTATTGGTAT
BV 7-8	AGGGGCCAGAGTTTCTGACTTAT
BV 7-9	CTCAACTAGAAAAATCAAGGCTGCT
BV 9	AACAGTTCCTGACTTGCACTCT
BV 10-1	TTCTTCTATGTGGCCCTTTGTCT
BV 11-2	GGCTCAAAGGAGTAGACTCCACTCT
BV 12-3	GGTGACAGAGATGGGACAAGAAGT
BV 13	CATCTGATCAAAGAAAAGAGGGAAAC

Primer	Sequenz (5' → 3')
BV 14	AGAGTCTAAACAGGATGAGTCCGGTAT
BV 15	CCAGGTTACCCAGTTTGGAAAG
BV 16	AAACAGGTATGCCCAAGGAAAGA
BV 18	CAGCCCAATGAAAGGACACAGT
BV 19	GGGCAAGGGCTGAGATTGAT
BV 20-1	AACCATGCAAGCCTGACCTT
BV 23-1	TGTACCCCCGAAAAGGACATAC
BV 24-1	CAGTGTCTCTCGACAGGCACA
BV 25-1	CTCAAACCATGGGCCATGA
BV 27	CCAGAACCCAAGATACCTCATCAC
BV 28	GGCTACGGCTGATCTATTTCTCA
BV 29-1	GACGATCCAGTGTCAAGTCGATAG
BV 30	CTGAGGTGCCCCAGAATCTCT
BC for BV	CTGCTTCTGATGGCTCAAACA
BC fw	TCCAGTTCTACGGGCTCTCG
BC rv	AGGATGGTGGCAGACAGGAC
GC fw	GTTTCCCCAAGCCCACTA
GC rv	CAGCCTTCTGGAGCTTTGTTTC
DC fw	TTGCAGGAAGTCAGCCTCATAC
DC rv	CGACATTTGTTCCATTTTTCATG
CD4 fw	GTCCCTTGCCCAAGTTCCA
CD4 rv	TGAGAGCCGTGTGGCATT
CD8 fw	TCCTCACCTGAGCGACTTC
CD8 rv	TCAGGGCCGAGCAGAAATAG
CD25 fw	CCAGCTCAGTCCCATCAGAGA
CD25 rv	TTCAACGGCGAAATTGCTATT
CD69 fw	TGCCACCAGTCCCCATTT
CD69 rv	ACAGGACAGGAACTTGGAAGGA
foxp3 fw	CACCTGGCTGGGAAAATGG
foxp3 rv	GGAGCCCTTGTCGGATGAT
RORC fw	CGGGCCTACAATGCTGACA
RORC rv	GCCACCGTATTTGCCTTCAA
T-bet fw	CCCGGGACCACAGCTATG
T-bet rv	GCAAGAATGCAGGCTTCATG
GATA3 fw	GAGCCTGGCTCGCAGAATT
GATA3 rv	AAACGGGACCAGTTGTAAAAA
GAPDH fw	TGCACCACCAACTGCTTAGC

Primer	Sequenz (5' → 3')
GAPDH rv	GGAAGGCCATGCCAGTGA
GUS-b fw	CCCGGCCTGTGACCTTT
GUS-b rv	CATACGGAGCCCCCTTGTCT

2.1.6 Puffer und Stammlösungen

FACS-Puffer

PBS
5 % FCS

Medium A

RPMI 1640
5 % HS
1 % Penicillin/Streptomycin
1 % L-Glutamin
1 % Hapes (1 M)

TCL Medium

RPMI 1640
100 U IL-2
10 % HS

Zellmedium

RPMI 1640
5 % HS
1 % Penicillin/Streptomycin
0,5 % Gentamicin

Einfrierlösung (ex-vivo-Zellen)

80 % FCS
20 % DMSO

50x TBE-Puffer

4,45 M Tris Base
4,45 M Borsäure
0,1 M EDTA-Na₂
ad 1 l H₂O
pH auf 8,0 einstellen

Einfrierlösung (fixierte Zellen)

60 % Perm/WashTM-Lösung
20 % DMSO
20 % FCS

2.1.7 Stimulationsreagentien

Ionomycin

Sigma-Aldrich, München

M. tuberculosis-H37Rv Lysat

Mykobakteriumreferenzzentrum Borstel

M. ulcerans-Lysat

Mykobakteriumreferenzzentrum Borstel

PHA

Invitrogen, Carlsbad

PMA	Sigma-Aldrich, München
PPDtub	Staten Serum Institut, Kopenhagen
PPDsens	Staten Serum Institut, Kopenhagen
SEB	Sigma, Steinheim

2.1.8 Antikörper

Folgende Antikörper wurden zur Färbung von Zelloberflächenproteinen und intrazellulären Zytokinen bzw. Transkriptionsfaktoren verwendet:

Antikörper	Fluoreszenz	Klon	Firma
CD3 (Maus-anti-human)	PerCP	SK7	BD Biosciences (Heidelberg)
CD4 (Maus-anti-human)	APC Cy-7	RPA-T4	BD Biosciences (Heidelberg)
CD8 (Maus-anti-human)	PerCP Cy 5.5	SK1	BD Biosciences (Heidelberg)
CD25 (Maus-anti-human)	PE Cy-7	2A3	BD Biosciences (Heidelberg)
CD45RA (Maus-anti-human)	Pacific Blue	HI100	BioLegend (San Diego, USA)
CD69 (Maus-anti-human)	APC	FN50	BD Biosciences (Heidelberg)
CD197 (CCR7) (Ratte-anti-human)	PE Cy7	3D12	BD Biosciences (Heidelberg)
TNF α (Maus-anti-human)	Alexa Fluor 700	MAb11	BD Biosciences (Heidelberg)
IFN γ (Maus-anti-human)	FITC	4S.B3	BD Biosciences (Heidelberg)
IFN γ (Maus-anti-human)	APC	25723.11	BD Biosciences (Heidelberg)
GM-CSF (Ratte-anti-human)	PE	BVD2-21C11	BD Biosciences (Heidelberg)
TGF β (Maus-anti-human)	PE	IQP-169R	IQ-Products (Groningen, Niederlande)
IL-2 (Maus-anti-human)	APC	N.48A	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
IL-2 (Ratte-anti-human)	PE	MQ1-17H12	BD Biosciences (Heidelberg)
IL-3 (Ratte-anti-human)	PE	BVD3-1F9	BD Biosciences (Heidelberg)
IL-4 (Ratte-anti-human)	PE	MP4-25D2	BD Biosciences (Heidelberg)
IL-5 (Ratte-anti-human)	PE	JES1-39D10	BD Biosciences (Heidelberg)
IL-10 (Ratte-anti-human)	PE	JES3-19F1	BD Biosciences (Heidelberg)
IL-17 (Maus-anti-human)	Alexa Fluor 647	eBio64DEC17	eBiosciences (San Diego, USA)
IL-22 (Maus-anti-human)	PE	142928	R&D Systems (Minneapolis, USA)
foxp3 (Maus-anti-human)	Alexa Fluor 647	259D/C7	BD Biosciences (Heidelberg)
BV 5 (Maus-anti-human)	PE	IMMU157	Immunotech-coulter (Miami, Florida)
BV 20 (Maus-anti-human)	FITC	MPB2D5	Beckman Coulter (Krefeld)

2.1.9 Computerprogramme

FCS Express	De Novo Software, Los Angeles
Graph Pad Prism	GraphPad Software, La Jolla
Sigma-Plot	Systat Software, Erkrath

2.2 Studiendesign und Patientenkollektiv

2.2.1 Rahmenbedingungen und Ethikantrag

Diese Studie behandelt einen Teil des BURULICO-Projektes (PL 015476) der EU und wurde mit Zustimmung der ghanaischen Ethikkommission durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Kooperationspartner 7, der Ludwig-Maximilians-Universität München – Abteilung für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin, erfolgte die Rekrutierung eines gemeinsamen Patientenkollektivs. Von ihnen war im Rahmen der diagnostischen Studie eine Datenbank erstellt worden, in der die anhand der Formbögen auf S. 63 und S. 64 erhobenen Daten anonymisiert gespeichert wurden.

Die Patienten wurden über die Vorgehensweise und den Zweck der Probenentnahme in ihrer Muttersprache aufgeklärt und gaben mittels Unterschrift oder Fingerabdruck ihr Einverständnis. Bei Minderjährigen erfolgte die Einwilligung durch die Eltern (siehe Aufklärungsbogen auf S. 65 und Einverständniserklärung auf S. 66).

2.2.2 Rekrutierung des Patientenkollektivs

Es wurden Patienten aus drei verschiedenen Krankenhäusern der Ashanti Region in Ghana, dem *Agogo Presbyterian Hospital*, dem *St. Mark Hospital Dunkwa* und dem örtlichen Krankenhaus in Apromasi, in die Studie einbezogen. Dabei handelte es sich hauptsächlich um ambulante Patienten, die größtenteils von den Gesundheitshelfern (*village health workers*) der ländlichen Umgebung mit Verdacht auf Buruli Ulkus antibiotisch anbehandelt worden waren. Daneben wurden auch einige stationäre Patienten, deren Ulkusränder unter Vollnarkose operativ gesäubert wurden, in das Patientenkollektiv aufgenommen. Bei der Vorstellung der BU-Patienten in den genannten Krankenhäusern erfolgte die endgültige Diagnostik einer *M. ulcerans*-Infektion. Im Rahmen der Diagnostikstudie von Kooperationspartner 7 wurden Wattestäbchenabstrich, Feinnadelaspirat und Gewebestanze des Ulkusrandes auf den Erreger *M. ulcerans* hin untersucht. Der PCR-Nachweis der Sequenz IS2404 in mindestens einer der diagnostischen Proben galt als sicherer Beweis der Infektion. Diese wurde am *Centre of Collaborative Research Kumasi* (KCCR) durchgeführt, dokumentiert und in die Datenbank eingetragen. Die vorliegende Arbeit beruft sich auf die Ergebnisse der diagnostischen Studie.

Von allen rekrutierten Patienten wurden für die immunologische Studie zusätzlich 9 ml Blut aus Arm- bzw. Handvene, von den ambulanten Patienten eine Gewebestanze (3x3mm) des Ulkusrandes unter

Lokalanästhesie und von den stationären/operierten Patienten die unter Vollnarkose gesäuberten Wundränder verwendet.

2.2.2.1 Insgesamte Probenbilanz

In der Zeit vom 29. April bis zum 29. Mai 2008 wurden 43 Patienten (Burulipatienten + Kontrollgruppe) für die immunologische Studie rekrutiert. Dabei wurden alle Patienten aufgenommen, die sich klinisch mit einem Hautulkus präsentierten. Die Sensivität der Diagnostik betrug 94 % (Herbinger *et al.*, 2009). Blieb die PCR in allen drei Probenmaterialien negativ konnte ein BU ausgeschlossen werden. Diese Patienten wurden daher in die Kontrollgruppe aufgenommen (5 von 37). Zusätzlich wurden weitere klinische Parameter mit möglichem Einfluss auf die Immunantwort notiert. Dazu zählte der Impfstatus mit Bacille Calmette-Guérin (BCG)-Impfstoff. Eine vernarbte intrakutane Einstichstelle galt als Kriterium für die Geimpften (BCG+), während die Gruppe der nicht Geimpften (BCG-) dies nicht aufwies. Bei zwei Patienten war die Haut, an der eine Impfnarbe hätte gefunden werden müssen, durch das Ulkus zerstört, so dass die Frage der Vakzinierung in diesen Fällen nicht geklärt werden konnte. Des Weiteren wurden die BU-Patienten nach dem klinischen Stadium des Buruli Ulkus eingeteilt. Die intakte Epidermis mit tastbarem Knoten oder Plaque wurde von den offenen Hautulzera unterschieden. Es wurde notiert, welche Art und Menge an Probenmaterial verwendet wurde: Blut, Hautgewebe als Gewebestanze oder Hautgewebe als operativ entfernter Wundrand.

Tabelle 2.1: Übersicht über das Patientenkollektiv. Burulipatienten und Kontrollen sind in Untergruppen je nach Vakzinierung, Art der Wunde und Art der entnommenen und weiterverarbeiteten Probe eingeteilt; Zahlen geben die Größe des Patientenkollektivs an.

	Burulipatienten (n = 32)		Kontrollgruppe (n = 11)	
Vakzinierung (Vak)	BCG-	14	BCG-	4
	BCG+	16	BCG+	7
	nicht bekannt (?)	2		
Art der Wunde	Knoten (K)	1		
	Plaque (P)	3		
	Ulkus (U)	28		
Art der Probe	Blut	31	Blut	11
	Hautgewebe (Gewebsstanze)	22		
	Hautgewebe (operativ entfernter Wundrand)	3		

2.2.2.2 Individuelle Probenbilanz

Aus welchen individuellen Daten sich die insgesamt Probenbilanz zusammensetzt, kann der folgenden Tabelle entnommen werden (siehe Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Detaillierte Auflistung des anonymisierten Patientenkollektivs. Jeder Wundnummer (**Nr**) ist die **Patienten-ID** der Datenbank, das **Alter**, die **Diagnose** (+: positives PCR-Ergebnis, -: negatives PCR-Ergebnis, versehen mit der in der Datenbank verwendeten Nomenklatur für die Methodik der Diagnostik f: *fine needle aspiration*, s: *swab*, p: *punch*, t: *tissue surgery*), die **Vakzinierung** (ja: BCG-Narbe vorhanden, nein: BCG-Narbe nicht vorhanden), die Art der **Wunde** (U: Ulkus, P: Plaque, K: Knoten), die Krankheitsdauer (**KD**) in Wochen (Wo.), Monaten (Mo.) oder Jahren (J.), die antibiotische Therapie nach WHO-Schema (**Th**) in Tagen und die Art der entnommenen **Probe** zugeordnet (B: Blut, GS: Gewebsstanze, OP: operative Wundsäuberung).

Nr	Patienten-ID	Alter	Diagnose	Vak	Wunde	KD	Th	Proben
D1	D/YS/145/08	53	- (all)	ja	U (21/63)	1,5 Mo.	26	B (1 ml)
D2	D/JQ/146/08	75	+ (s)	nein	U (70/100)	23 J.	39	B (6 ml), GS
D3	D/AK/147/08	35	+ (p)	nein	U (40/45)	1 Mo.	8	B (3 ml), GS
D4	D/KA/148/08	70	+ (s/f)	nein	U (60/45)	6 J.	38	B (10 ml), GS
D5	D/KA/149/08		+ (s)	nein	U (80/60)			
D6	D/EA/150/08	35	+ (s)	ja	U (160/90)	6 Mo.	54	B (9 ml), GS
D7	D/DN/151/08	41	- (all)	ja	U (160/280)	6 Mo.	56	B (5 ml), GS
D8	D/PA/152/08	21	+ (s)	ja	U (130/80)	1,5 J.	56	B (5 ml), GS
D9	D/GY/159/08	8	+ (s)	ja	U (130/140)	5 Mo.	56	GS
D10	D/AD/153/08	10	+ (s)	ja	U (250/170)	2 Mo.	?	GS
D11	D/EB/154/08	62	+ (s)	ja	U (280/160)	2 J.	67	B (9 ml), GS
D12	D/MA/155/08	70	+ (s)	ja	U (190/140)	5 Mo.	56	B (9 ml)
D16	D/RO/156/08	3	+ (s)	ja	U (30/80)	1,5 Mo.	37	B (3 ml), OP
D17	D/MQ/160/08	8	+ (t/f)	ja	P (60/40)	3 Mo.	69	B (9 ml), GS
D18	D/JA/165/08	55	+ (f)	ja	U (20/70)	1 Mo.	-	B (9 ml), GS
D19	D/FA/162/08	22	- (all)	nein	U (45/40)	11 J.	-	B (9 ml)
A1	A/AN/347/08	54	+ (s/f)	nein	U (10/10)	3 Wo.	-	B (9 ml)
A2	A/KN/348/08	18	- (all)	ja	U (50/40)	5 Mo.	-	B (9 ml)
A3	A/MI/349/08	12	+ (p)	?	K (10/15)	3 Wo.	-	B (9 ml)
A4	A/AA/350/08	7	+ (p)	ja	U (50/40)	4 Mo.	-	B (9 ml)
A5	A/MI/351/08	10	+ (p)	?	U (120/60)	4 Mo.	52	B (9 ml)
A6	A/EA/352/08	10	+ (s/f)	ja	U (150/80)	5 Mo.	19	B (9 ml)
A7	A/AM/353/08	8	+ (s/f)	ja	U (10/10)	1,5 Mo.	36	B (9 ml)
A8	A/GA/354/08	7	+ (f)	nein	U (80/60)	2 Mo.	14	B (9 ml)
A9	A/SS/355/08	8	+ (p)	nein	U (20/10)	10 Mo.	56	B (9 ml)
A10	A/NA/356/08	9	+ (f)	nein	U (20/20)	3 Mo.	56	B (9 ml)
A11	A/AO/357/08	2	+ (s)	ja	U (50/70)	6 Mo.	56	B (3 ml)
A13	A/AJ/359/08	13	+ (s)	nein	P (50/60)	1 Mo.	-	B (9 ml), GS
A14	A/AS/360/08	5	+ (f/p)	nein	U (10/10)	1 Wo.	-	B (9 ml)

Nr	Patienten-ID	Alter	Diagnose	Vak	Wunde	KD	Th	Proben
A15	A/AG/361/08	9	+ (f/p/s)	ja	U (35/20)	3 Mo.	63	B (9 ml), GS
A16	A/AA/362/08	30	+ (p)	ja	U (10/20)	4,5 Mo.	56	B (9 ml), GS
A20	A/JA/365/08	20	+ (f/p/s)	ja	U (30/15)	3 Mo.	41	B (9 ml), GS
A21	A/JN/366/08	20	+ (f/p)	ja	P (45/50)	2 Wo.	-	B (9 ml), GS
A22	A/ZI/367/08	7	+ (s)	ja	U (75/80)	2,5 Mo.	56	B (9 ml), GS
AP1	AP/JB/022/08	67	+ (f/p/s)	nein	U (100/80)	6 Mo.	45	B (9 ml), OP
AP2	AP/JB/022/08		- (all)		U (50/50)			GS
AP3	AP/FA/024/08	75	+ (s)	nein	U (160/80)	1 J.	9	B (9 ml), GS
AP4	AP/KB/026/08	9	+ (t/f/p/s)	ja	U (30/20)	1,5 Mo.	23	B (9 ml), OP
AP5	AP/KB/026/08		+ (t/p/s)		U (45/55)			OP
AP7	AP/KA/028/08	75	- (all)	nein	U (300/250)	2 Mo	?	B (9 ml)

Neben den negativ diagnostizierten Patienten der Datenbank wurde die Kontrollgruppe durch Mitarbeiter des KCCR erweitert (siehe Tabelle 2.3). Diese spendeten freiwillig Blut, welches so wie das Blut der Patientengruppe verarbeitet wurde. Es wurden ausschließlich Ghanaer, die in der Ashanti Region um Kumasi aufgewachsen waren und dort auch heute noch leben, rekrutiert. Sie hatten keine BU-Vorgeschichte.

Tabelle 2.3: Liste der Negativkontrollen. Der Kontroll-Nummer (Nr) sind Alter und BCG-Vakzinierungsstatus (Vak) zugeordnet.

Nr	Alter	Vak
NK 01	44	ja
NK 02	24	ja
NK 03	35	nein
NK 04	32	ja
NK 05	28	ja
NK 06	35	nein

2.2.3 Probenaufarbeitung

Nach der Entnahme wurde das Hautgewebe in Zellmedium aufbewahrt und gemeinsam mit den Blutproben gekühlt transportiert. Die Weiterverarbeitung erfolgte am selben Tag in den Laboren des KCCR.

2.2.3.1 Hautgewebe

Das für die RNA-Extraktion vorgesehene Hautgewebe wurde mit dem Skalpell angeritzt, um die Gewebeoberfläche zu vergrößern. Anschließend wurde es in Trizol überführt und in Flüssigstickstoff bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Zur Expansion der T-Zellen wurde das Hautgewebe in einzelnen Stücken im Labor des KCCR zur Generierung von T-Zell Linien (TCL) in IL-2 inkubiert.

2.2.3.2 Blut

Von den 9 ml peripherem Blut wurde 1 ml Vollblut in 1 ml Harnstoff aufgenommen und bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Von den übrigen 8 ml wurde nach 10 minütiger Zentrifugation (1300 Upm, RT) der Plasmaüberstand abgenommen. Das Plasma wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und anschließend in Flüssigstickstoff nach Hamburg transportiert. Aus den Blutzellen wurden die peripheren Blutleukozyten (PBMC) isoliert und vorort weiterverarbeitet.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 PBMC-Isolation aus Vollblut

Die Isolierung von PBMC erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation von heparinisiertem Blut. Die durch Zentrifugation vom Plasma getrennten Blutzellen wurden im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. Jeweils 2 ml Ficoll wurden mit 8 ml des Blut-PBS-Gemischs in einem 14 ml Falcon-Röhrchen überschichtet und anschließend für 35 min zentrifugiert (1600 Upm, RT). Dadurch wurden das Blut nach seiner Dichte in die einzelnen Schichten aus Plasma, PBMC/Basophile, Ficoll und Erythrozyten/Granulozyten (von oben nach unten) aufgetrennt. Um diese weder durch starke Beschleunigung noch durch starke Abbremsung zu zerstören, wurde die Umdrehungszahl langsam hoch und langsam herunter reguliert. Die Schicht mit den PBMC wurde sorgfältig mit einer Pasteurpipette abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen, um das restliche Ficoll zu entfernen. Dazu wurde 15 min zentrifugiert (1300 Upm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), der Überstand dekantiert und das Pellet in 10 ml PBS gut resuspendiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Pellet in 1 ml Medium A aufgenommen.

2.3.2 T-Zell Linien aus Hautgewebe (TCL)

Das entnommene Hautgewebe wurde in ca. $1\times 1\text{ cm}$ große Stücke geschnitten und auf 6 Loch-Zellkulturschalen verteilt. TCL Medium wurde hinzugegeben und der Ansatz anschließend bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert. Alle 4 bis 6 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Bei ausreichender Zahl an isolierten Zellen wurden diese in Suspension genommen.

2.3.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität mit Trypanblau

Die Zellzahl und Zellvitalität wurde mithilfe einer Trypanblaufärbung bestimmt. Trypanblau vermag nicht, durch eine intakte Zellmembran zu diffundieren. Die Zellmembran abgestorbener Zellen hingegen ist porös und für Trypanblau durchlässig. Somit erscheinen tote Zellen nach Trypanblaufärbung blau, lebende Zellen hingegen bleiben ungefärbt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer Zählkammer.

2.3.4 Einfrieren der PBMC/TCL

Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen entweder sofort zur Stimulation angesetzt oder eingefroren. Zum Einfrieren wurde die Suspension 8 min zentrifugiert (1300 Upm, 4 °C) und das Pellet in 500 µl FCS aufgenommen. Auf Eis wurden tropfenweise 500 µl einer frisch angesetzten Einfrierlösung für *ex vivo*-Zellen zugegeben und das Röhrchen bei -80 °C in Stoff umhüllt eingefroren. Das langsame Absinken der Temperatur soll das schonende Eindringen von DMSO in die Zellmembranen bewirken.

2.3.5 Auftauen der PBMC/TCL

Das frisch aus dem Flüssigstickstoff entnommene Röhrchen wurde in der Hand aufgewärmt. Kurz bevor die gesamte Suspension flüssig war, wurde 1 ml PBS zugegeben, das gesamte Volumen in ein 14 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit PBS auf 10 ml aufgefüllt. Anschließend wurde 10 min (1300 Upm, 4 °C) zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde zunächst in 1 ml PBS resuspendiert und ein zweites Mal gewaschen. Je nach Vorhaben wurden die Zellen in 1 ml Medium A (Stimulation) oder Lysepuffer (RNA-Extraktion) aufgenommen.

2.3.6 Stimulation durch Antigene und mykobakterielle Proteine und Lysate

Die Zellstimulation erfolgte in 96-Loch-Zellkulturschalen. Pro Ansatz wurden 2×10^5 Zellen in einer 96-Loch-Zellkulturschale stimuliert. Dazu wurden die Zellen auf eine Konzentration von $1,4 \times 10^6$ Zellen / 700 µl eingestellt und jeweils 100 µl Zellsuspension in jeden Ansatz pipettiert. Nach einer 15-30 minütigen Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Stimulantien zugegeben. Sie wurden in doppelter Konzentration angesetzt und jeweils 100 µl pro Ansatz hinzugegeben. Neben Phythämagglutinin (PHA), Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)/Ionomycin und Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) als Positivkontrollen wurden zwei aufgereinigte Proteinderivate (PPD) und zwei mykobakterielle Lysate des Laborstammes *M. tuberculosis* H37Rv und *M. ulcerans* in den in Tabelle 2.4 aufgelisteten Konzentrationen eingesetzt.

Um die stimulierte Zytokinproduktion zu messen, wurde die Abgabe von Proteinen über den Golgi-Apparat durch Brefeldin A inhibiert, so dass sich die Zytokine im endoplasmatischen Retikulum an-

Tabelle 2.4: Übersicht über die verwendeten Stimulantien.

Stimulans	Endkonzentration (in $\mu\text{g/ml}$)
PHA	1
PMA	0,25
Ionomycin	1
SEB	1
PPDtub	10
PPDsens	10
H37Rv Lysat	5
<i>M.ulcerans</i> Lysat	8

reicherten. Dazu wurden $1,5\mu\text{l}$ Brefeldin A (Konzentration 1 mg/ml gelöst in 99% igem Ethanol) in jeden Ansatz gegeben, bei 20 h-Stimulation nach 3 h, bei 6 h-Stimulation nach 1 h.

2.3.7 Fixierung der PBMC

Nach 20 bzw. 6 stündiger Stimulation erfolgte die Fixierung der Zellen als Vorbereitung zur Färbung mit spezifischen Antikörpern für die Messung im Durchflusszytometer. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die 96 Loch-Zellkulturschalen 5 min zentrifugiert (1700 Upm , 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in $100\mu\text{l}$ Fixierpuffer gut resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis unter Lichtausschluss 20 min inkubiert. Es folgten 2 Waschschrte mit $150\mu\text{l}$ Waschpuffer und 5 minütiger Zentrifugation (1900 Upm , 4°C), ohne das Pellet zwischendurch zu resuspendieren. Das verbleibende Pellet wurde in $100\mu\text{l}$ Waschpuffer aufgenommen und in Cryotubes überführt. $100\mu\text{l}$ der Einfrierlösung für fixierte Zellen wurde tropfenweise hinzugegeben und die Zellen anschließend bei -20°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen in eine -80°C -Kühltruhe überführt und zu gegebener Zeit im Flüssigstickstoffcontainer nach Hamburg transportiert.

2.4 Durchflusszytometrische Zellanalyse

Für die durchflusszytometrische Zellanalyse wurden die Zellen im ersten Schritt mit Fluoreszenzantikörpern inkubiert. Die nach der Stimulation fixierten Zellen wurden in der 96 Loch-Zellkulturschale belassen, die fixierten und eingefrorenen Zellen wurden wie unter 2.3.5 beschrieben aufgetaut und jeder Stimulationsansatz in ein Loch der 96 Loch-Zellkulturschale pipettiert. Diese wurde 5 min zentrifugiert (1700 Upm , 4°C).

2.4.1 Intrazelluläre Färbung

Nach Dekantieren wurden in das Restvolumen (ca. 10 µl) die Antikörper (siehe Tabelle 2.1.8) pipetiert, durch Resuspendieren die Zellen vereinzelt und die Antikörper gleichmäßig verteilt. Nach einer 30minütigen Inkubation im Dunkeln auf Eis wurden die Zellen zweimal mit 180 µl Waschpuffer durch 5 minütige Zentrifugation (1700 Upm, 4 °C) gewaschen und das Pellet in 150 µl FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Puffer aufgenommen.

2.4.2 Messung am Durchflusszytometer

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden mit dem LSR II von BD Bioscience durchgeführt, der über drei verschiedene Laser (blauer Laser, 488 nm; roter Laser, 633 nm; violetter Laser, 405 nm) verfügt. Zellen werden durch eine Kapillare angesaugt und durch einen Laserstrahl geleitet. Abhängig von Größe, Oberflächenprofil und gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern wird das Laserlicht zerstreut. Sogenannte Photomultiplier detektieren das Licht. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*) korreliert mit der Beugung des Lichts im flachen Winkel, was Rückschlüsse auf die Zellgröße zulässt. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, *sideward scatter*) detektiert die Lichtbrechung im rechten Winkel als Maß der Granularität der Zelle. Die an die zur Färbung eingesetzten Antikörper gekoppelten Fluorochrome weisen spezifische Absorptions- und Emissionsmaxima auf. Der integrierte Computer des Durchflusszytometers kann nun die Messwerte des FSC, des SSC und der emittierten Wellenlänge miteinander in Zusammenhang bringen. Auf diese Weise erhält man - je nach vorher ausgewählten Antikörpern - Informationen über die oberflächliche sowie intrazelluläre Proteinausstattung. Zusätzlich soll ein Filter verhindern, dass das Streulicht einer Wellenlänge von verschiedenen Detektoren gemessen wird. Dazu ist eine Kompensationsmessung der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe im Vorfeld jeder Messung notwendig. Dadurch können bis zu 9 unterschiedlichen Zellpopulationen eines unbekanntes Zellgemischs aufgetrennt werden (Gonzalez *et al.*, 2008).

2.4.3 Graphische Darstellung der Zytokinauswertung

Die Zytokinexpression wurde mittels *FCS express* ermittelt. Durch Einteilung der T-Zell-Wolke in entsprechende Subpopulationen konnte die Zytokinexpressionsstärke und die Multizytokinproduktion ausgewertet werden. Anhand der in den Abbildungen 2.1 und 2.2 dargestellten intrazellulären FACS-Färbungen von PBMC von Patient A9 soll die Vorgehensweise der Auswertung der Zytokinproduktion nach *ex-vivo*-Restimulation veranschaulicht werden.

Zytokinexpressionsstärke

Aus der T-Zell-Wolke wurde die CD4⁺CD8⁻-Population durch die Oberflächenmarker CCR7 und CD45RA in die Subpopulationen der *effector memory* T- (T_{EM}), *central memory* T (T_{CM}), naiven T- (T_{naiv}) und Effektor-T- (T_{EF}) Zellen eingeteilt (siehe Abbildung 2.1).

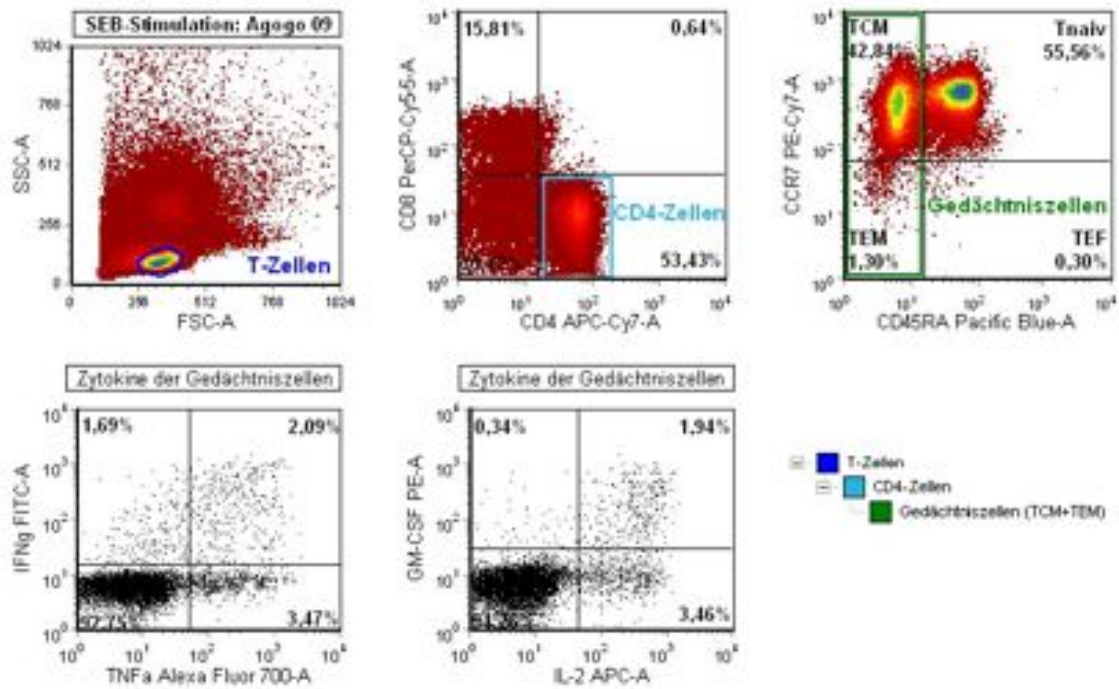


Abbildung 2.1: Auswertungsschema einer intrazellulären FACS-Messung zur Analyse der Zytokinexpression nach Stimulation mit SEB. Die $CD4^+$ -T-Zellen sind in die Subpopulationen aus T_{CM} ($CD45RA^-CCR7^{high}$)-Zellen, T_{EM} ($CD45RA^-CCR7^{low}$)-Zellen, T_{EF} ($CD45RA^+CCR7^{low}$)-Zellen und T_{naiv} ($CD45RA^+CCR7^{high}$)-Zellen unterteilt. Unter den $CD4^+$ $CD45RA^-$ -Zellen wurde die $IFN\gamma^-$, $TNF\alpha^-$, $IL-2^-$ und $GM-CSF^-$ -Produktion gemessen.

Die SEB-Stimulation bewirkte, dass unter den $CD4^+$ $CD45RA^-$ -T-Zellen 2,78 % (1,69 % + 2,09 %) $IFN\gamma^+$, 5,56 % (2,09 % + 3,47 %) $TNF\alpha^+$, 2,28 % (0,34 % + 1,94%) $GM-CSF^+$ und 5,4 % (1,94 % + 3,46 %) $IL-2^+$ T-Zellen zu finden waren.

Multizytokinproduktion

Das Schema der Kombinationsauswertung zur Ermittlung der Multizytokinproduktion ist anhand der FACS-Färbung in Abbildung 2.2 dargestellt.

Durch entsprechende Einteilung konnten die Zellen ermittelt werden, die ein oder mehrere Zytokine (zur selben Zeit) exprimierten. Es konnten 7 verschiedene $CD4^+$ $CD45RA^-$ -Subpopulationen detektiert werden (1 x positiv für $IFN\gamma+TNF\alpha+IL-2$, 3 x positiv für $IFN\gamma+TNF\alpha$, $IFN\gamma+IL-2$ oder $TNF\alpha+IL-2$, 3 x positiv für $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ oder $IL-2$). Die Frequenz der für ein oder mehrere Zytokine positiven Zellen wurde als Anteil aller Zytokin-produzierenden Zellen berechnet.

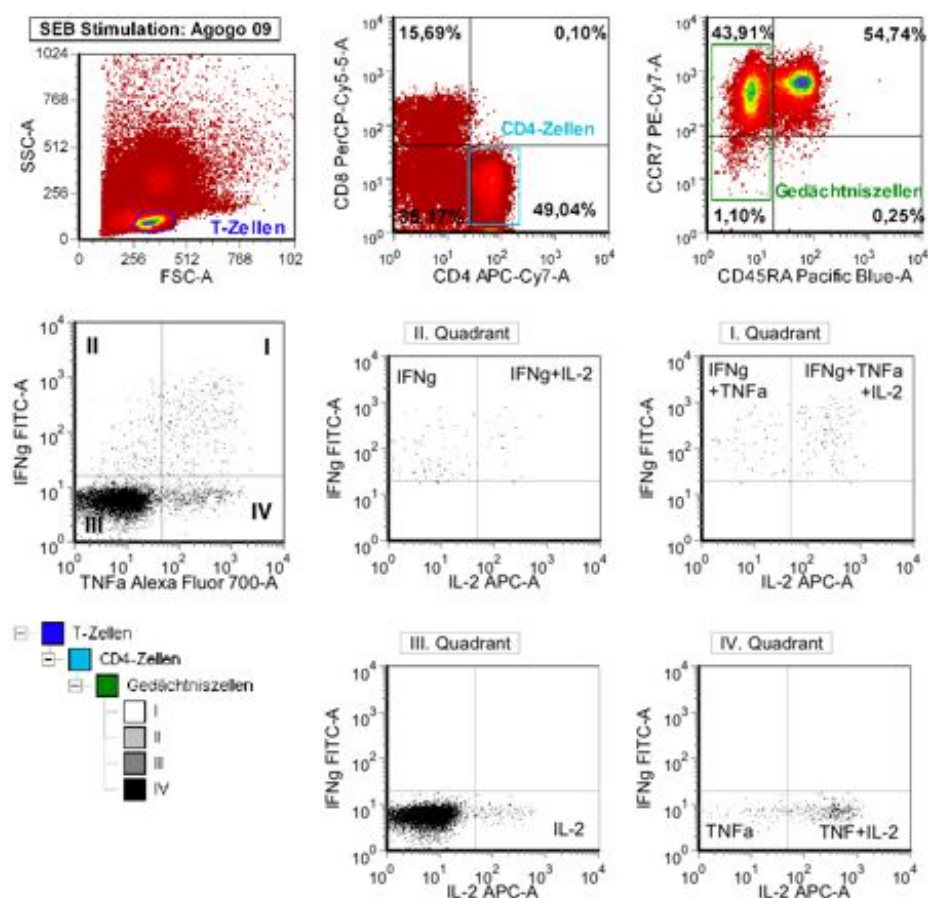


Abbildung 2.2: Auswertungsschema einer intrazellulären FACS-Messung zur Analyse der Multizytokinexpression nach Stimulation mit SEB. Aus der T-Zell-Population sind die CD4⁺ CD45RA⁻-Zellen in geeignete Gruppen unterteilt worden, so dass die Kombinationen aus IFN γ ⁺ + TNF α ⁺ + IL-2⁻, IFN γ ⁺ + TNF α ⁺, IFN γ ⁺ + IL-2⁺, TNF α ⁺ + IL-2⁺, IFN γ ⁺, TNF α ⁺ und IL-2⁺ dargestellt werden können.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolation

Gesamt-RNA-Isolation mit Trizol

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus Hautgewebe des Ulkusrand wurde das in Trizol eingefrorene Gewebestück bei Raumtemperatur aufgetaut. In einer Petrischale wurde es unter dem Abzug mit dem Skalpell in sehr kleine Stücke geschnitten und durch 10 bis 20 malige Feinnadelaspiration homogenisiert. Anschließend wurde die homogenisierte Gewebesuspension 2 min sehr gründlich durchmischt, 200 μ l Chloroform unter dem Abzug zugegeben und erneut 1 min sehr gründlich durchmischt. Nach 3-5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde 20 min zentrifugiert (1200 Upm, 4 °C). Der die farblose RNA enthaltende Überstand wurde abgenommen und mit 500 μ l Isopropanol in ein frisches Probengefäß gegeben. Alle Schritte erfolgten auf Eis und an einem sorgfältig desinfizierten RNA-

Arbeitsplatz. Nach erneuter 12 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine zweite Zentrifugation (20 min, 1200 Upm, 4 °C). Das weiße Pellet mit RNA wurde nach Verwerfen des Überstands in 1 ml 75 %iger Ethanolösung durch leichtes Hin- und Herschwenken und einen Zentrifugationsschritt (3 min, 1200 Upm, 4 °C) gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl RNase freiem Aqua dest. resuspendiert.

Gesamt-RNA-Isolation mit RNeasy

Zur Isolation Gesamt-RNA aus weniger als 10^7 Zellen wurde das RNeasy Kit von Qiagen verwendet, bei der die RNA über eine Säule mit einer Silicagelmatrix aufgereinigt wurde. Es wurde 350 µl Lysepuffer (RLT buffer) zum Zellpellet gegeben und 1 min auf dem Vortex gemischt. Durch Zugabe von 350 µl 70%igem Ethanol und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zell- und Kernmembranen aufgebrochen. Das Homogenisat wurde auf eine Säule gegeben, die auf ein 2 ml Tube aufgesetzt war, und in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (30 sec., 8000 Upm, 4 °C). Durch ihre Ladungseigenschaft adhärierte die RNA an die Membran der Säule. Der Durchfluss wurde verworfen und 700 µl Waschpuffer (RW1 buffer) wurden vorsichtig auf die Membran gegeben und erneut zu zentrifugiert (30 sec., 8000 Upm, 4 °C).

An dieser Stelle konnte ein DNase-Verdau zwischengeschaltet werden, um ein möglichst reines Eluat zu erhalten. Dazu wurden 80 µl einer DNase-Lösung aus 70 µl RDD DNase I Puffer und 10 µl DNase I auf die Säule gegeben und 20 min inkubiert. Die DNase-Spaltprodukte wurden durch erneutes Waschen mit dem RW1 Waschpuffer aus der Membran gelöst.

Nach Verwerfen des Durchlaufs erfolgte die Zugabe von 500 µl des zweiten Waschpuffers (RPE buffer) auf die Säule und eine 2 min Zentrifugation bei 8000 Upm und 4 °C. Zum dritten Mal wird der Durchfluss verworfen und bei höchster Geschwindigkeit 2 min bei 4 °C zentrifugiert. Dabei trocknete die Membran und die RNA löst sich. Die Säule wurde auf ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Tube gesetzt und mit 30 µl RNase freiem H₂O 1 min lang inkubiert. Durch anschließendes Zentrifugieren (1 min., 8000 Upm, 4 °C) wurde die gesamte Zell-RNA eluiert.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch ermittelt. Dazu wurde Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm verwendet und durch eine durchsichtige Küvette mit der zu messenden Probe geleitet. Der Grad der Absorption wurde vom Photometer in die Konzentration der RNA umgerechnet. Dieser Berechnung lag das Lambert-Beersche-Gesetz zugrunde, das folgendermaßen lautet: $E = \epsilon \times c \times d$; E = Extinktion bei 260 nm (OD_{260}), ϵ = Extinktionskoeffizient ($0,02 \frac{l}{mol \cdot cm}$), c = Konzentration der Probe ($\frac{mol}{l}$), d = Schichtdicke der Küvette (1 cm). Das Absorptionsmaximum der aromatischen Ringe der RNA liegt bei 260 nm, während das der Proteine bei 280 nm liegt. Durch die anschließende Berechnung des Quotienten der Extinktion bei 260 nm und der Extinktion bei 280 nm derselben

Probe, wurde die Reinheit der RNA ermittelt. Lag der Quotient der $OD_{260/280}$ bei 1,70, war die Verunreinigung durch Proteine sehr gering.

2.5.3 Reverse Transkription

Um die Menge einer bestimmten RNA-Sequenz in der qPCR zu quantifizieren, muss die Gesamt-RNA in c(*copy*)DNA umgeschrieben werden. Die reverse Transkription wurde mit Superscript II Reverse Transkriptase durchgeführt. Für eine Menge von 2 μ g wurde das entsprechende RNA-Volumen zu

4 μ l Primer Oligo TP (DT) (8 μ M)

2 μ l dNTP's (2 mM)

gegeben, sehr gut durchmischt und 10 min auf 70 °C erhitzt. Anschließend wurde die Probe anzentrifugiert, 4 min auf Eis gestellt und

2 μ l DTT

4 μ l 5 fach Puffer

1 μ l Reverse Transkriptase

hinzupipettiert. Nach kurzer Zentrifugation inkubierte die Probe 90 min bei 42 °C, anschließend 15 min bei 70 °C. Die cDNA wurde bei -90 °C eingefroren.

2.5.4 Quantifizierung durch qPCR

Einer quantitativen PCR liegt das allgemeine Prinzip einer Polymerasekettenreaktion (PCR) zugrunde. Dieses setzt sich aus festen Komponenten (*template*-DNA, Vorwärts-Primer, Rückwärts-Primer, hitzestabile DNA-Polymerase, desoxy-Nukleotide) und einem festen Temperaturzyklus zusammen. Er beginnt bei 96 °C, um die Wasserstoffbrückenbindungen der Ausgangs-DNA aufzutrennen (Denaturierung), dem folgt eine etwas geringere Temperatur, bei der die Primer an die Einzelstränge binden und die Synthese starten (Annealing) und endet bei 72 °C, während die Polymerase ausgehend vom Primer den komplementären Strang erstellt, indem sie die einzelnen Nukleotide miteinander verbindet (Elongation). Diese Schritte werden mehrmals wiederholt, wobei sich mit jedem Zyklus die Menge des amplifizierten Genabschnitts verdoppelt.

Anders als bei der herkömmlichen PCR kann man bei der qPCR nicht nur eine bestimmte Gensequenz der Ausgangs-DNA detektieren, sondern auch Aussagen über deren Quantität machen. Dazu macht man sich den exponentiellen Anstieg der Amplifikationsrate zunutze. Es wird der Fluoreszenzfarbstoff Cybr Green zu jeder Probe gegeben. Dieser lagert sich in doppelsträngige DNA ein und wird bei jedem Zyklus angeregt. Damit entspricht die gemessene Fluoreszenzintensität der Menge an doppelsträngiger DNA, also des bereits amplifizierten Genabschnitts.

Diese Methode eignet sich gut dazu, die Expressionsstärke eines Gens zu quantifizieren, indem die in cDNA umgeschriebene RNA als *template*-DNA genutzt wird. Da allerdings die reverse Transkription

unterschiedlich effizient war, wurde ein Haushaltsgen, das ebenfalls im Template vorliegt und konstant in der Zelle exprimiert wird, im selben Lauf amplifiziert. Anhand der Differenz dieser beiden Amplifikationsraten konnte ein relativer Zusammenhang der RNA-Konzentrationen und damit der Expressionsstärke der beiden Gene berechnet werden.

Pro Probe wurde folgender Master-Mix erstellt:

1,5 µl	PCR-Puffer
1,1 µl	MgCl ₂
0,3 µl	dNTPs
0,15 µl	Cybr Green (1:1000 in DMSO verdünnt)
0,075 µl	Hot Star Taq
6,875 µl	H ₂ O (Ampuwa)

Für eine Messung wurden

1 µl	template-cDNA
2 µl	Vorwärts-Primer (100 µM)
2 µl	Rückwärts-Primer (100 µM)

zu 10 µl Master-Mix pipettiert. Jede Probe wurde in Duplikaten analysiert. Als Negativkontrolle wurde H₂O anstelle von cDNA in den Ansatz pipettiert.

Folgender Standard-Temperaturzyklus wurde für alle Untersuchungen mit der qPCR verwendet: Initial erfolgte eine Denaturierung für 15 min bei 95 °C. Anschließend erfolgten 40 Zyklen aus Denaturierung für 15 sec bei 95 °C, Annealing für 15 sec bei 60 °C und Elongation für 60 sec bei 72 °C. Die Schmelzpunkte wurden durch Denaturierung für 20 sec bei 95 °C und spezifischer Renaturierung für 15 sec bei 60 °C bestimmt. Nach sukzessivem Herunterkühlen der Proben bis auf 40 °C für 30 sec wurde die qPCR beendet. Die Schmelzkurven der Wasserproben wurden mit denjenigen der cDNA - Proben verglichen und bei unterschiedlichen Maxima als echtes Amplifikat gewertet.

2.5.5 Agarosegelelektrophorese

Die Größe der in der qPCR amplifizierten DNA-Fragmente wurde mittels Auftrennung in einem 1%igen Agarosegel beurteilt. Dazu wurde 1g Agarose in 100 ml Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer durch Erhitzen gelöst und mit 2 µl Ethidiumbromid versetzt. Zusätzlich zum fluoreszierenden Cybr-Green interkaliert Ethidiumbromid in doppelsträngige DNA. Das auspolymerisierte Agarosegel wurde in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit TBE-Puffer vollständig bedeckt. Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und die Taschen des Gels beladen. Als Marker wurden 7 µl einer 100 bp-DNA-Leiter verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V. Unter anschließender Beleuchtung mit UV-Licht wurden die Banden sichtbar gemacht.

2.6 Übersicht über Probenaufarbeitung und Analyseverfahren

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit stand unterschiedliches Probenmaterial zur Verfügung, das jeweils eine andere Verarbeitungsweise erforderte. So sind Zellen aus Blutproben sehr gut zur durchflusszytometrischen Analyse geeignet, Hautgewebe hingegen *per se* nicht. Genauso ist die RNA-Extraktion mittels Säulen über eine Silicagelmatrix ein geeignetes Verfahren für geringe Zell- und RNA-Mengen, für mechanisch zerkleinertes Gewebesuspensat ist es wiederum wenig brauchbar. Um dennoch Zellen aus Hautgewebe durchflusszytometrisch analysieren zu können, wurde die Zellisolation aus Hautgewebe mittels IL-2-Inkubation etabliert. Ebenfalls stellte die RNA-Isolation mit Trizol zur RNA-Isolation aus Hautgewebe ein geeignetes Alternativverfahren zur Säulenaufreinigung dar. Zum besseren Verständnis der Ergebnisse dieser Arbeit ist in Abbildung 2.3 dargestellt, bei welchem Ausgangsmaterial welche Methode angewendet wurde.








Material				
Vorbereitung	-		Teilung in 1x1cm große Stücke	Mechanische Zerkleinerung
Zellisolationsmethode 	Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll (PBMC)		Inkubation in IL-2 (TCL)	-
RNA-Extraktionsmethode 	Säulenaufreinigung	-	Säulenaufreinigung	RNA-Isolation mit Trizol
Analyseverfahren	qPCR 	FACS 	qPCR 	

Abbildung 2.3: Übersicht über die verwendeten Ausgangsmaterialien und Analyseverfahren.

Für die Fallstudie 3.2 auf Seite 42 war es gelungen, von einem Patienten alle Ausgangsmaterialien zu gewinnen und wie unter Abbildung 2.3 dargestellt zu verarbeiten. Die übrigen Auswertungen zeigen nur Teilaspekte dieses Schemas allerdings bei größerer Patientenzahl.

3 ERGEBNISSE

3.1 Systemische Immunantwort: Restimulation mit mykobakteriellen Proteinen und Lysaten

Die systemische Immunantwort der *M. ulcerans*-Infektion wird von T-Zell-Subpopulationen gebildet, die auf mykobakterielle Antigene mit einem speziellen Zytokinprofil reagieren. Dies sollte im ersten Teil der Arbeit anhand aus venösem Blut isolierter PBMC untersucht werden.

Zur Restimulation der *ex-vivo*-PBMC wurden die beiden Positivkontrollen PHA und SEB, die beiden aufgereinigten Proteinderivate PPD_{tub} aus *M. tuberculosis* und PPD_{sen} aus *M. avium* sowie mykobakterielle Lysate des Laborstamms *M. tuberculosis* H37Rv und gemischten *M. ulcerans*-Stämmen verwendet. Beim *M. tuberculosis*-Lysat handelte es sich um den Laborstamm *M. tuberculosis* H37Rv. Das *M. ulcerans*-Lysat wurde aus Bakterienstämmen von Burulipatienten aus der Umgebung von Dunkwa hergestellt, die im Vorfeld der Studie im *Kumasi Centre for Collaborative Research* (KCCR) kultiviert worden waren.

In den ersten drei Auswertungsschemata (Zytokinexpressionsstärke, individuelles Verhältnis, Multizytokinauswertung) wurden die Burulipatienten zu einem Kollektiv zusammengefasst, um nach möglichen Zusammenhängen unabhängig von den individuell verschiedenen Parametern zu suchen. In Abschnitt 3.1.5 wurden dagegen kleine homogene Gruppen gebildet, um ein mögliches Wechselspiel zwischen Immunantwort und klinischem Krankheitsverlauf analysieren zu können.

Dazu wurde zunächst die Zytokinexpressionsstärke nach *ex-vivo*-PBMC-Restimulation mit mykobakteriellen Proteinen und Lysaten von 26 Burulipatienten und 9 Kontrollen gemessen und die Immunreaktion auf verschiedene mykobakterielle Antigene zueinander ins Verhältnis gesetzt. Des Weiteren wurde untersucht, inwiefern T-Zellen von Burulipatienten eine eigene Multizytokinproduktion aufweisen.

3.1.1 Zytokinexpression der *M. ulcerans*-spezifischen CD4⁺- T-Zellsubpopulationen

Zunächst galt es zu klären, welche Zytokine von welcher CD4⁺CD8⁻-Subpopulation in Burulipatienten exprimiert werden. Dabei wurde nach dem in Abbildung 2.1 vorgestellten Schema ausgewertet. Die *M. ulcerans*-Lysat-Stimulation führte zu einer starken Zytokinexpression, die individuell und abhängig von der analysierten Subpopulation starken Schwankungen unterlag (Abbildung 3.1).

M. ulcerans-Lysat

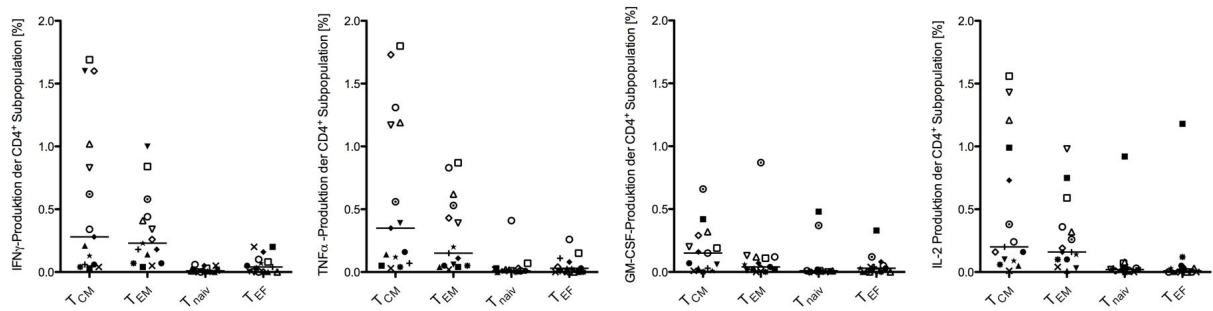


Abbildung 3.1: Zytokinproduktion der CD4⁺-Subpopulationen von Burulipatienten nach Stimulation mit *M. ulcerans*-Lysat (n=15). Anteile der Zytokin positiven T- Zellen (y-Achse) an unterschiedlichen CD4⁺-Subpopulationen (x-Achse). Jeder Punkt steht für einen Patienten, gleiche Symbole stehen für denselben Patienten. Der Balken gibt den Median an. Die Daten wurden durchflusszytometrisch ermittelt.

Dennoch konnte im Vergleich der einzelnen CD4⁺-Subpopulationen eine einheitliche Tendenz in der Zytokinexpression beobachtet werden. Ein jeweiliges Zytokin wurde ähnlich stark oder schwach innerhalb derselben CD4⁺-Subpopulation produziert. Die höchste Frequenz zeigte sich unter den T_{CM}- Zellen, deren Expression von IFN γ , TNF α , GM-CSF und IL-2 bei je 0,2% - 0,4% lag. Es folgte die T_{EM}-Subpopulation mit einer Frequenz von 0,1% - 0,3%. Dem gegenüber exprimierten nur 0,05 \pm 0,05% der T_{EF} und T_{naiv}- Zellen Zytokine. Insgesamt wurden IFN γ und TNF α durch *M. ulcerans*-Lysat am stärksten, IL-2 und GM-CSF weniger stark induziert.

Die vernachlässigbar geringe Zytokinexpression der T_{EF}- und T_{naiv}-Zellen führte dazu, sich in allen folgenden Analysen der Zytokinproduktion auf die CD4⁺CD45RA⁻-T-Zellen (T_{CM}- und T_{EM}- Zellen), also die Gedächtniszellen, zu beschränken. Ein weiterer Grund ist, dass diese Zellen am ehesten dem lokalen Zellprofil nach Antigenkontakt im Ulkusrand entsprechen.

3.1.2 Vergleich der Zytokinexpression zwischen Burulipatienten und Kontrollen

Zunächst wurde die Reaktion auf die mykobakteriellen Proteinderivate und Lysate mit der Kontrollgruppe verglichen und exemplarisch anhand der IFN γ -Expressionsstärke dargestellt. Während in die Gruppe der Burulipatienten alle positiv diagnostizierte Fälle unabhängig von klinischen Parametern einbezogen wurden, handelte es sich bei den Kontrollen um negativ diagnostizierte Fälle und im Endemiegebiete lebende Spender (siehe Tabellen 2.2 und 2.3).

Die Restimulation mit den Positivkontrollen PHA und SEB führte zu vergleichbarer IFN γ -Expression der CD4⁺CD45RA⁻-T-Zellen (Abbildung 3.2, A). Damit waren die im Folgenden beobachteten Effekte nicht auf eine generell stärkere Zytokinexpression von Burulipatienten zurückzuführen.

Verglich man die Reaktion auf die verschiedenen mykobakteriellen Proteinderivate und Lysate zwischen Burulipatienten und Kontrollen, fiel auf, dass diese sich nach Stimulation mit PPD_{tub} und PPD_{sens} stark unterschieden. Die Reaktion auf *M. ulcerans*-Lysat zeigte die größte Streuung der

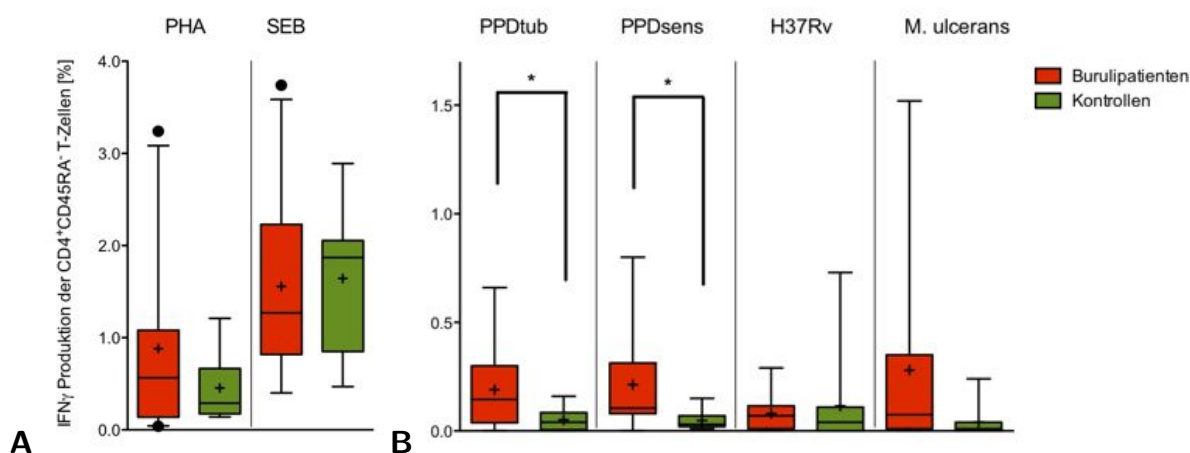


Abbildung 3.2: IFN γ -Expression von Buruli- (n=26) und Kontrollpatienten (n=9) . *Ex-vivo*-PBMC wurden für die Positivkontrolle mit PHA und SEB (A) und für die spezifische Auswertung mit den aufgereinigten Proteinderivaten PPDtub und PPDsens bzw. den mykobakteriellen Lysaten von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. ulcerans* stimuliert (B). Die Werte sind mittels Durchflusszytometrie erhoben worden. Die y-Achse gibt die IFN γ -Produktion als prozentualen Anteil der CD4⁺CD45RA⁺-T-Zellen an (Darstellung als Boxplot, Kreuze geben den Mittelwert an). Burulipatienten = rot, Kontrollgruppe = grün. Sterne geben signifikante Abweichungen zwischen Burulipatienten und Kontrollen an (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), die Bestimmung erfolgte durch den Mann-Whitney-U-Test.

Werte (Minimum 0 %, 25. Perzentile 0,010 %, Median 0,075 %, 75. Perzentile 0,350 %, Maximum 1,520 %) in der BU-Patientengruppe. Die Kontrollgruppe wich trotz eines Medianwertes von 0,01 nicht signifikant ab. Keine signifikante Abweichung zwischen den Gruppen war auch bei der Reaktion auf das H37Rv-Lysat zu sehen. Dennoch zeigte sich hier im Gruppenvergleich der geringste Unterschied. So war der Median der Burulipatienten (0,070 %) zwar höher als bei der Kontrollgruppe (0,040 %), das Maximum (0,290 %) hingegen deutlich niedriger (0,730 %) (Abbildung 3.2, B).

Des Weiteren wurde die TNF α , GM-CSF und IL-2-Expressionsstärke gemessen (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte ein ähnliches Expressionsmuster wie für die IFN γ -Expression beobachtet werden.

In weiteren Auswertungen wurden BCG⁺-Burulipatienten mit BCG⁻-Burulipatienten verglichen. Es konnte keine signifikante Abweichung zwischen den Gruppen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). In der Kontrollgruppe konnte zwar eine tendenziell höhere Zytokinproduktion unter den Geimpften festgestellt werden, dennoch zeigten auch nicht Geimpfte eine Reaktion auf mykobakterielle Antigene. Aus diesem Grund wurde in den Auswertungen, die die Burulipatienten als ein Kollektiv begreifen, keine weitere Diskriminierung der Gruppen anhand der BCG⁺-Vakzinierung vorgenommen.

3.1.3 Die relative T-Zell-Antwort gegen mykobakterielle Antigene

Der Vergleich der Reaktionen auf mykobakterielle Proteinderivate und Lysate zeigte eine tendenziell stärkere Immunantwort bei den Burulipatienten, ließ aber noch keine Aussage über das Verhältnis der individuellen Reaktionen auf die unterschiedlichen mykobakteriellen Antigene zu.

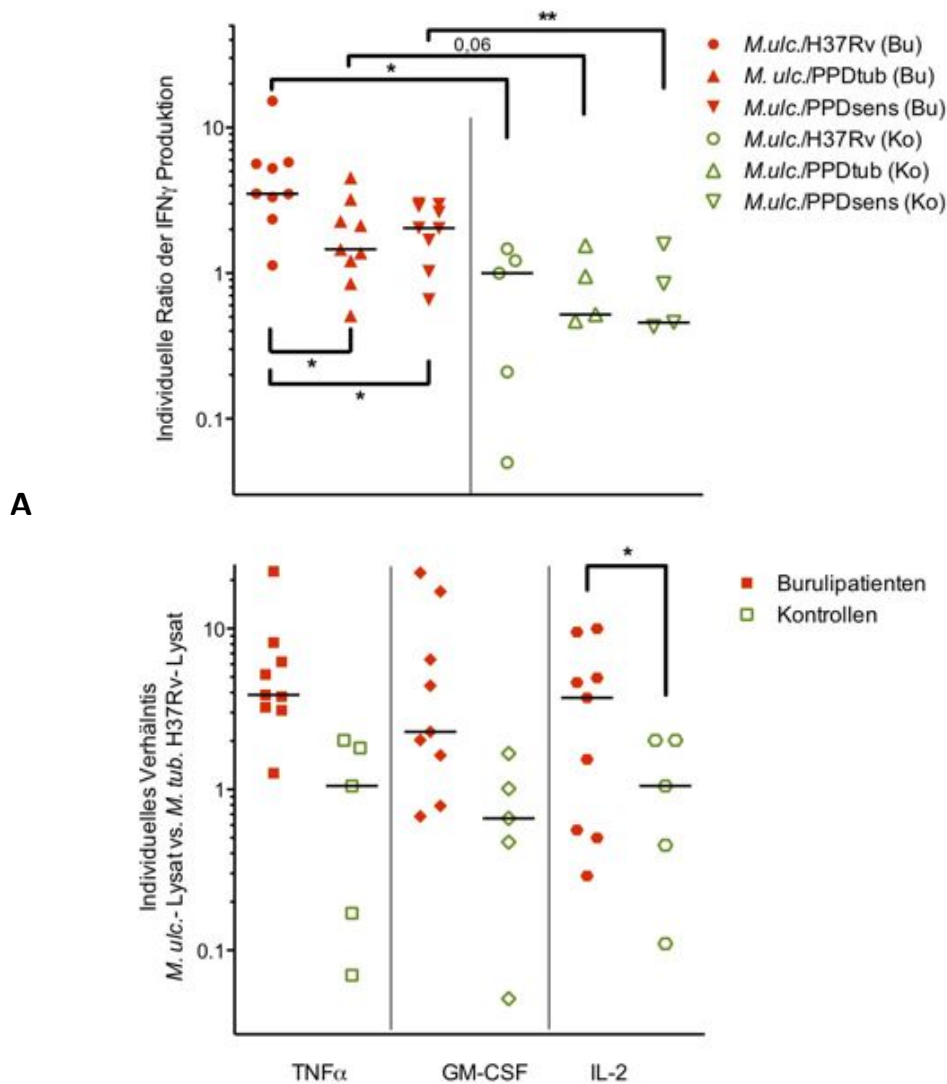


Abbildung 3.3: Individuelles Verhältnis der Zytokinexpression von PBMC von Burulipatienten mit > 0,1 % *M. ulcerans*-spezifischer Zytokinexpression (n=9) und BCG-vakzinierten Kontrollen (n=5). Mit PPDsens, PPDtub, H37Rv- und *M.ulcerans*-Lysat restimulierte *ex-vivo*-PBMC wurden durchflusszytometrisch untersucht. (A) Die IFN γ -Expressions-Stärke der CD4⁺CD45RA⁻-T-Zellen wurde gemessen und ein individueller Quotient zwischen den mykobakteriellen Stimuli (*M.ulcerans* vs. H37Rv, *M.ulcerans* vs. PPDtub, *M.ulcerans* vs. PPDsens) gebildet (y-Achse mit logarithmischer Skala). (B) Analog wurde der *M.ulcerans* vs. H37Rv-Quotient für TNF α , GM-CSF und IL-2 gebildet. Jeder Punkt steht für einen Patienten, der Mittelwert ist mit Balken angegeben. Sterne geben die signifikante Abweichungen zwischen Burulipatienten und Kontrollen an (* p < 0,05, ** p < 0,01), die Bestimmung erfolgte durch den Mann-Whitney-U-Test.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden individuelle Verhältniswerte gebildet, die die Reaktion auf *M. ulcerans*-Lysat mit der Reaktion auf PPDtub, PPDsens bzw. H37Rv-Lysat miteinander verglichen. Die Grenze wurde bei 0,1 % Zytokinexpression nach Restimulation mit *M. ulcerans*-Lysat gewählt, da bei der Division von zu geringen Zytokinexpressionsstärken unrealistische Werte berechnet wurden. Anhand der dargestellten Vergleiche wurden durch individuelle Verhältnisbildung folgende Beobach-

tungen gemacht (Abbildung 3.3, A):

- Patienten, die stark auf *M. ulcerans*-Lysat reagierten, reagierten weniger stark auf H37Rv-Lysat (Quotient aus *M. ulcerans*-Lysat vs. H37Rv-Lysat > 1).
- Dieser Effekt galt auch für die Quotienten aus *M. ulcerans*-Lysat vs. PPD_{tub} und *M. ulcerans*-Lysat vs. PPD_{sens}, allerdings nicht für jeden Patienten sondern nur im Durchschnitt (Mittelwerte > 1).
- Signifikante Unterschiede zu den weiteren Quotienten, wie auch zur Kontrollgruppe belegten den guten Diskriminierungsmarker des Verhältnisses *M. ulcerans*-Lysat vs. H37Rv-Lysat.

Um den Stellenwert des Verhältnisses von *M. ulcerans*-Lysat vs. H37Rv-Lysat weitergehend beurteilen zu können, wurde der entsprechende Quotient auch für die Zytokine TNF α , GM-CSF und IL-2 berechnet (Abbildung 3.3, B).

- Der Vergleich des Quotienten *M. ulcerans*-Lysat vs. H37Rv-Lysat mit *M. ulcerans*-Lysat vs. PPD_{tub} bzw. *M. ulcerans*-Lysat vs. PPD_{sens} innerhalb der Burulipatienten war nur für TNF α signifikant verschieden (Daten nicht gezeigt).
- Ein Unterschied zur Kontrollgruppe war nur für IL-2 signifikant, während für TNF α und GM-CSF in diesem Punkt erneut nur eine Tendenz angegeben werden konnte.

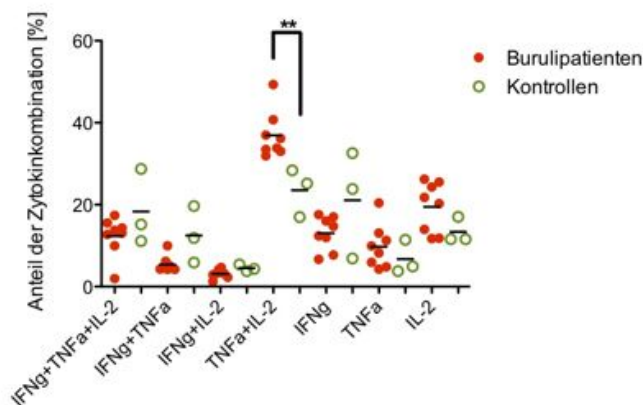
Zunächst bleibt zu sagen, dass anhand des individuellen Verhältnisses *M. ulcerans*-Lysat vs. H37Rv-Lysat nur bei Messung der IFN γ - und IL-2-Expressionsstärke geeignet zwischen Burulipatienten und Kontrollen unterschieden werden konnte.

3.1.4 Multizytokinproduktion nach Stimulation mit mykobakteriellen Antigenen

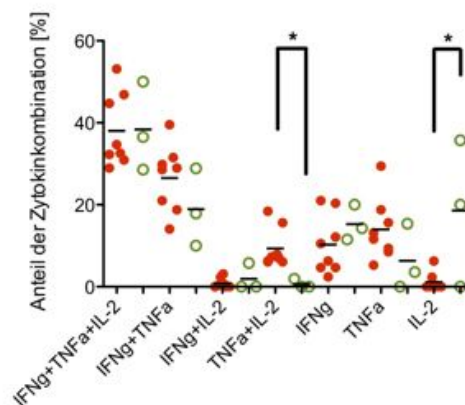
Als abschließende Analyse der Zytokinproduktion nach Stimulation mit mykobakteriellen Antigenen wurde nach einem für die Immunantwort gegen *M. ulcerans* typischen Zytokinprofil in Burulipatienten gesucht (siehe Auswertung der Multizytokinproduktion Abbildung 2.2).

Welchen Einfluss die antigenspezifische Stimulation auf das Zytokinprofil von Burulipatienten hat, ist in Abbildung 3.4 abgebildet. Bei der Stimulation mit SEB reagierten die Zellen von Burulipatienten homogen und zeigten bis auf die kombinierte Expression aus TNF α +IL-2 keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Im Vergleich dazu zeigte sich nach antigenspezifischer Stimulation mit PPD_{sens} ein anderes Bild: Der Anteil dreifachpositiver Zellen lag im Mittel bei 38,01 % und war damit deutlich größer als nach SEB-Stimulation (Mittelwert 12,34 %, vgl. Abbildung 3.4, A). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der kombinierten Expression von TNF α +IL-2 blieb erhalten, zusätzlich war die isolierte IL-2-Expression der CD4⁺CD45RA⁻-Zellen in der Kontrollgruppe wesentlich stärker im Vergleich zu den Burulipatienten (siehe Abbildung 3.4, B).

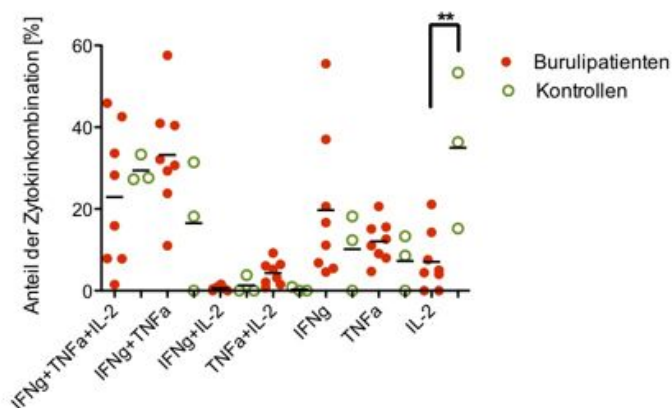
A SEB



B PPDsensitin



C M. ulcerans-Lysat relativ



D M. ulcerans-Lysat absolut

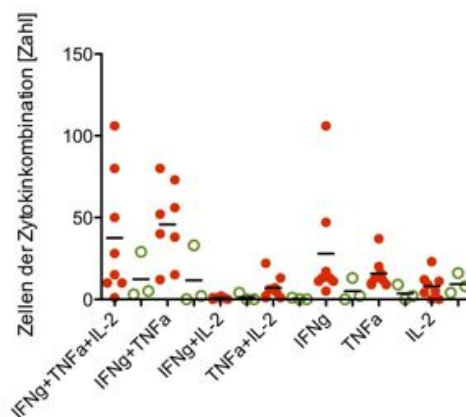


Abbildung 3.4: Multizytokinproduktion nach Stimulation mit SEB, PPDsens und *M. ulcerans*-Lysat bei Burulipatienten (n=7) und Kontrollen (n=3). Mittels Durchflusszytometrie wurden aus CD4⁺CD45RA⁻-T-Zellen hinsichtlich ihrer Mehrfachzytokinproduktion untersucht. Die Kombination aus IFN γ , TNF α und IL-2 ist als Anteil an der gesamten zytokinproduzierenden T-Zell-Zahl dargestellt (A-C), bzw. als absolute Zellzahl (D). Jeder Punkt steht für einen Patienten, der Mittelwert ist mit Balken angegeben. Sterne geben die signifikante Abweichungen zwischen Burulipatienten und Kontrollen an (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), die Bestimmung erfolgte durch den Mann-Whitney-U-Test.

Nach antigenspezifischer Stimulation mit *M. ulcerans*-Lysat war der Anteil der dreifachpositiven Zellen erneut höher als nach SEB-Stimulation (Mittelwert 22,93 %); die Streuung der Werte nahm aber sowohl bei den Burulipatienten als auch bei den Kontrollen zu. Erneut führte die *M. ulcerans*-Lysat-Stimulation zur deutlich erhöhten isolierten IL-2-Expression unter den Kontrollen. Diese war unter den Burulipatienten kaum vorhanden (siehe Abbildung 3.4, C).

Ob die beschriebenen Veränderungen nach antigenspezifischer Stimulation auch auf tatsächlich erhöhte Zellzahlen zurückzuführen waren oder nur in Relation zu den übrigen Kombinationen zu sehen waren, sollte der Vergleich mit den absoluten Zellzahlen klären (siehe Abbildung 3.4, D). Es zeigte

sich, dass eine antigenspezifische Stimulation auch bei Darstellung in absoluter Zellzahl die Frequenz der Vielfachpositiven erhöhte und sich die Verteilung der einzelnen Kombinationen nicht änderte. Allerdings war der isoliert erhöhte IL-2-Spiegel in der Kontrollgruppe nicht mehr vorhanden.

Abschließend betrachtet konnte festgestellt werden, dass sich die gegen *M. ulcerans* gerichtete Immunantwort bei Burulipatienten nicht durch ein einheitliches Zytokinprofil, allenfalls durch eine isoliert erniedrigte IL-2-Produktion auszeichnete. Auffällig war, dass die Stimulation mit dem *M. ulcerans*-Lysat eine wesentlich inhomogenere Zytokinantwort erzeugte, als die Stimulation mit PPDsensitin. Dies könnte durch die unterschiedlichen Komponenten des Lysats und die dadurch bedingten Kreuzreaktivitäten erklärt werden.

3.1.5 Korrelation der Immunantwort mit klinischen Parametern

Im Folgenden wurde bei Betrachtung des gesamten Patientkollektivs nach einem Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke einzelner Zytokine und den klinischen Parametern Patientenalter, Ulkusgröße, Krankheitstage und Therapiedauer gesucht.

Patientenalter

Zunächst wurde die Stärke der Immunantwort gegen das *M. ulcerans*-Lysat mit dem Patientenalter korreliert.

IFN γ

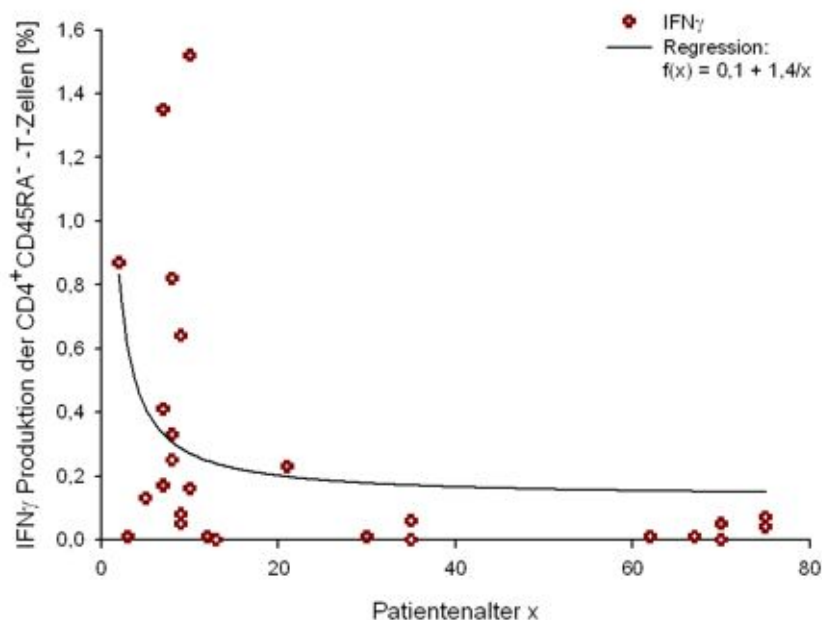


Abbildung 3.5: IFN γ -Expression nach Stimulation mit *M. ulcerans*-Lysat dargestellt in Korrelation zum Patientenalter (n=26). Die IFN γ ⁺CD4⁺CD45RA⁻-T-Zellen sind als prozentualer Anteil der CD4⁺CD45RA⁻-T-Zellen (y-Achse) gegen das Patientenalter in Jahren (x-Achse) aufgetragen. Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Auffällig war, dass Gedächtniszellen bei den unter 14jährigen Burulipatienten tendenziell eine stärkere Zytokinexpression zeigten. Generell war dies bei allen untersuchten Zytokinen sichtbar, wobei durch die *M. ulcerans*-Lysat-Stimulation GM-CSF- und IL-2 weniger stark als IFN γ und TNF α exprimiert wurden (Abbildung 3.5, IFN γ -Produktion als repräsentatives Zytokin dargestellt).

Da aber wesentliche Einflussfaktoren wie Krankheits- und Therapiedauer in diese Korrelation nicht einbezogen wurden, konnte eine generell stärkere Immunantwort bei Kindern nicht als allgemeine Aussage bestehen.

Weitere klinische Parameter

Der Zusammenhang zwischen Zytokinexpressionstärke und den klinischen Größen Ulkusgröße, Krankheitstage und Therapiedauer wurde statistisch ausgewertet. Es konnte keine Korrelation beobachtet werden.

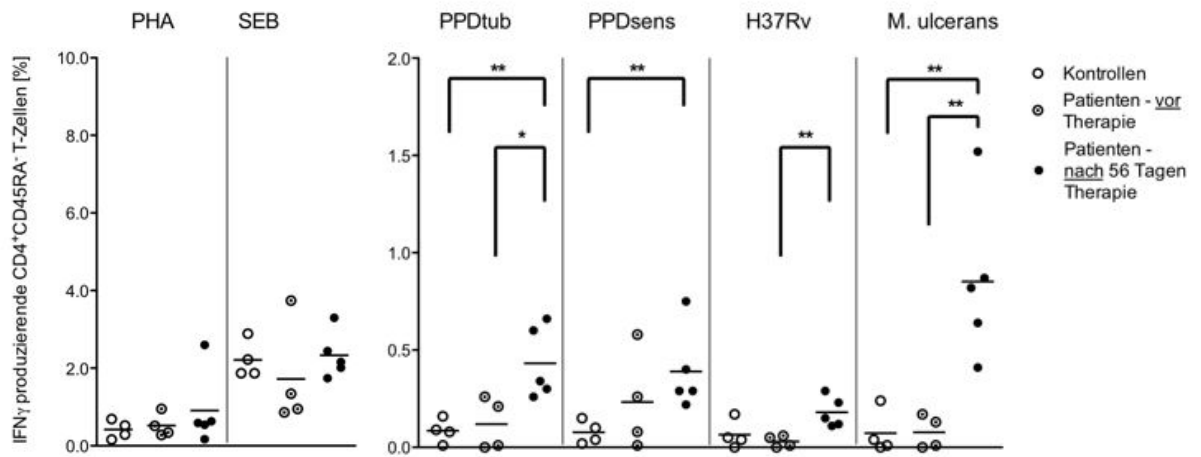
Zytokinexpression unter Therapie

Wurden hingegen die Burulipatienten nicht mehr als ein Gesamtkollektiv betrachtet, sondern in homogene Gruppen eingeteilt, konnte ein Einfluss der Therapie auf die Immunantwort beobachtet werden. Es wurden folgende Gruppen miteinander verglichen: Patienten vor Behandlungsbeginn, nach dem WHO-Therapieschema behandelte Patienten (56 Tage Rifampicin/Streptomycin) und eine mit BCG-vakzinierte Kontrollgruppe. Es wurde wie bei den Auswertungen unter Abschnitt 3.1.2 vorgegangen. Um Unterschiede in der Zytokinproduktionsstärke zwischen den Gruppen nach Stimulation mit mykobakteriellen Antigenen von einem allgemeinen Effekt zu diskriminieren, wurde zusätzlich die Zytokinexpression nach Stimulation mit PHA und SEB ermittelt.

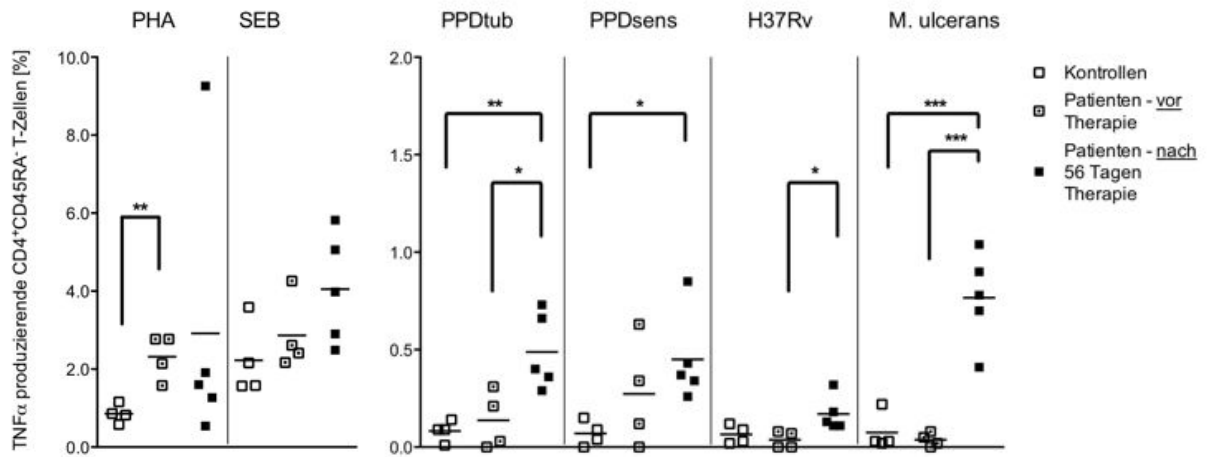
Zwischen den einzelnen Gruppen waren wesentliche Unterschiede sichtbar: Zunächst fiel die signifikante Abweichung der Burulipatienten vor Therapie von den Burulipatienten nach 56 Tagen Therapie auf. Diese war nicht nur am deutlichsten nach der Stimulation mit *M. ulcerans*-Lysat ausgeprägt, sondern schlug sich auch in allen vier analysierten Zytokinen nieder ($p_{\text{TNF}\alpha} < 0,0005$, $p_{\text{IFN}\gamma} = 0,0084$, $p_{\text{IL-2}} = 0,0343$, $p_{\text{GM-CSF}} = 0,0439$, siehe Abbildung 3.6 A-D). Ob dieser Effekt eine generell erniedrigte Immunantwort in der Patientengruppe vor Therapie ist, konnte die Betrachtung der polyklonalen Stimulation mit PHA und SEB klären. Hier fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Burulipatienten vor Therapie und den Burulipatienten nach 56 Tagen. Lediglich die Kontrollgruppe wies nach SEB-Stimulation eine signifikant erniedrigte TNF α - und IL-2-Expression auf und nach PHA-Stimulation eine signifikant erniedrigte IL-2-Expression. Damit ist davon auszugehen, dass es sich bei der erniedrigten Zytokinproduktion in der Gruppe der Burulipatienten vor Therapie um einen antigenspezifischen und keinen generalisierten Effekt handelte. Dieser war nicht allein auf die *M. ulcerans*-Stimulation beschränkt, sondern auch nach PPD_{tub}- und H37Rv-Stimulation zu sehen. Dies galt allerdings nur für die Zytokine IFN γ , TNF α und IL-2 (Abbildung 3.6 A, B, D). Die PPD_{sens}-Stimulation hingegen rief unter den Patienten vor Therapie eine ähnlich starke Zytokinantwort wie

unter den Patienten nach Therapie hervor.

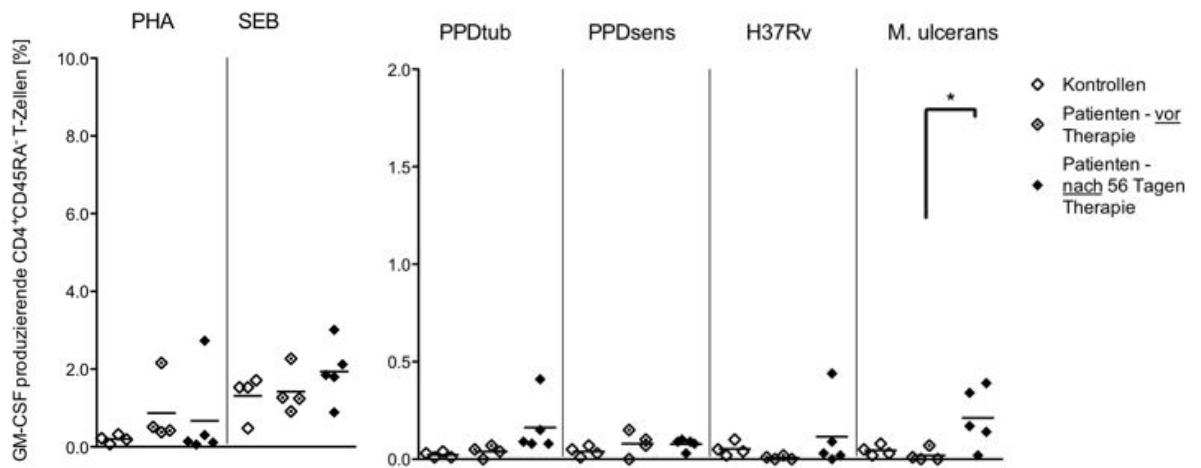
A IFN γ



B TNF α



C GM-CSF



D IL-2

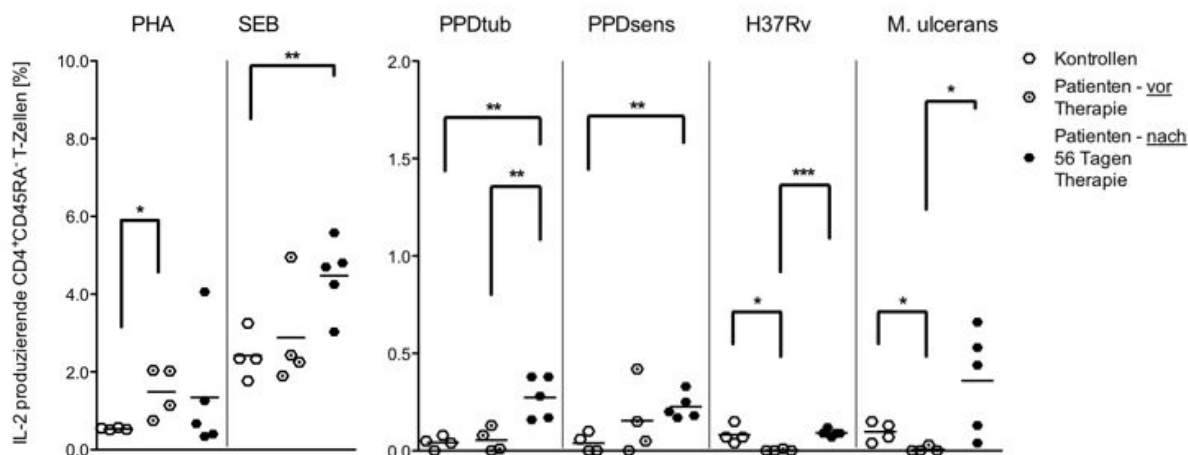


Abbildung 3.6: Zytokinproduktion von 56 Tage behandelten (n=4) und Burulipatienten vor Therapie (n=4) im Vergleich zu BCG-vakzinierten Kontrollpatienten (n=5) (A IFN γ , B TNF α , C GM-CSF, D IL-2). PBMC wurden für die Positivkontrolle mit PHA und SEB und für die spezifische Stimulation mit den aufgereinigten Proteinderivaten PPDtub und PPDsens bzw. den mykobakteriellen Lysaten von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. ulcerans* stimuliert und die Zytokin-Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert. Auf der y-Achse ist die Zytokin-Expression als prozentualer Anteil der CD4⁺CD45RA⁺-T-Zellen angegeben. Jeder Punkt steht für einen Patienten, der Balken stellt den Mittelwert der Patientengruppe dar. Sterne geben die signifikante Abweichungen an (* p < 0,05, ** p < 0,01), die Bestimmung erfolgte durch den Mann-Whitney-U-Test.

Demzufolge scheinen die Burulipatienten erst im Zuge der Therapie eine antigenspezifische Immunantwort gegen *M. ulcerans* auszubilden, die mit Kreuzreaktivitäten gegen PPDtub und H37Rv-Lysat einhergeht. Eine schon vor der Therapie bestehende Reaktion gegen PPDsens, als Hinweis auf eine Immunantwort gegen Umweltmykobakterien, wurde durch die Therapie nicht beeinflusst.

3.2 Fallstudie: T-Zell-Charakterisierung von Proben eines 9 jährigen Patienten

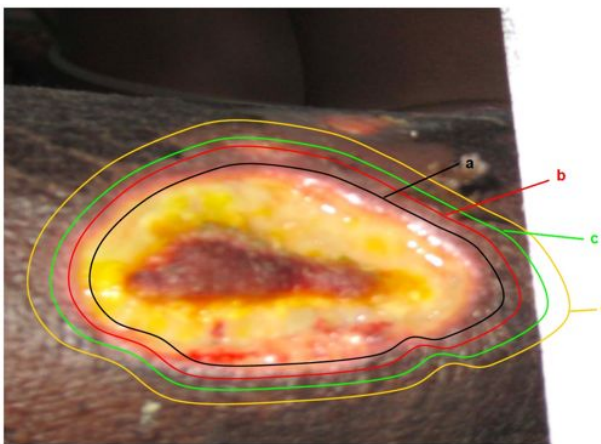
Nachdem entscheidende Reaktionsmuster in bestimmten Patientengruppen dargestellt wurden, interessierte im Folgenden die Immunantwort des einzelnen Patienten. Wie diese geartet ist, sollte durch Vergleiche des T-Zell-Repertoires im peripheren Blut (PBMC), in verschiedenen Zonen des Ulkusrandes und in aus dem Gewebe ausgewanderten T-Zell-Linien (TCL) untersucht werden (Analyse nach der in Abbildung 2.3 auf Seite 32 dargestellten Übersicht) .

3.2.1 Anamnese und Lokalbefund

Bei einem 9 jährigen Jungen (ID:AP/KB/026/08) wurde im Krankenhaus in Apromasi eine operative Wundsäuberung durchgeführt. Der Patient hatte sich mit einem seit zwei Wochen bestehenden

Plaque am rechten Ellenbogen im *Buama-Bumasi-Health-Centre* vorgestellt, wo die antibiotische Behandlung mit Streptomycin und Rifampicin begonnen wurde. Zwei Wochen nach Therapiebeginn nekrotisierte die Epidermis über dem Plaque und es bildeten sich nacheinander zwei Hautulzera. Zum Operationszeitpunkt hatte das erste Ulkus (AP5: Läsion I) einen Durchmesser von 4,5×5,5 cm mit 5-6 cm Randuntergrabung, während das zweite Ulkus (AP4: Läsion II) 2,0×3,0 cm mit Randuntergrabung von 1-2 cm maß (Abbildung 3.7). Am 29. Mai 2008 erfolgte die Operation unter Vollnarkose, bei der frisches Gewebematerial zur weiteren T-Zell-Analyse entnommen wurde (Einwilligungserklärung des Vaters des Patienten ist in Abbildung 6.4 einzusehen).

Läsion I



Läsion II

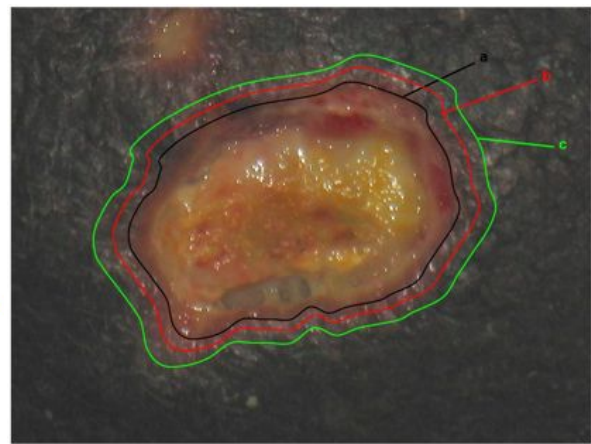


Abbildung 3.7: Bilder der zwei Ulzera von Patient AP/KB/026/08 vor Operation. In die Läsionsränder sind vier bzw. drei Linien eingezeichnet, die die Einteilung in innere, mittlere und äußere Ulkuszone markieren. Anhand dieses Schemas ist das frische Operationsmaterial zerlegt und anschließend mittels qPCR analysiert worden. Läsionsrand I konnte in vier verschiedene Zonen (a-d, schwarz, rot, grün, gelb) geteilt werden, Läsionsrand II hingegen nur in drei (a-c, schwarz, rot, grün).

Die beiden Läsionen zeigen das für Buruli Ulkus typische Bild eines großflächigen Geschwürs mit vollständig zerstörter Epidermis. Der Rand ist wulstartig aufgeworfen und der Kontakt zur Subkutis aufgehoben.

3.2.2 Analyse des TCR-BV-Ketten-Repertoire

Inwiefern sich dieses klinische Bild im TCR-BV-Ketten-Repertoire niederschlug, sollten die folgenden Analysen zur Art der T-Zell-Expansion klären. Der Vergleich der einzelnen BV-Ketten untereinander und des ganzen Repertoires zwischen Blut und Hautgewebe des Ulkusrandes, konnte die Anreicherung bestimmter T-Zell-Subpopulationen nachweisen. Dazu wurde RNA aus Gewebe und Zellen mittels BV-spezifischer qPCR analysiert und in Relation zum konstanten Teil der β -Kette (BC) des TCR, den alle T-Zellen exprimierten, angegeben.

Intraläsionales Verteilungsmuster

Läsion I

Abhängig von der Distanz zum Ulkuszentrum änderte sich das BV-Ketten-Repertoire in Läsion I (Abbildung 3.8). Die innere Zone zeigte eine gleichmäßige Verteilung der BV-Subpopulationen. In der äußeren Zone hingegen bildete die BV20-Subpopulation den vorherrschenden Subtyp. Ihr Anteil stieg mit zunehmender Entfernung vom Zentrum der Läsion, von 9% in (d), auf 13% in (c), auf 24,5% in (b) und 21% in (a).

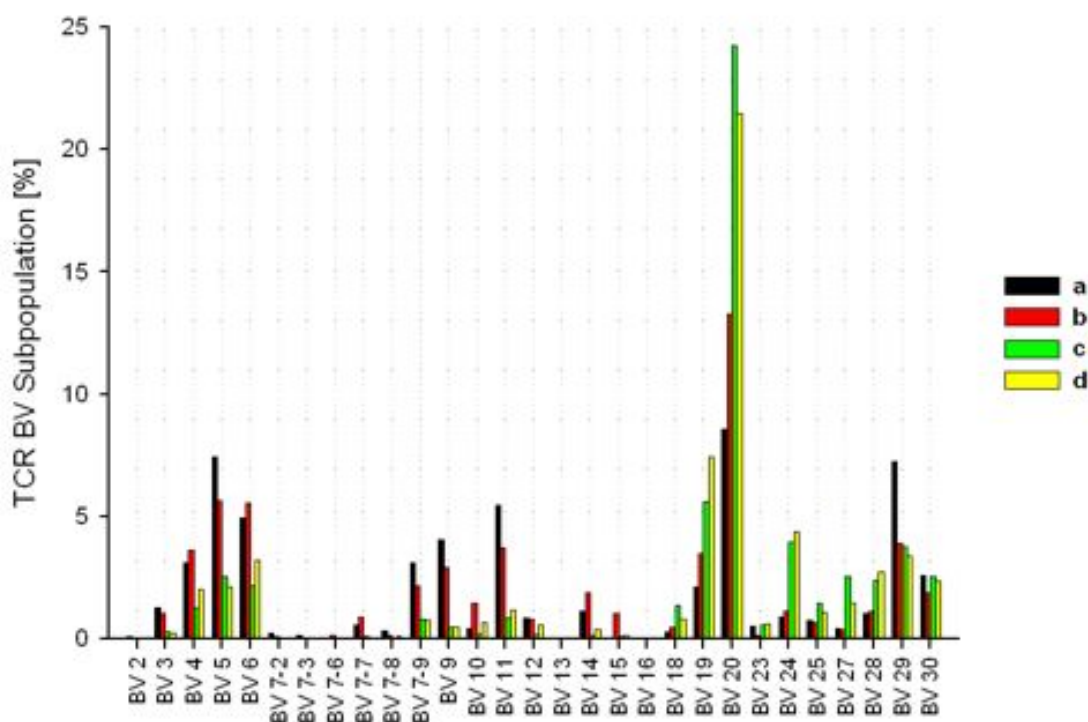


Abbildung 3.8: Analyse des TCR-BV-Repertoires der vier Randzonen von Läsion I mittels BV-spezifischer qPCR. RNA der vier verschiedenen Zonen des Ulkusrandes wurde mittels Trizol isoliert. Die Quantität der BV-Subpopulationen wurde als prozentualer Anteil der gesamten T-Zell-Population ermittelt. Die Werte wurden auf die konstante Kette (BC) des TCR normiert. Zum Vergleich der Zonen wurde eine 100%ige Detektion der BV-Ketten angenommen.

Läsion II

In der zweiten Läsion (siehe Abbildung 3.9) konnte hingegen kein vorherrschender Subtyp identifiziert werden. Das Bild wurde von BV4, BV5 und in geringerem Maße von BV20 dominiert. Darüber hinaus war das Anreicherungsmuster nicht von der Distanz zum Läsionsmittelpunkt abhängig.

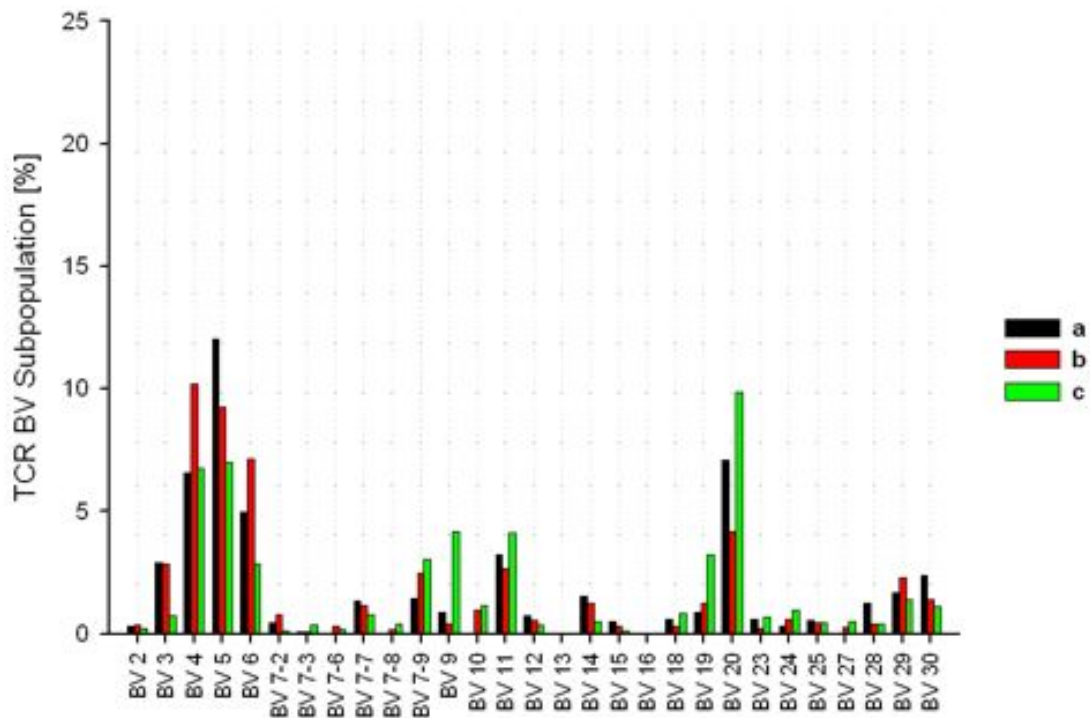
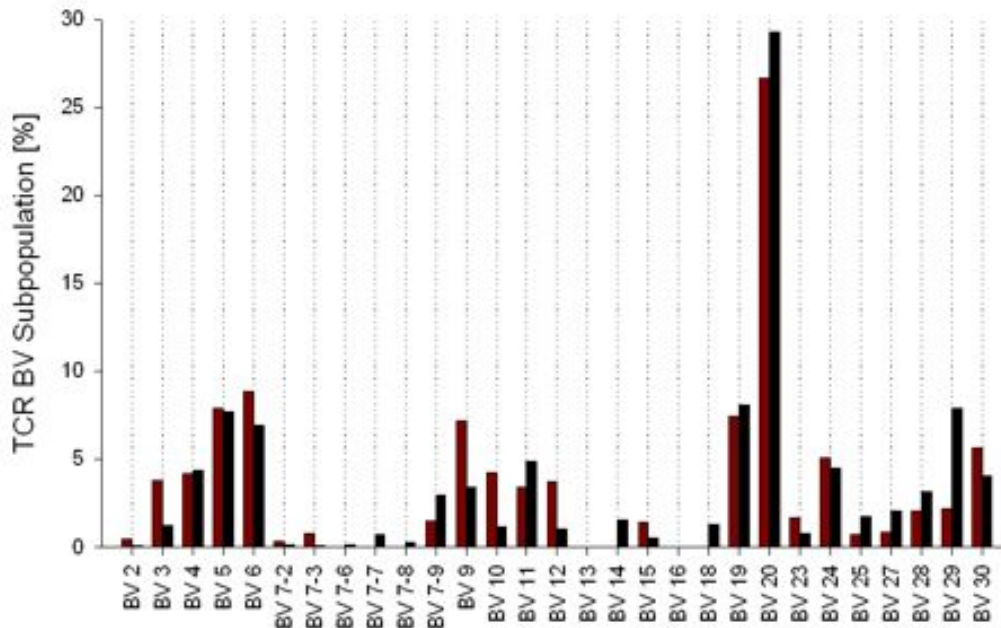


Abbildung 3.9: Analyse des TCR-BV-Repertoires der drei Randzonen von Läsion II mittels BV-spezifischer qPCR. RNA der drei verschiedenen Zonen des Ulkusrandes wurde mittels Trizol isoliert. Die Quantität der BV-Subpopulationen wurde als prozentualer Anteil der gesamten T-Zell-Population ermittelt. Die Werte wurden auf die konstante Kette (BC) des TCR normiert. Zum Vergleich der Zonen wurde eine 100%ige Detektion der BV-Ketten angenommen.

Vergleich des Gesamtgewebes mit PBMC

Ob es sich in den beiden Läsionen um echte oder nur scheinbare Anreicherungen bestimmter TCR-BV-Ketten handelte, sollte der Vergleich mit dem TCR-BV-Repertoire der PBMC desselben Patienten klären. Dazu wurden die Werte des intralesionalen BV-Ketten-Repertoires der gewebsständigen T-Zellen gemittelt und als Gesamtgewebe mit den T-Zellen des Blutes verglichen. Dabei fielen zunächst keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 3.10). Läsion I und die PBMC zeichneten sich durch ein nahezu identisches BV-Ketten-Repertoire aus. Die bei Einzelzonenbetrachtung in der äußeren Zone der Läsion I nachweisbare Dominanz der BV20-Kette (vgl. Abbildung 3.8) offenbarte sich als nicht läsionsspezifisch, sondern war auch im peripheren Blut vorhanden. Bei Läsion II hingegen waren die in der äußeren und mittleren Zone vorherrschenden Subtypen BV4 und BV5 auch noch bei Zonengesamt Betrachtung stärker angereichert als in den PBMC.

Läsion I



Läsion II

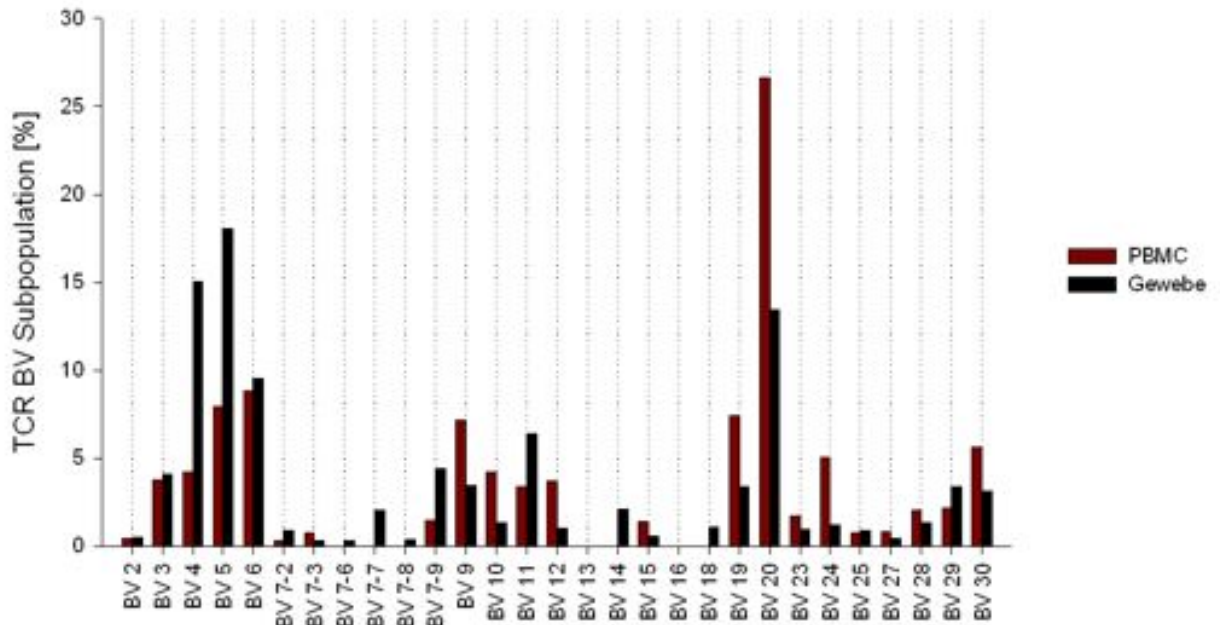
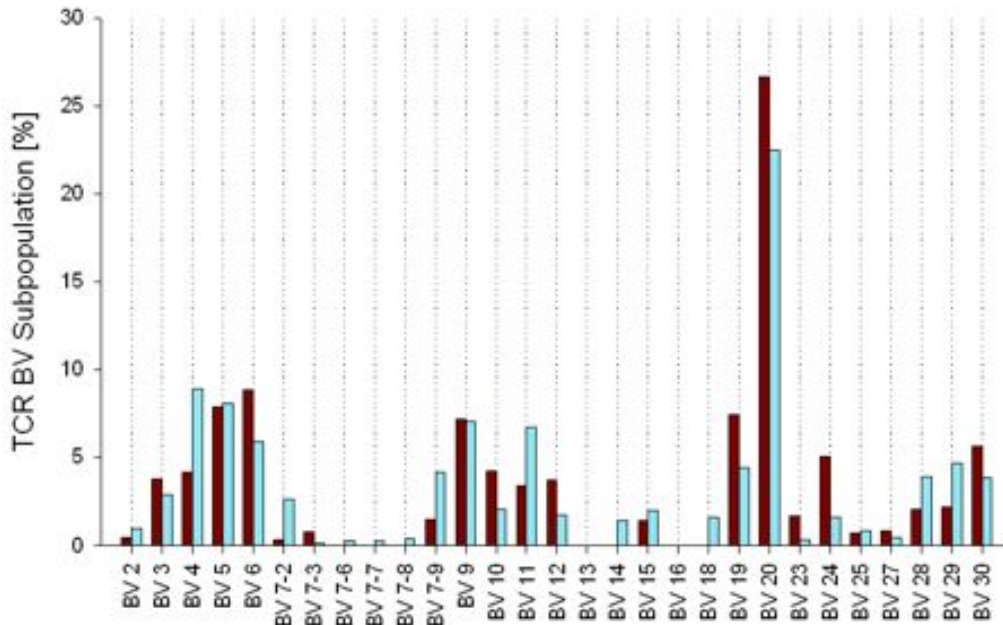


Abbildung 3.10: qPCR-Analyse des TCR-BV-Repertoires im Gesamtrand (a-d) der Läsion I und im Gesamtrand (a-c) der Läsion II im Vergleich zu den PBMC. Graphen zeigen den Mittelwert, der sich aus den qPCR-Ergebnissen der einzelnen Randzonen ergibt (schwarz). Parallel wurde das TCR-Repertoire mittels qPCR bei den PBMC (rot) desselben Patienten analysiert. Die y-Achse gibt den prozentualen Anteil der jeweiligen BV-Subpopulation an allen T-Zellen an. Zum Vergleich der Zonen wurde eine 100%ige Detektion der BV-Ketten angenommen.

Vergleich der TCL mit PBMC

Inwiefern die beschriebenen Beobachtungen des BV-Ketten-Repertoires des Gesamtgewebes sich bis in die aus dem Gewebe ausgewanderten TCL fortsetzte, sollte als nächstes geklärt werden.

Läsion I



Läsion II

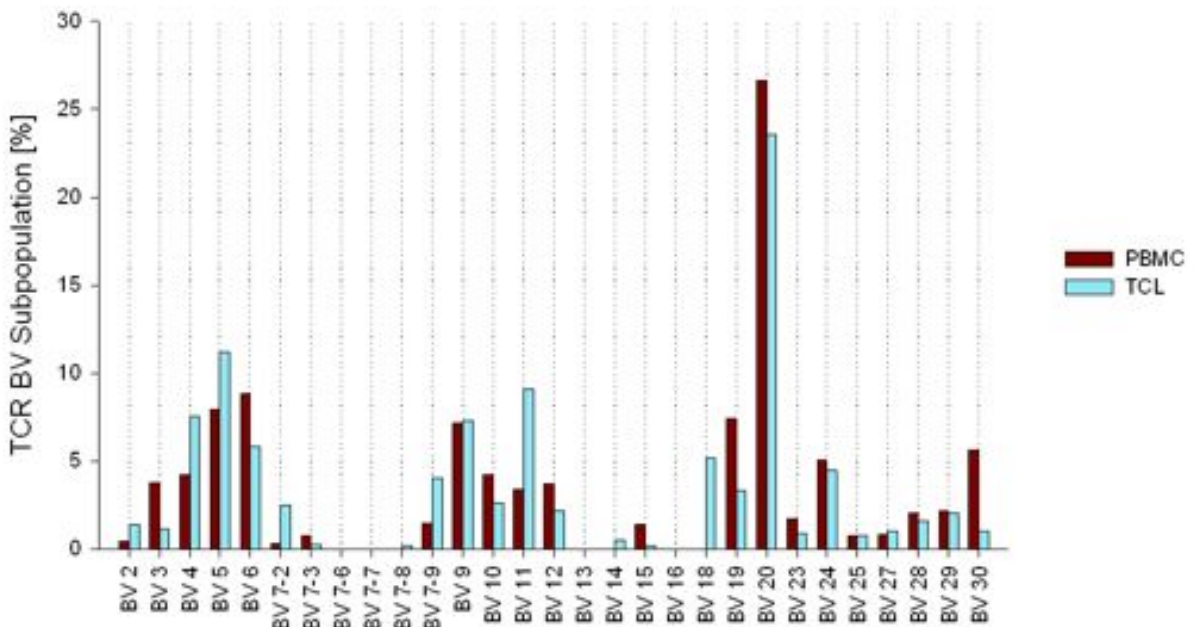


Abbildung 3.11: qPCR-Analyse des TCR-BV-Repertoires bei TCL und PBMC im Vergleich. Aus TCL (blau) und PBMC (schwarz) wurde RNA isoliert und mittels BV-spezifischer qPCR analysiert. Die y-Achse gibt den prozentualen Anteil der jeweiligen BV-Subpopulation an allen T-Zellen an. Zum Vergleich der Zonen wurde eine 100 %ige Detektion der BV-Ketten angenommen.

Das TCR-BV-Repertoire bei TCL und PBMC in Läsion I wich nur gering voneinander ab (siehe Abbildung 3.11). TCL, die aus dem gesamten Randgebiet von Läsion II generiert wurden, zeigten keine Anreicherung von BV4 und BV5. Festzuhalten war, dass das BV-Ketten-Repertoire der aus dem Gewebe ausgewanderten TCL dem der PBMC entsprach.

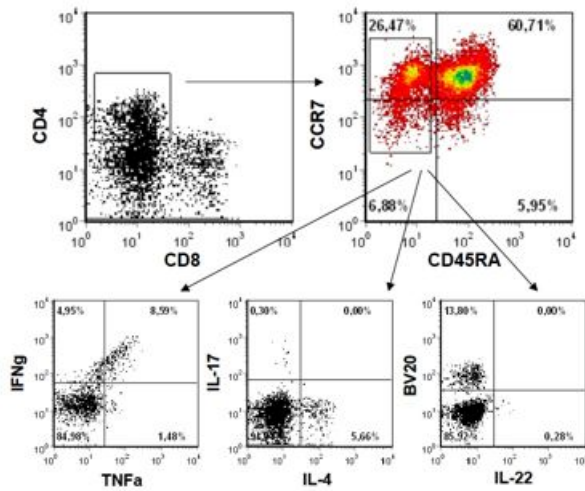
3.2.3 TCR-Subtypen, Differenzierungsstatus und Transkriptionsfaktoren

Zusätzlich zum BV-Ketten-Repertoire wurden in den Zonen a-d der Läsion I und in den Zonen a-c der Läsion II (Abbildung 3.7) die T-Zellen auf ihren Phänotyp hin untersucht. Mittels qPCR wurde die Frequenz von γ - und δ -T-Zellen ermittelt, die T-Zellmarker CD4, CD8, CD25 und der Aktivierungsmarker CD69 analysiert und durch den Nachweis der Transkriptionsfaktoren T-bet, GATA-3, RORC und foxp3 die Frequenz an Th₁, Th₂, Th₁₇ bzw. Th_{reg} bestimmt. Beide Läsionen zeigten ähnliche Tendenzen und auch der Vergleich der einzelnen Randzonen miteinander ergab nur geringe Unterschiede. Der Außenbereich des Läsionsrandes war bei beiden Läsionen insgesamt weniger mit T-Zellen besetzt. Dies zeigte sich an den nach außen hin zunehmenden Zyklusdifferenzen zwischen TCR-GC, TCR-DC, CD4, CD8, CD25, CD69, GATA-3, RORC, T-bet und GUS-b (im Randbereich ca. 5, in der inneren Zone ca. 0-1, Daten nicht gezeigt). Unter den einzelnen Subpopulationen konnte kein vorherrschender Phänotyp ermittelt werden. CD4-, CD8-, Th₁-, Th₂-, Th₁₇- und δ -T-Zellen kamen ähnlich häufig vor, CD25-, CD69- und γ -T-Zellen ca. doppelt so häufig (1 Zyklusdifferenz, Daten nicht gezeigt). Lediglich die regulatorischen T-Zellen bildeten in beiden Läsionen deutlich die kleinste Subpopulation (Zyklusdifferenz zu GUS-b ca. 6, Daten nicht gezeigt). Während die Frequenz der Th_{reg}-Zellen in Läsion I nach außen hin zunahm, zeigte sich in Läsion II keine Tendenz zur inneren oder äußeren Zone des Ulkusrandes. Abschließend wurden mittels qPCR die TCR-Subtypen, Oberflächenproteine und Transkriptionsfaktoren in PBMC, TCL und polyklonal stimulierten TCL des Patienten AP/KB/026/08 gemessen. Der Vergleich dieser Zellpopulationen ergab keinen signifikanten Unterschied (Zyklusdifferenzen < 1, Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deckte sich mit den Ergebnissen der TCR-BV-Ketten-Repertoire-Analyse, in der auch kein Unterschied zwischen Blut und Gewebe erkennbar war.

3.3 Lokale Immunantwort: Zytokinexpression von TCL der Läsion

Wie der Vergleich der TCL aus zwei verschiedenen Läsionen eines Burulipatienten mit den PBMC dieses Patienten zeigte, unterschieden sich TCL und PBMC phänotypisch nicht wesentlich voneinander (vgl. 3.2.3). Dennoch deuteten die intraläsionalen Differenzen im BV-Ketten-Repertoire (vgl. Abbildungen 3.9 und 3.8) auf eine lokale Dynamik der Immunantwort hin, die durch funktionelle Tests der TCL bestätigt oder widerlegt werden sollte. Dazu wurden TCL aus Operationsmaterial und PBMC von Burulipatienten polyklonal mit PMA/Ionomycin stimuliert und die Zytokinexpression mittels Durchflusszytometrie untersucht (exemplarische FACS-Messung in Abbildung 3.12).

a PBMC



b TCL

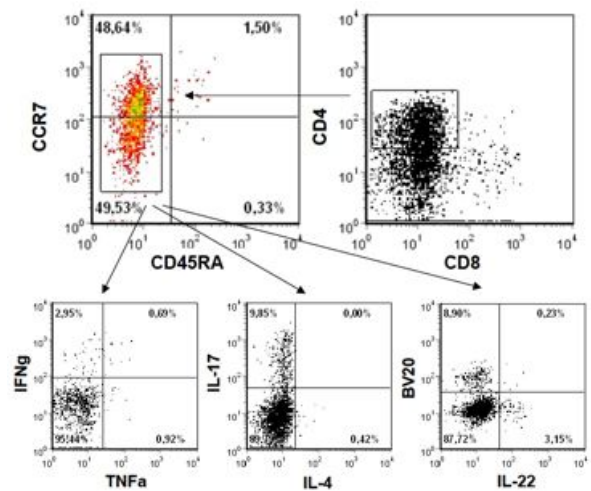


Abbildung 3.12: Exemplarische FACS-Färbung der Analyse der Zytokinexpression von PBMC und TCL nach Stimulation mit PMA/Ionomycin. PBMC bzw. TCL wurden mit Antikörpern gegen CD4, CD8, CD45RA und CCR7 gefärbt und die CD4⁺CD45RA⁻-Zellen hinsichtlich der Expressionsstärke von IFN γ -, TNF α -, IL-4, IL-17, IL-22 analysiert. Die Auswertung des Zytokinexpressionsmusters der BV20-Population ist in einer FACS-Färbung beispielhaft abgebildet.

Aus PBMC und TCL mehrerer Spender wurden die CD4⁺CD45RA⁻-Zellen auf die Expressionsstärke von IFN γ , TNF α , IL-2 (nicht dargestellt), IL-4, IL-17, IL-22 und TGF β (nicht dargestellt) hin untersucht und miteinander verglichen (siehe Abbildung3.12).

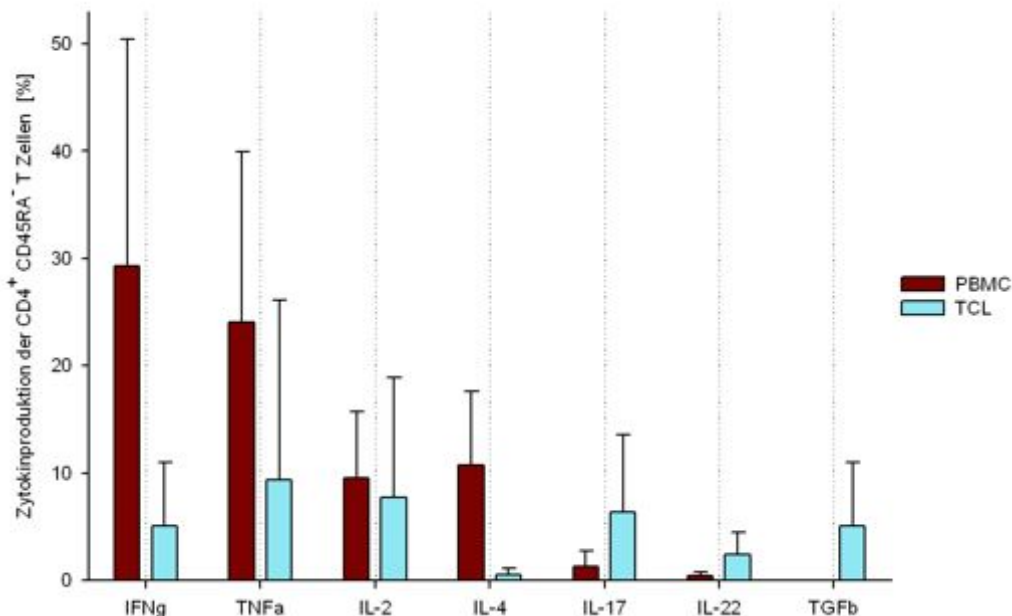


Abbildung 3.13: Zytokinexpressionsstärke in PBMC (n=5) und TCL (n=3). Das Balkendiagramm gibt Mittelwert und Standardabweichung der IFN γ ⁺, TNF α ⁺, IL-4⁺, IL-17⁺, IL-22⁺, IL-2⁺ bzw. TGF β ⁺ CD4⁺ CD45RA⁻-T-Zellen anteilig an allen Gedächtniszellen an.

Die Analyse des BV-Ketten-Repertoires in Läsion I von Patient AP/KB/026/08 ließ eine besondere Rolle der BV20-Subpopulation vermuten. Um eventuelle funktionelle Unterschiede herauszufiltern, wurde zusätzlich die Expressionsstärke der erwähnten Zytokine in BV20⁺- und BV20⁻-T-Zellen verglichen. Dies ergab keine signifikanten Unterschiede (Auswertung nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu den vorhergehenden Analysen zeigten sich funktionelle Unterschiede zwischen den Kompartimenten. Stellte man das geschilderte Zytokinexpressionsspektrum der CD4⁺CD45RA⁻-Subpopulation der PBMC und der TCL einander gegenüber, fielen folgende Tendenzen auf: Typische Th₁-Zytokine wie IFN γ -, TNF α -, IL-2, aber auch das Th₂-Zytokin IL-4 wurden deutlich stärker in PBMC exprimiert (Abbildung 3.13). TCL hingegen zeichneten sich durch eine einerseits quantitativ geringere, andererseits qualitativ vielseitigere Zytokinproduktion aus. Es konnte eine Umverteilung zu typischen Th₁₇-Zytokinen wie IL-17, IL-22 und TGF β festgestellt werden, die von PBMC nur schwach oder gar nicht exprimiert wurden.

4 DISKUSSION

Das Buruli Ulkus ist die dritthäufigste mykobakterielle Erkrankung bei immunkompetenten Menschen. Eine typische Eigenschaft von Mykobakterien ist es, sich durch intrazelluläre Vermehrung in Makrophagen der Immunantwort zu entziehen. *M. ulcerans* nutzt nicht nur diesen *Escape*-Mechanismus, sondern entwickelte im Laufe der Evolution einen weiteren effektiven Mechanismus, der zu einer lang andauernden Infektion in der Haut führt: Ein von *M. ulcerans* produziertes Toxin, das Mykolakton, wirkt bei hoher Konzentration zytotoxisch auf epidermale und subkutane Zellen und löst durch Gewebnekrose eine Ulzeration aus (George *et al.*, 1999). Gleichzeitig verhindern niedrigere Mykolaktonkonzentrationen am Rande des frühen Ulkus eine Reaktion der ortständigen antigenpräsentierenden Zellen, wie Langerhanszellen und Gewebsmakrophagen (Coutanceau *et al.*, 2007). Auf diese Weise gelingt es *M. ulcerans*, sowohl die angeborene schnelle als auch die adaptive verzögerte Immunantwort zu unterdrücken und sich extrazellulär zu vermehren. Mit zunehmender Krankheitsdauer setzt eine erfolgreiche Immunantwort ein, die durch antibiotische Therapie deutlich beschleunigt wird. Diese ist durch massive T-Zell-Infiltration und Granulombildung mit Internalisierung der säurefesten Stäbchen durch Makrophagen gekennzeichnet (Schütte und Pluschke, 2009; Schütte *et al.*, 2007).

Über die Abgrenzung von *M. ulcerans*-Infektionen gegenüber Infektionen mit anderen Mykobakterien wird spekuliert. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, gegen welche mykobakteriellen Antigene die erfolgreiche systemische Immunantwort gerichtet ist und welches Zytokinprofil charakteristisch ist. In dieser Arbeit wurde eine starke Th₁-Reaktion von Burulipatienten auf *M. ulcerans*-Lysat, und nur geringe Th₁-Reaktion auf *M. tuberculosis* H37Rv-Lysat gefunden. Die antigenspezifische T-Zell-Reaktion unterlag sehr großen individuellen Schwankungen. Warum es entweder zur Immunsuppression oder erfolgreichen T-Zell-Antwort kam, konnte durch die klinischen Parameter Behandlungszeitraum, Patientenalter und Krankheitsdauer erklärt werden.

Von großem wissenschaftlichem Interesse sind lokale T-Zellen, die sich im Ulkusrand in direktem Kontakt mit Mykobakterien und Mykolakton befinden. Während die Gewebshistologie in den verschiedenen Krankheitsstadien weitgehend aufgeklärt ist, weiß man nur wenig darüber, wie die lokale T-Zell-Expansion im Läsionsrand erfolgt. Um darüber Aufschluss zu erhalten, wurde in einer Fallstudie bei zwei verschiedenen alten Ulzera eines neunjährigen Patienten das TCR-BV-Ketten-Repertoire bestimmt. Die Untersuchung ergab Hinweise darauf, dass die T-Zellen in der Läsion oligoklonal expandierten. Dieser Effekt war, vermutlich aufgrund zytotoxischer Mykolaktoneffekte, nicht in allen Zonen des Wundrandes vollständig ausgeprägt. Widersprüchliche Ergebnisse existierten über die in der Läsion vorherrschenden Arten von T-Zell-Populationen. Zur Aufklärung darüber konnte der drit-

te Teil dieser Arbeit beitragen. Aus OP-Material von Wundrändern wurden T-Zell-Linien generiert, deren Zytokinexpressionsstärke und -muster im Vergleich zu T-Zellen des peripheren Blutes auf eine niedrigere Th₁-, fehlende Th₂-, aber deutlich stärkere Th₁₇-Antwort hinwiesen.

4.1 Systemische Immunantwort

Zunächst wurde bei ghanaischen BU-Patienten die systemische Immunantwort auf *M. ulcerans*-Antigene mit der Immunantwort auf andere mykobakterielle Antigene verglichen. Diese Arbeit ist die erste Studie, in der *M. ulcerans*-spezifisch stimulierte PBMC verwendet wurden und ein breiteres Spektrum an Th₁-Zytokinen gemessen wurde. Um antigenspezifische Effekte von generellen Effekten abzugrenzen, wurde eine *M. ulcerans*-negative Kontrollgruppe einbezogen, die in derselben Region lebt.

Differenzierung der Immunantwort gegen mykobakterielle Antigene

Trotz großer Heterogenität des Patientenkollektivs konnte eine charakteristische Immunantwort gegen *M. ulcerans* gefunden werden. Das gesamte Patientenkollektiv reagierte auf die mykobakteriellen Proteinderivate und Lysate stärker als die in derselben Gegend lebende Kontrollgruppe (siehe Abbildung 3.2 auf Seite 35). Die trotzdem deutlich bei den Kontrollen vorhandene Reaktion ließ auf den Kontakt mit atypischen Mykobakterien der Umwelt schließen.

Insgesamt unterschieden sich die beiden Gruppen aber nur hinsichtlich der IFN γ - und TNF α -Expression nach Stimulation mit den aufgereinigten mykobakteriellen Proteinderivaten signifikant voneinander. Dies war auf eine zielgerichtete Immunreaktion gegen ein aufgereinigtes Proteinderivat (PPD) zurückzuführen, während das *M. ulcerans*-Lysat aufgrund einer Vielzahl von Proteinen und Lipiden eine sehr variable Immunreaktion bei den einzelnen Spendern hervorrief. Obwohl es sich beim H37Rv-Lysat ebenfalls um ein mykobakterielles sonifiziertes Bakterienlysate mit einer Vielzahl von Proteinen handelte, war hier keine starke Zytokinproduktion unter den PBMC der Burulipatienten messbar. Die Spezifität des Effekts, dass Burulipatienten, die eine starke Immunreaktion auf *M. ulcerans*-Lysat zeigten, gleichzeitig weniger stark auf H37Rv-Lysat reagierten, zeigte die individuelle Verhältnisbildung (siehe Abbildung 3.3 auf Seite 36). So war das Verhältnis zwischen den mykobakteriellen Lysaten sowohl signifikant höher als die Quotienten *M. ulcerans* vs. PPD_{tub} und *M. ulcerans* vs. PPD_{sens}. Dies galt sowohl innerhalb der Patientengruppe als auch für die Vergleiche mit der Kontrollgruppe. Das individuelle Verhältnis *M. ulcerans*-Lysat vs. H37Rv-Lysat stellte demnach ein geeignetes Differenzierungskriterium zwischen Patienten mit einer *M. ulcerans*-Infektion und Patienten mit Kontakt zu Umweltmykobakterien dar.

Ähnliche Versuchsansätze wurden von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt. Dabei wurde entweder mit PPD_{tub}, lebenden *M. ulcerans*-Bakterien oder mit abgetöteten *M. ulcerans*-Stämmen stimuliert. Phillips *et al.* (2006a) verwendeten sonifizierte Bakterienlysate zur Vollblutstimulation, um die Immunreaktion von BU und Tuberkulose (Tb) Patienten zu vergleichen. Hier zeigte sich eine deutlich

stärkere IFN γ -Produktion auf das *M. ulcerans*-Lysat unter den BU-Patienten, während beide Gruppen auf das *M. tuberculosis*-Lysat vergleichbar reagieren. Dieses Resultat entspricht den Ergebnissen dieser Arbeit, in der ebenfalls eine spezifische Reaktion auf *M. ulcerans*-Lysat im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnte.

Welches Protein des Bakterienlysats die höchste immunogene Aktivität besitzt und die antigenspezifische Reaktion hervorruft, kann mithilfe mykobakterieller Proteomanalyse eingegrenzt werden: Interessanterweise hat *M. ulcerans* im Zuge seiner Evolution sein Genmaterial stark reduziert. So ist das *M. ulcerans*-Proteom zu 99,4% mit dem Proteom von *M. tuberculosis* und *M. marinum* identisch (Demangel *et al.*, 2009). Das plasmidkodierte Mykolakton, das wesentlich zum Pathomechanismus von *M. ulcerans* beiträgt, gehört zu den 0,6% des Proteoms, das *M. ulcerans* von *M. tuberculosis* unterscheidet. Die spezifische Immunantwort gegen *M. ulcerans* müsste demnach gegen ein Antigen gerichtet sein, das ausschließlich im *M. ulcerans*-Proteom enthalten ist. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass PBMC der Burulipatienten mit einer stärkeren Zytokinantwort auf das *M. ulcerans*-Lysat und gleichzeitig mit einer geringeren Immunantwort auf das *M. tuberculosis* H37Rv-Lysat reagierten als die Kontrollgruppe. Nur das sukzessive Austesten einzelner Lysatbestandteile wird diese Frage klären.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich die antigenspezifische Immunantwort gegen das *M. ulcerans*-Lysat durch ein spezifisches Multizytokinprofil auszeichnete. Hier stellte die relativ erhöhte, isolierte IL-2-Produktion in der Kontrollgruppe die einzige Abweichung zwischen den Gruppen dar (siehe Abbildung 3.4 auf Seite 38). Es wurde zwar kein einheitliches Zytokinmuster gefunden, dennoch zeichnete sich die antigenspezifische Immunantwort durch eine relativ, wie absolut erhöhte Frequenz multizytokinproduzierender Zellen aus. Damit scheint die Abwehr von *M. ulcerans* am ehesten mit einer polyklonalen Immunreaktion und gesteigerten Kompetenz der einzelnen Zellen einherzugehen.

Immunmodulierende Einflüsse bei Burulipatienten

Anhand der Vergleichsanalyse von mykobakteriellen Antigenen wurde hinreichend gezeigt, dass mit *M. ulcerans* infizierte Patienten eine für *M. ulcerans* spezifische Immunantwort ausbilden. Dies spiegelte sich anhand des signifikant erhöhten individuellen IFN γ - und IL-2-Verhältnisses von *M. ulcerans*-vs. *M. tuberculosis* H37Rv-Lysat wieder. Warum einige Patienten des Kollektivs diese Reaktion nicht zeigten und durch welche Faktoren die Immunantwort gegen *M. ulcerans* beeinflusst wurde, war zunächst unklar.

Der Vergleich der Immunantworten von BCG-vakzinierten BU-Patienten mit nicht-vakzinierten BU-Patienten gegen *M. ulcerans*-Lysat ließ keine signifikanten Unterschiede feststellen. Die BCG-Impfung schien daher keinen protektiven Effekt auf eine *M. ulcerans*-Infektion zu haben. Dieses Ergebnis deckt sich mit Daten von Prévot *et al.* (2004).

Der Einfluss von Antibiotikatherapie und Bakterienlast auf die systemische Immunantwort von Bu-

Burulupatienten wurde anhand von zwei Patientengruppen untersucht: Patienten, die noch keine antibiotische Therapie erhalten hatten und Patienten, die 56 Tage nach WHO-Schema mit Streptomycin/Rifampicin behandelt wurden. Der Vergleich dieser Gruppen mit der im Endemiegebiet lebenden und zusätzlich BCG-vakzinierten Kontrollgruppe zeigte folgendes signifikant veränderte Expressionsmuster typischer Th₁-Zytokine (siehe Abbildung 3.6 auf Seite 42).

Nach polyklonaler Stimulation mit PHA und SEB zeigte sich in der Analyse der Zytokine IFN γ , TNF α , GM-CSF und IL-2 kein Unterschied zwischen Burulupatienten vor Therapie und Burulupatienten nach 56 Tagen Therapie. Diese Daten ließen darauf schließen, dass eine unbehandelte *M. ulcerans*-Infektion keine unspezifische Suppression des immunologischen Gedächtnisses bewirkte. Anders verhielt es sich hingegen mit der antigenspezifischen Immunantwort. Eine adäquate Th₁-Antwort bildeten die mit *M. ulcerans*-Infizierten erst im Laufe ihrer 56tägigen Antibiotikatherapie aus. So erzeugte die Stimulation mit *M. ulcerans*-Lysat bei den Langzeittherapierten eine signifikant stärkere Expression der analysierten Zytokine IFN γ , TNF α , GM-CSF und IL-2. Analog war dies nach PPD_{tub}- und H37Rv-Lysat-Stimulation bei der Expression von IFN γ , TNF α und IL-2 zu beobachten. Nur auf PPD_{sens} reagierten Burulupatienten vor Therapie mit einer ähnlich starken Immunantwort wie die BU-Patienten nach 56tägiger antibiotischer Therapie. Eine starke Reaktion auf PPD_{sens} sprach für eine Infektion mit atypischen Mykobakterien der Umwelt und schien weder von einer *M. ulcerans*-Infektion verändert zu werden, noch einen protektiven Effekt zu haben. Vermutlich führte die *M. ulcerans*-Infektion zur selektiven Suppression der *M. ulcerans*-spezifischen Immunantwort. Nach erfolgreicher Antibiotikatherapie erlangten die BU-Patienten die im nicht therapierten Zustand supprimierte Immunkompetenz zurück.

Der Frage, inwieweit BU-Patienten dazu in der Lage sind, eine *M. ulcerans*-spezifische proinflammatorische Immunantwort auszubilden, gingen bereits zahlreiche Arbeitsgruppen nach. Allerdings unterscheiden sich die in den Studien verwendeten mykobakteriellen Antigene, das Probenmaterial, die Studienpopulation, die Analyseart und nicht zuletzt die Region, aus der die Patienten rekrutiert wurden, so dass ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich ist. Gooding *et al.* (2002) haben durch die Analyse zahlreicher Th₁- und Th₂-Zytokine in einem australischen Endemiegebiet von BU gezeigt, dass nicht mit *M. ulcerans*-infizierte Probanden - im Gegensatz zu BU-Patienten - in der Lage waren, eine effektive Th₁-Antwort auszubilden. Die Immunantwort der BU-Patienten war durch ein Th₂-Zytokinprofil charakterisiert. IFN γ und IL-10 wurden seither repräsentativ als Schlüsselzytokine für die Th₁- bzw. Th₂-Antwort von Prévot *et al.* (2004), Westenbrink *et al.* (2005), Phillips *et al.* (2006a) und Schipper *et al.* (2007) untersucht. Während Prévot *et al.* (2004) die Ergebnisse von Gooding *et al.* (2002) bestätigten, konnten sie die starken individuellen Schwankungen in der Zytokinproduktion zusätzlich den verschiedenen klinischen Stadien der BU Erkrankung zuordnen: So ist das Knotenstadium mit einer hohen IFN γ - und einer niedrigen IL-10-Produktion assoziiert. Im Ulkusstadium verhält es sich umgekehrt. Inwiefern die Th₁-Suppression durch das immunmodulierende IL-10 oder den mit zunehmender Krankheitsdauer steigenden Mykolaktonspiegel vermittelt wird, bleibt unklar. Studien, die in Ghana durchgeführt wurden, (Westenbrink *et al.* (2005), Phillips *et al.*

(2006a) und Schipper *et al.* (2007)) konnten diesen indirekten Th₁-Th₂-Zusammenhang nicht zeigen. Zwar wurden höhere IFN γ -Spiegel in der Gruppe der BU-Patienten im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen des Endemiegebietes nachgewiesen, was konkordant ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Allerdings zeigte sich ebenfalls nach Einteilung des gesamten Patientenkollektivs in Kurzzeit- und Langzeiterkrankte ein differenziertes Bild. Westenbrink *et al.* (2005) orientierten sich hier nur an klinischen Parametern und fanden eine starke Th₁-Antwort im heilenden Spätstadium der Erkrankung. In der Studie von Phillips *et al.* (2006a) zeigten Patienten im Ulkustadium sowohl höhere IFN γ - als auch höhere IL-10-Werte, als Patienten im Knotenstadium, was gegen die gegenseitige Beeinflussung von IFN γ und IL-10 spricht. Die geheilten Patienten zeichneten sich bei Phillips *et al.* (2006a) durch einen hohen IFN γ -Gehalt im Blut aus, während der IL-10-Gehalt rückläufig war. Diesen Effekt sehen sie auch nur nach Stimulation mit *M. ulcerans*-Lysat, welches von keiner der anderen Arbeitsgruppen verwendet wurde. Schipper *et al.* (2007) sind die ersten, die histopathologische Parameter mit dem Zytokinprofil korrelieren. So besteht ein Zusammenhang zwischen erfolgreicher Th₁-Antwort und nicht nekrotisierender Granulombildung im Ulkusrand. Schütte und Pluschke (2009) erklären das Granulom zum vornehmlichen Ort der Antigenpräsentation mit daraus folgender adaptiver Immunantwort und weit weniger zum Ort der Sequestrierung von Mykobakterien. Es wird deutlich, dass der Heilungsprozess zu einer erfolgreichen *M. ulcerans*-spezifischen Th₁-Antwort führt, während die aktive BU Erkrankung sich durch eine verminderte Expression von IFN γ auszeichnet.

Allerdings waren in diesen genannten Arbeiten keine antibiotischen Einflüsse vorhanden. Sarfo *et al.* (2009) beobachteten Burulupatienten über den gesamten Therapiezeitraum. Sie sehen bereits nach vierwöchiger und noch deutlicher nach achtwöchiger antibiotischer Therapie nach dem WHO-Schema (Rifampicin/Streptomycin) signifikant erhöhte IFN γ -Spiegel nach Vollblutstimulation mit sonifiziertem *M. ulcerans*-Lysat. Dieser Effekt ist bei Patienten, deren Therapie erst im ulzerativen Stadium begonnen hatte, stärker ausgeprägt, als bei Patienten im präulzerativem Stadium. Sarfo *et al.* (2009) führen die fehlende akute inflammatorische Immunantwort auf den Effekt des Mykolaktons zurück. Dieser wird durch die antibiotische Therapie aufgehoben und Makrophagen und dendritische Zellen erlangen die Fähigkeit zu Phagozytose und Antigenpräsentation wieder. Warum dennoch bei Patienten im ulzerativen Stadium - unter der antibiotischen Therapie - die Th₁-Antwort stärker ausgebildet ist, führen Sarfo *et al.* (2009) auf den vom Zentrum zur Peripherie der Läsion hin abnehmenden Mykolaktongehalt zurück. Der ist nur im Randgebiet niedrig genug, damit die Immunantwort erfolgreich ablaufen kann. Die Alternativhypothese geht von einer größeren Bakterienlast im Ulkustadium aus, so dass mit sinkender Mykolaktonkonzentration unter antibiotischer Therapie die Th₁-Antwort auch schneller und stärker einsetzen kann.

Wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt, gelang es BU-Patienten bereits nach achtwöchiger antibiotischer Therapie, eine *M. ulcerans*-spezifische Th₁-Antwort auszubilden. Dabei wurden zwar weder individuelle Werte noch verschiedene Krankheitsstadien miteinander verglichen, dennoch korrelierten die Daten dieser Arbeit mit der Studie von Sarfo *et al.* (2009). Zusätzlich ist die antibiotische Therapie hinsichtlich der Erholung des Immunsystems mit dem Effekt eines chirurgischen Eingriffs

vergleichbar. So zeigen Yeboah-Manu *et al.* (2006) bei BU-Patienten nach chirurgischer Wundexzision ebenfalls eine Erholung der im akuten Krankheitsstadium signifikant erniedrigten, systemischen IFN γ -Antwort. Damit wird IFN γ eine inverse Korrelation mit einem hohen Mykolaktongehalt und die ausschlaggebende Rolle in der Ausbildung einer erfolgreichen proinflammatorischen Immunantwort zugeschrieben.

Andere Studien haben sich mit der Frage nach Reversibilität und Selektivität der Mykolakton-induzierten systemischen Immunsuppression befasst. Phillips *et al.* (2009) können bei BU-Patienten im Vergleich zu einer aus derselben Region stammenden Kontrollgruppe eine signifikante verminderte Konzentration an im Blut zirkulierenden Chemokinen (IL-8, MCP-1, MIP-1 β) nachweisen, deren Niveau sich erst 10 Monate nach Ende der antibiotischen Therapie wieder an das Niveau der Kontrollgruppe angeglichen hatte. Stärker ausgeprägte Differenzen ergibt die Vollblutstimulation mit PHA: So werden unter nicht therapierten BU-Patienten im Ulkustadium signifikant niedrigere Spiegel ausgewählter Zytokine (IL-2, IFN γ , IL-4, IL-13, IL-17 und GM-CSF) gemessen, was Phillips *et al.* (2009) einem antigenunspezifischen systemischen Funktionsverlust aller T-Zell-Subpopulationen (Th₂, Th₁ und Th₁₇) zuschreiben. Sie führen ihre Beobachtungen auf eine durch das Mykolakton induzierte T-Zell-Arretierung zurück. Die systemische Wirkung begründen sie mit der Pharmakodynamik des lipophilen Mykolaktons, das im Gegensatz zum Mykobakterium nicht am Ort des Ulkus verbleibt, sondern in das Subkutangewebe abgegeben wird und radiär nach außen diffundiert. Gestützt wird die Hypothese von Ergebnissen in Mausexperimenten, in denen intaktes Mykolakton in Blut- und Milz-Lymphozyten detektiert werden konnte (Hong *et al.*, 2008). Diese Daten sprechen für eine reversible systemische Immunsuppression, die nicht lokal begrenzt ist.

Obwohl sich die Ergebnisse von Phillips *et al.* (2009) zur Erholung der Immunantwort unter antibiotischer Therapie trotz unterschiedlicher Versuchsansätze mit den Daten dieser Arbeit decken, weichen die Ergebnisse zur systemischen Immunsuppression voneinander ab. Während Phillips *et al.* (2009) Vollblut mit PHA stimulieren und die Zytokine im Überstand messen, wurde in dieser Arbeit die Zytokinproduktion nach intrazellulärer Anreicherung in Gedächtnis-T-Zellen bei gleicher Stimulationsdauer gemessen. Phillips *et al.* (2009) sehen bei BU-Patienten eine signifikant verminderte Expression von IL-2, GM-CSF, IL-3, IL-13, IL-17, nicht aber von IFN γ und TNF α . Im Vergleich dazu ließ diese Arbeit nach polyklonaler Stimulation (PHA, SEB) keine signifikanten Unterschiede zwischen BU-Patienten vor und nach Therapie erkennen. Zu widersprüchlichem Ergebnis sind auch weitere Arbeitsgruppen gekommen: Westenbrink *et al.* (2005), die Vollblut mit PHA stimulieren, messen signifikant erniedrigte IFN γ -Werte in BU-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Yeboah-Manu *et al.* (2006) sehen hingegen den immunsupprimierten Effekt nach PHA-Stimulation von PBMC nicht.

Eine mögliche Erklärung liegt im untersuchten Ausgangsmaterial: Während eine Vollblutstimulation von T-Zellen, Monozyten und Granulozyten zeigt, wie der Gesamtorganismus auf aktuelle Einflüsse reagiert, ergibt die gezielte Analyse der Gedächtnis-T-Zellen Aufschluss über vergangene Auseinandersetzungen mit entsprechenden Antigenen. Der immunsuppressive Effekt, der sich in einem temporä-

ren Immunkompetenzverlust niederschlägt, wird entweder durch die selektive Suppression bestimmter Zellpopulationen erzeugt oder ist nur bei Stimulation des Vollblutes deutlich genug ausgeprägt, während die isolierte Analyse der Gedächtnis-T-Zellen nicht für den Nachweis ausreicht. Hinzu kommt ein qualitativer Verlust der Zellen durch die Aufbereitung (Chen *et al.*, 2010). Eine weitere Hypothese basiert auf der Diffusionseigenschaft des Mykolaktons in peripheres Gewebe und Blutgefäße. So kann man davon ausgehen, dass in stimuliertem Vollblut höhere Konzentrationen an Mykolakton vorliegen, als in den isolierten PBMC (Hong *et al.*, 2008). Damit kann sowohl die Reversibilität als auch die aufgehobene Unselektivität der systemischen Immunsuppression begründet werden. Auch die in Mausexperimenten von Hong *et al.* (2008) gezeigte unselektive immunsuppressive Wirkung auf alle mononukleären Blutzellen spricht für die zweite Hypothese.

Dennoch wird auch in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchsansatz die immunmodulierende Wirkung des Mykolaktons ersichtlich: Antibiotisch behandelte BU-Patienten reagierten mit einer starken Immunantwort auf die Stimulation ihrer Gedächtnis-T-Zellen mit fast allen verwendeten mykobakteriellen Antigenen. Unbehandelten BU-Patienten und der Kontrollgruppe fehlt diese Reaktion. Aufgrund des Mykolaktons ist es zu Beginn der Infektion nicht zu einer Auseinandersetzung dendritischer Zellen und ortsständiger Makrophagen mit dem Antigen gekommen, wodurch die adaptive zelluläre Immunantwort mit Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses verhindert wurde. Dieser Effekt ist an der im Zuge der Therapie wiedergewonnenen Immunkompetenz ersichtlich und am deutlichsten nach Stimulation mit *M. ulcerans*-Lysat ausgeprägt.

4.2 Lokale Immunantwort

Nachdem in den untersuchten Gedächtniszellen des peripheren Blutes Hinweise auf spezifische T-Zell-Reaktionen gefunden wurden, sollten diese durch Analyse der lokalen Immunantwort verifiziert werden. Hierzu wurde in einer Fallstudie das Verteilungsmuster von T-Zellen in Abhängigkeit vom Abstand zum Ulkuszentrum untersucht und mit dem im peripheren Blut und in ausgewanderten T-Zell-Linien verglichen. Der anschließende Vergleich des Zytokinexpressionsmuster von TCL (n=3) und PBMC (n=9) ließ statistisch zuverlässigere Aussagen zu.

Fallstudie: TCR-BV-Repertoire im Ulkusrand

Die beiden verschieden alten Ulzera eines anbehandelten Patienten zeigten ein unterschiedliches TCR-BV-Repertoire: Während im älteren Ulkus BV20 den vorherrschenden TCR-Subtyp darstellte, waren in der jüngeren Läsion die Unterketten BV4, BV5 und BV20 signifikant häufiger vertreten (siehe Abbildungen 3.8 auf Seite 44 und 3.9 auf Seite 45).

Dabei waren die TCR-BV-Ketten über die einzelnen Zonen des Ulkusrandes der älteren Läsion in auffälliger Weise verteilt: Die Unterkette BV20 dominierte über alle Zonen hinweg. In der innersten Zone war sie mit 9% ähnlich stark angereichert wie die anderen Subtypen in diesem Areal. Mit zunehmender

Distanz zum Läsionsmittelpunkt nahm sie signifikant an Stärke zu, bis sie in der zweitäußeren Zone einen Wert von fast 25 % erreichte. Vergleicht man allerdings die gemittelten Werte des TCR-BV-Ketten-Repertoires des Gesamtgewebes mit dem des peripheren Blutes, waren die im intraläsionalen Vergleich erkennbaren Effekte vollständig aufgehoben (siehe Abbildung 3.10 auf Seite 46). Dennoch lassen diese Daten eine beginnende monoklonale Expansion einer T-Zell-Subpopulation vermuten, deren TCR die variable Kette 20 trug. Zusätzlich wurden die mittels IL-2-Inkubation aus Gewebe des Ulkusrandes generierten TCL auf ihr TCR-BV-Repertoire untersucht. An dieser Stelle zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zum TCR-BV-Repertoire der PBMC (siehe Abbildung 3.11 auf Seite 47).

Ein anderes Verteilungsmuster ergab die Analyse der jüngeren Läsion: Es lagen verschiedene angereicherte Subtypen vor (BV4, BV5 und BV20), allerdings nicht mit derselben hohen Konzentration wie der dominante Subtyp in der älteren Läsion. Möglicherweise war es hier aufgrund der weniger alten Infektionsstelle noch nicht zu einer so starken T-Zell-Expansion gekommen. Hier zeigte das Gesamtgewebe eine signifikante Anreicherung der Unterketten BV4 und BV5 im Vergleich zum peripheren Blut, während dies in der älteren Läsion trotz der sehr viel stärker angereicherten BV20-Kette nicht der Fall war (vgl. Abbildung 3.10 auf Seite 46). Betrachtete man zusätzlich die TCL, unterschieden sich diese ebenfalls nicht in ihrem TCR-BV-Repertoire vom peripheren Blut (siehe Abbildung 3.11 auf Seite 47).

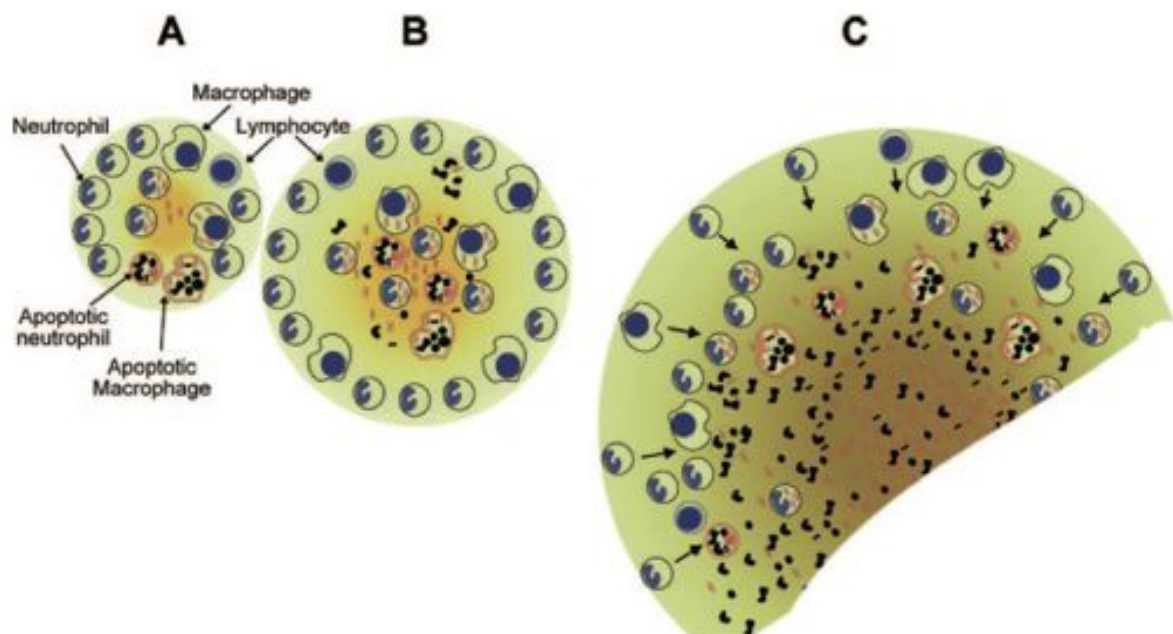


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Zellinfiltration in ein Ulkus im Krankheitsverlauf. (A) Die säurefesten Stäbchen (rot) werden von Makrophagen und Neutrophilen phagozytiert. (B) Die Zahl der Bakterien, abgestorbene Makrophagen und Zellschrott nehmen zu. Die zentrale Nekrose beginnt. (C) Mykolakton ist in der Ulkusmitte maximal angereichert und nimmt entlang seines Diffusionsgradienten nach außen hin ab. Die T-Zell-Infiltration beginnt am äußeren Ulkusrand. (Oliveira *et al.*, 2005)

In der Diskussion der immunologischen Reaktionen im Ulkus, dem Ort des ersten Antigenkontakts, müssen drei Parameter als sich gegenseitig beeinflussende Größen berücksichtigt werden: Erstens die Mykobakterienlast, die im Zentrum der Läsion am größten ist (Rondini *et al.*, 2003; Schütte *et al.*, 2007). Dort führt die hohe Mykolaktonkonzentration zu Gewebsnekrose (George *et al.*, 1999). Mit zunehmender Distanz zum Ulkuszentrum sinkt die Mykolaktonkonzentration, woraufhin die zytotoxische Wirkung in eine immunsuppressive Wirkung übergeht. Es kommt zur selektiven Suppression dendritischer Zellen mit daraus folgender deutlich reduzierter T-Zell-Aktivierung (Coutanceau *et al.*, 2007). Zweitens wirkt die zelluläre Immunantwort mit T-Zell-Infiltration der Mykobakterienausbreitung entgegen. Immunhistologische Studien können eine derartige Zellinfiltration nur peripher der zentralen Nekrose nachweisen (Abbildung 4.1, Oliveira *et al.* 2005). Diese wird durch die dritte Größe, die antibiotische Therapie, massiv verstärkt, so dass sich hochorganisierte lymphoide Strukturen wie Granulome und follikelartige Zellansammlungen entwickeln (Schütte *et al.*, 2007).

Die Ergebnisse der Fallstudie sind mit dem aktuellen Erkenntnisstand vereinbar und konnten in die Modelle eingeordnet werden. Die in den Ulkusrändern beider Läsionen gemessene absolute T-Zell-Infiltration nahm von innen nach außen zu. Auch die relative Verteilung der Subpopulationen veränderte sich. So stieg in der älteren Läsion die vorherrschende BV20-Subpopulation mit zunehmender Distanz zum Läsionsmittelpunkt an. Wahrscheinlich ist das ein Effekt, der der typischen Mykolaktonverteilung und seiner immunsuppressiven Wirkung zuzuschreiben war. Während in der inneren Zone der Mykolaktongehalt hoch genug war, um in den Signalweg der expandierenden T-Zellen einzugreifen und sie in einen anergischen Zustand zu versetzen (Snyder und Small, 2003; George *et al.*, 1999), nahm er zur Peripherie hin ab und die T-Zellen proliferierten erfolgreich.

Diese Ergebnisse ließen eine oligoklonale Expansion von antigenspezifischen T-Zellen vermuten. Allerdings konnten nur im intraläsionalen Vergleich des TCR-BV-Repertoires der einzelnen Zonen des Ulkusrandes Hinweise darauf gefunden werden. Dieser subtil erkennbare und vermutlich durch den direkten Einfluss des Mykolaktons gestörte Prozess war demnach im Vergleich des Gesamtgewebes mit den PBMC des peripheren Blutes nur noch teilweise, im Vergleich der ausgewanderten T-Zell-Linien mit den PBMC gar nicht mehr erkennbar. Die Verteilung der T-Zell-Subpopulationen in den T-Zell-Linien schien bereits die des peripheren Blutes zu repräsentieren.

Zytokinexpressionsmuster

Während TCL und PBMC phänotypisch einander sehr ähnelten, führten die funktionellen Test der TCL zu deutlichen Unterschieden: TCL zeichneten sich nach unspezifischer Stimulation durch ein differenziertes Zytokinprofil aus (siehe Abbildung 3.3 auf Seite 48). So wurden von PBMC die Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-2 und IL-4 stark exprimiert, die Zytokine IL-17, IL-22 und $\text{TGF}\beta$ hingegen nur schwach. Die TCL hingegen exprimierten alle genannten Zytokine in etwa gleich stark. Es fand demnach eine Umverteilung der Zellpopulationen statt: Von einer starken Th_1 -, einer mittelstarken Th_2 - und einer nicht vorhandenen Th_{17} -Zellpopulation hin zu einer mittelstarken Th_1 - und deutlich

vorhandenen Th₁₇-Zellpopulation.

Aktuelle Forschungsergebnisse zur lokalen inflammatorischen Immunantwort beschränken sich auf qPCR-Analysen und immunhistochemische Färbungen von herkömmlichen Zytokinen wie IFN γ , TNF α und IL-10. Analog zu Zytokinanalysen der PBMC wurde von anderen Arbeitsgruppen versucht, ein charakteristisches intraläsionales Zytokinexpressionsmuster einem vorherrschenden klinischen Phänotyp zuzuordnen. So können Prévot *et al.* (2004) einen hohen IFN γ - und zugleich niedrigen IL-10-Spiegel in Patienten im Knotenstadium durch qPCR-Analyse messen, während sich das Verhältnis zugunsten eines hohen IL-10-Gehalt in Patienten im Ulkusstadium ändert. Immunhistochemischen Studien war es nicht gelungen, diesen Effekt in dieser Deutlichkeit zu belegen. Es zeigen sich lediglich Zusammenhänge zwischen vielen IFN γ -, TNF α - und IL-10-positiven Zellen und granulomatösen Strukturen im Ulkusrand (Phillips *et al.*, 2006b; Schipper *et al.*, 2007).

Im Unterschied zu früheren Studien konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal die Produktion von IL-17 und IL-22 von T-Zell-Linien aus Ulkusgewebe anbehandelter Patienten durchflusszytometrisch dargestellt werden. Dies wies auf eine maßgebliche Beteiligung einer weiteren Zellpopulation an der *M. ulcerans*-spezifischen Immunantwort hin.

Interessanterweise waren im Rahmen einer *M. tuberculosis*-Infektion IL-17 und IL-22 bereits als Schlüsselzytokine beschrieben worden. Scriba *et al.* (2008) konnten aus Blut von Tuberkulose-Patienten nach antigenspezifischer Stimulation zwei einzelne, eine IL-17⁺- und eine IL-22⁺-Zellpopulationen identifizieren, die gleichzeitig weder IFN γ noch TNF α produzierten. Phänotypisch handelt es sich vornehmlich um CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁻-Zellen, also T_{CM}-Zellen. Eine Interaktion zwischen den T-Zellpopulationen ist dahingehend aufgeklärt, dass ein hoher Gehalt an klassischen Th₁-Zytokinen zu einer starken IL-17-Suppression führt. Zusätzlich wird in Flüssigkeit aus bronchoalveolärer Lavage von Tb Patienten eine erhöhte IL-22-Konzentration gemessen, was typischerweise von chronischen T-Zell-vermittelten Hautinfektionen bekannt ist.

Einen ähnlichen Effekt lassen auch die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten. So waren unter den T-Zell-Linien ebenfalls vornehmlich T_{CM}-Zellen vertreten, deren IFN γ - und TNF α -Produktion deutlich geringer war, als unter den PBMC. Gleichzeitig war IL-17 stärker vorhanden, was auf eine gegenseitige Modulation dieser T-Zell-Subpopulationen hinwies. Fraglich hingegen war, ob die erhöhte IL-22-Konzentration entweder im Rahmen der mykobakteriellen Infektion oder als ein generelles Merkmal einer chronischen Hautinfektion zu sehen war.

Mit Sicherheit müssen in zukünftigen Versuchsansätzen herkömmliche Hergangeweisen, die lediglich die Th₁-Th₂-Wechselwirkung untersucht hatten, verworfen und eine Interaktion mit weiteren T-Zellpopulationen in Betracht gezogen werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Buruli Ulkus (BU) ist eine infektiöse Erkrankung der Haut und Weichteile, die durch *Mycobacterium (M.) ulcerans* verursacht wird. Sie ist nach Lepra und Tuberkulose die dritthäufigste mykobakterielle Infektion in immunkompetenten Menschen. Am häufigsten kommt BU in Westafrika vor. Weitere Endemiegebiete gibt es in Südamerika, Asien und Australien. Vor allem die Landbevölkerung in Gegenden mit Gewässern und Sumpfland mit feucht tropischem Klima sind von BU betroffen.

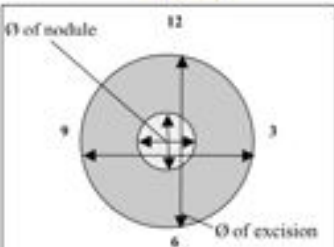
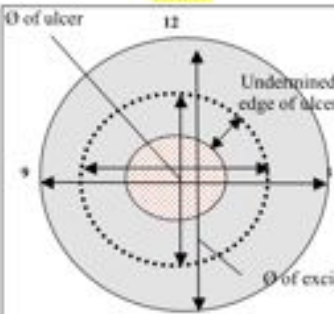
Die klinische Manifestation der *M. ulcerans*-Infektion beginnt mit der präluzerativen Phase, in der sich ein schmerzloser subkutaner Knoten oder Plaque bildet, der sich in der ulzerativen Phase in ein offenes Ulkus verwandelt. Schwere Krankheitsverläufe gehen mit ausgedehnten Ulzera und Weichteilstrukturen bis hin zu Osteomyelitis einher. Während der achtwöchigen antibiotischen Therapie oder spontan bei langer Krankheitsdauer setzt ein Heilungsprozess ein, der mit einer erfolgreichen Th₁-Zell-vermittelten Immunantwort assoziiert ist. Trotz möglicher Kreuzreaktivität nach Kontakt zu atypischen Mykobakterien der Umwelt, Infektion mit *M. tuberculosis* oder Impfung mit BCG konnte eine antigenspezifische T-Zellantwort bei BU-Patienten gefunden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die systemische Immunantwort im peripheren Blut innerhalb einer Patientengruppe, die mit *M. ulcerans* infiziert war, und einer Kontrollgruppe, die Kontakt zu atypischen Mykobakterien der Umwelt hatte, durch Restimulation mit mykobakteriellen Antigenen und intrazellulärer Zytokinmessung im Durchflusszytometer untersucht. Anschließend wurde eine Fallstudie durchgeführt, in der das T-Zell-Rezeptor-BV-Ketten-Repertoire in zwei verschiedenen alten Ulzera und im peripheren Blut mittels quantitativer PCR analysiert wurde. Zusätzlich wurden TCL hinsichtlich ihres Zytokinexpressionsmusters untersucht. Beim Vergleich der *ex-vivo* restimulierten PBMC von BU-Patienten (n=26) und Kontrollen (n=9) zeigte sich eine erhöhte IFN γ -, TNF α -, GM-CSF- und IL-2-Sekretion nach Stimulation mit den Lysaten von *M. ulcerans*, *M. tuberculosis* H37Rv und den aufgereinigten Proteinderivaten des *M. tuberculosis*- and *M. avium*-Stammes. Es wurde beobachtet, dass das Verhältnis von *M. ulcerans*-spezifischen T-Zellen und *M. tuberculosis*-spezifischen T-Zellen innerhalb des selben Spenders ein geeignetes Unterscheidungskriterium zwischen der Infektion mit *M. ulcerans* und dem Kontakt zu anderen Mykobakterien darstellt. Des Weiteren wurde der Einfluss der achtwöchigen antibiotischen Therapie mit Rifampicin/Streptomycin auf die Immunantwort untersucht, indem die Zytokinexpressionsstärke von Patienten vor Therapiebeginn mit der von Patienten nach abgeschlossener Therapie verglichen wurde. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte IFN γ -, TNF α -, GM-CSF- und IL-2-Produktion nach Stimulation mit *M. ulcerans*-Lysat in der Gruppe der therapierten Patienten. Daher ist anzunehmen, dass BU-Patienten erst im Zuge der Therapie und

mit abnehmender mykobakterieller Last eine antigenspezifische proinflammatorische Immunantwort ausbilden. Bei einem neunjährigen Patienten mit zwei verschieden alten Ulzera zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung der TCR-BV-Ketten sowohl abhängig von der Distanz zum Ulkuszentrum als auch im Vergleich der beiden Ulzera miteinander. Im ersten Ulkus konnte ein dominanter BV-Ketten-Subtyp identifiziert werden, dessen Ausprägung zwischen den Randzonen variierte. Im zweiten Ulkus unterschied sich das BV-Ketten-Repertoire von dem des peripheren Blutes. Dies lässt eine oligoklonale Expansion *M. ulcerans*-spezifischer T-Zellen vermuten. Die Auswertung der TCL aus dem Ulkusrand ergab im Vergleich zu den PBMC eine verminderte Expressionsstärke der Zytokine IFN γ -, TNF α -, IL-2 und IL-4 bei gleichzeitig erhöhter Expression von IL-17 und IL-22. Die antigenspezifische Immunantwort im Rahmen der lokalen Abwehr von *M. ulcerans* scheint sich durch ein breiteres Zytokinspektrum als im peripheren Blut auszuzeichnen.

BURULICO – WP3 and WP5 – DT site

F: Distance from Center of Nodule / from Edge of Ulcer

<p style="text-align: center;">Nodule</p>  <p>Ø of nodule mm Ø of excised tissue mm</p>	<p>FNA <input type="checkbox"/> from center of nodule</p> <p>tissue punch <input type="checkbox"/> from center of nodule</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th></th> <th>swab</th> <th>FNA</th> <th>tissue-punch</th> <th>tissue-surgery</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PCR</td> <td></td> <td>O</td> <td>O</td> <td></td> </tr> <tr> <td>MIC</td> <td></td> <td>O</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>CUL</td> <td></td> <td></td> <td>O</td> <td></td> </tr> <tr> <td>IMM</td> <td></td> <td></td> <td>O</td> <td></td> </tr> <tr> <td>HIE O</td> <td>HIF O</td> <td>CMI O</td> <td>RNA O</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		swab	FNA	tissue-punch	tissue-surgery	PCR		O	O		MIC		O			CUL			O		IMM			O		HIE O	HIF O	CMI O	RNA O	
	swab	FNA	tissue-punch	tissue-surgery																											
PCR		O	O																												
MIC		O																													
CUL			O																												
IMM			O																												
HIE O	HIF O	CMI O	RNA O																												
<p style="text-align: center;">Ulcer</p>  <p>Ø of ulcer mm Ø of excised tissue mm</p>	<p>swab <input type="checkbox"/> circling entire undermined edge</p> <p>FNA <input type="checkbox"/> in subcutaneous tissue, max. distance from margin of ulcer: 1-2 cm</p> <p>tissue punch <input type="checkbox"/> from undermined edge of ulcer including necrotic tissue</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th></th> <th>swab</th> <th>FNA</th> <th>tissue-punch</th> <th>tissue-surgery</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PCR</td> <td>O</td> <td>O</td> <td>O</td> <td></td> </tr> <tr> <td>MIC</td> <td>O</td> <td>O</td> <td>O</td> <td></td> </tr> <tr> <td>CUL</td> <td></td> <td></td> <td>O</td> <td></td> </tr> <tr> <td>IMM</td> <td></td> <td></td> <td>O</td> <td></td> </tr> <tr> <td>HIE O</td> <td>HIF O</td> <td>CMI O</td> <td>RNA O</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		swab	FNA	tissue-punch	tissue-surgery	PCR	O	O	O		MIC	O	O	O		CUL			O		IMM			O		HIE O	HIF O	CMI O	RNA O	
	swab	FNA	tissue-punch	tissue-surgery																											
PCR	O	O	O																												
MIC	O	O	O																												
CUL			O																												
IMM			O																												
HIE O	HIF O	CMI O	RNA O																												
<p style="text-align: center;">Non ulcerative tissue</p> <p>papule <input type="checkbox"/></p> <p>plaque <input type="checkbox"/></p> <p>edema <input type="checkbox"/></p> <p>Ø of non ulcer. tissue mm Ø of excised tissue mm</p>	<p>FNA <input type="checkbox"/> from center of non-ulcer. lesion</p> <p>tissue punch <input type="checkbox"/> from center of non-ulcer. Lesion</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th></th> <th>swab</th> <th>FNAs</th> <th>tissue-punch</th> <th>tissue-surgery</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PCR</td> <td></td> <td>O</td> <td>O</td> <td></td> </tr> <tr> <td>MIC</td> <td></td> <td>O</td> <td>O</td> <td></td> </tr> <tr> <td>CUL</td> <td></td> <td></td> <td>O</td> <td></td> </tr> <tr> <td>IMM</td> <td></td> <td></td> <td>O</td> <td></td> </tr> <tr> <td>HIE O</td> <td>HIF O</td> <td>CMI O</td> <td>RNA O</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		swab	FNAs	tissue-punch	tissue-surgery	PCR		O	O		MIC		O	O		CUL			O		IMM			O		HIE O	HIF O	CMI O	RNA O	
	swab	FNAs	tissue-punch	tissue-surgery																											
PCR		O	O																												
MIC		O	O																												
CUL			O																												
IMM			O																												
HIE O	HIF O	CMI O	RNA O																												

Taking of blood (PBMC = peripheral blood mononuclear cells):
2 x 5.5 ml syringes (NH₂-Heparin)

6.2 Patientenaufklärung

Committee on Human Research, Publications and Ethics
 School of Medical Sciences, Kwame Ninsin University of Science and Technology
 Kumasi, Ghana. Tel: 233-51 22901-4 ext 1228. Email: chre.knust.koh@gmail.com

INFORMED CONSENT FORM

INFORMATION SHEET

Title of the research:

Immunological protection against Buruli ulcer disease (BUD).
 A study of immune mechanism against the bacterium causing BUD.

Name(s) and affiliation(s) of researcher(s) of applicant(s):

Prof. Adjei, KCCR
 Prof. Fleisher, BNITM
 Dr. Bortol, LMU

Purpose(s) of research:

The purpose of this research is to find out how your immune system defends your body against the bacterium causing BUD. The defending cells are isolated from your blood and from tiny pieces of your skin and are analysed to find out how a vaccine has to be designed to finally allow protection against the disease.

Procedure of the research, what shall be required of each participant and approximate total number of participants that would be involved in the research:

From participants that are suspected to have BUD, a small amount of blood and tiny pieces of skin (5 mm diameter) will be taken under local anaesthesia (together with a diagnostic specimen). Thus the biopsy will not cause pain.
 From patients with BUD that are under treatment the same will be performed if there is need to take specimens from a medical point of view, according your attending physician.
 From patients that need surgery for wound treatment a piece of the excised tissue is used and the small amount blood is taken. This is done during operation under general anaesthesia, at the same time also a diagnostic specimen is collected.
 The defending white cells will then be isolated from the blood and from the skin pieces and analysed to find out how your body reacts against the bacterium. This is a prerequisite to design a vaccine for protection against BUD.
 In total we expect to recruit 50 participants into this study throughout the country.

Risk(s):

Taking the small amount of blood needed can cause some pain if the needle does not find the blood vessel easily. Taking a small piece of skin by a biopsy can in very unlikely circumstances damage nerves, blood vessels or tendons under the skin.

Benefit(s):

If you are a new patient, you will get a additional diagnostic test with a novel and very sensitive method to see if you really have BUD. The goal of this research is to find ways of protecting against BUD. There are many people affected and a vaccine would be very helpful. However there is still much research to do before the vaccine is ready for use.

Confidentiality:

All samples collected in this study will be given code numbers and no name will be recorded. This cannot be linked to you in anyway and your name or any identifier will not be used in any publication or reports from this study.

Voluntariness:

Your participation in this research is entirely voluntary.

Alternatives to participation:

If you choose not to participate, this will not affect your treatment in this hospital in any way.

Consequences of participants' decision to withdraw from research and procedure for orderly termination of participation:

Blood or a skin sample will be taken only once. After this your participation has ended. If you wish that your sample should not be processed further we can remove and discard it upon written notice.

6.3 Einwilligungserklärung

Committee on Human Research, Publications and Ethics
 School of Medical Sciences, Kwame Ninsin University of Science and Technology
 Kumasi, Ghana. Tel: 233-51 22901-4 ext 1228. Email: chre.knust.koh@gmail.com

INFORMED CONSENT FORM

INFORMATION SHEET

Title of the research:

Immunological protection against Buruli ulcer disease (BUD).
 A study of immune mechanism against the bacterium causing BUD.

Name(s) and affiliation(s) of researcher(s) of applicant(s):

Prof. Adjei, KCCR
 Prof. Fleisher, BNITM
 Dr. Bortol, LMU

Purpose(s) of research:

The purpose of this research is to find out how your immune system defends your body against the bacterium causing BUD. The defending cells are isolated from your blood and from tiny pieces of your skin and are analysed to find out how a vaccine has to be designed to finally allow protection against the disease.

Procedure of the research, what shall be required of each participant and approximate total number of participants that would be involved in the research:

From participants that are suspected to have BUD, a small amount of blood and tiny pieces of skin (5 mm diameter) will be taken under local anaesthesia (together with a diagnostic specimen). Thus the biopsy will not cause pain. From patients with BUD that are under treatment the same will be performed if there is need to take specimens from a medical point of view, according your attending physician. From patients that need surgery for wound treatment a piece of the excised tissue is used and the small amount blood is taken. This is done during operation under general anaesthesia, at the same time also a diagnostic specimen is collected. The defending white cells will then be isolated from the blood and from the skin pieces and analysed to find out how your body reacts against the bacterium. This is a prerequisite to design a vaccine for protection against BUD. In total we expect to recruit 50 participants into this study throughout the country.

Risk(s):

Taking the small amount of blood needed can cause some pain if the needle does not find the blood vessel easily. Taking a small piece of skin by a biopsy can in very unlikely circumstances damage nerves, blood vessels or tendons under the skin.

Benefit(s):

If you are a new patient, you will get a additional diagnostic test with a novel and very sensitive method to see if you really have BUD. The goal of this research is to find ways of protecting against BUD. There are many people affected and a vaccine would be very helpful. However there is still much research to do before the vaccine is ready for use.

Confidentiality:

All samples collected in this study will be given code numbers and no name will be recorded. This cannot be linked to you in anyway and your name or any identifier will not be used in any publication or reports from this study.

Voluntariness:

Your participation in this research is entirely voluntary.

Alternatives to participation:

If you choose not to participate, this will not affect your treatment in this hospital in any way.

Consequences of participants' decision to withdraw from research and procedure for orderly termination of participation:

Blood or a skin sample will be taken only once. After this your participation has ended. If you wish that your sample should not be processed further we can remove and discard it upon written notice.

6.4 Einwilligungserklärung der Fallstudie des Patienten AP/KB/026/08

Committee on Human Research, Publications and Ethics
School of Medical Sciences, Kwame Nkrumah University of Science and Technology
Kumasi, Ghana. Tel: 233 51 22301-4 ext 1128. Email: chrpe.knust.kath@gmail.com

CONSENT FORM

Statement of person obtaining informed consent:

I have fully explained this research to [REDACTED] and have given sufficient information, including about risks and benefits, to make an informed decision.

DATE: 23/10/08 SIGNATURE: _____ [REDACTED]

NAME: _____ [REDACTED]

Statement of person giving consent:

I have read the description of the research or have had it translated into language I understand. I have also talked it over with the interviewer to my satisfaction. I understand that my participation is voluntary. I know enough about the purpose, methods, risks and benefits of the research study to judge that I want to take part in it. I understand that I may freely stop being part of this study at any time. I have received a copy of this consent form and additional information sheet to keep for myself

DATE: 23/10/08 SIGNATURE/THUMB PRINT: _____ [REDACTED]

WITNESS' SIGNATURE (if applicable): _____ [REDACTED]

WITNESS' NAME (if applicable): _____ [REDACTED]

Literaturverzeichnis

- ADUSUMILLI S, MVE-OBIANG A, SPARER T, MEYERS W, HAYMAN J und SMALL P L C. Mycobacterium ulcerans toxic macrolide, mycolactone modulates the host immune response and cellular location of M. ulcerans in vitro and in vivo. *Cell Microbiol* 7(9): 1295–304. **2005**
- AMOFFAH G K, SAGOE-MOSES C, ADJEL-ACQUAH C und FRIMPONG E H. Epidemiology of Buruli ulcer in Amansie West district, Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87(6): 644–5. **1993**
- ASIEDU K, SCHERPBIER R und RAVIGLIONE M. Mycobacterium ulcerans infection. *World Health Organization, Global Buruli Ulcer Initiative* **2000**
- BOULKROUN S, GUENIN-MACÉ L, THOULOUBE M I, MONOT M, MERCKX A, LANGSLEY G, BISMUTH G, DI BARTOLO V und DEMANGEL C. Mycolactone suppresses T cell responsiveness by altering both early signaling and posttranslational events. *J Immunol* 184(3): 1436–44. **2010**
- CHAUTY A, ARDANT M F, ADEYE A, EUVERTE H, GUÉDÉNON A, JOHNSON C, AUBRY J, NURMBERGER E und GROSSET J. Promising clinical efficacy of streptomycin-rifampin combination for treatment of buruli ulcer (Mycobacterium ulcerans disease). *Antimicrob Agents Chemother* 51(11): 4029–35. **2007**
- CHEN J, BRUNS A H, DONNELLY H K und WUNDERINK R G. Comparative in vitro stimulation with lipopolysaccharide to study TNFalpha gene expression in fresh whole blood, fresh and frozen peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods* 357(1-2): 33–7. **2010**
- COUTANCEAU E, DECALF J, MARTINO A, BABON A, WINTER N, COLE S T, ALBERT M L und DEMANGEL C. Selective suppression of dendritic cell functions by Mycobacterium ulcerans toxin mycolactone. *J Exp Med* 204(6): 1395–403. **2007**
- DEBACKER M, AGUIAR J, STEUNOU C, ZINSOU C, MEYERS W M, GUÉDÉNON A, SCOTT J T, DRAMAIX M und PORTAELS F. Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer) in rural hospital, Southern Benin, 1997-2001. *Emerg Infect Dis* 10(8): 1391–8. **2004a**
- DEBACKER M, AGUIAR J, STEUNOU C, ZINSOU C, MEYERS W M, SCOTT J T, DRAMAIX M und PORTAELS F. Mycobacterium ulcerans disease: role of age and gender in incidence and morbidity. *Trop Med Int Health* 9(12): 1297–304. **2004b**
- DEMANGEL C, STINEAR T P und COLE S T. Buruli ulcer: reductive evolution enhances pathogenicity of Mycobacterium ulcerans. *Nat Rev Microbiol* 7(1): 50–60. **2009**
- DIAZ D, DÖBELI H, YEBOAH-MANU D, MENSAH-QUAINOO E, FRIEDLEIN A, SODER N, RONDINI S, BODMER T und PLUSCHKE G. Use of the immunodominant 18-kiloDalton small heat

- shock protein as a serological marker for exposure to *Mycobacterium ulcerans*. *Clin Vaccine Immunol* 13(12): 1314–21. **2006**
- DOBOS K M, SMALL P L, DESLAURIERS M, QUINN F D und KING C H. *Mycobacterium ulcerans* cytotoxicity in an adipose cell model. *Infect Immun* 69(11): 7182–6. **2001**
- EDDYANI M und PORTAELS F. Survival of *Mycobacterium ulcerans* at 37 degrees C. *Clin Microbiol Infect* 13(10): 1033–5. **2007**
- EN J, GOTO M, NAKANAGA K, HIGASHI M, ISHII N, SAITO H, YONEZAWA S, HAMADA H und SMALL P L C. Mycolactone is responsible for the painlessness of *Mycobacterium ulcerans* infection (buruli ulcer) in a murine study. *Infect Immun* 76(5): 2002–7. **2008**
- GAGLANI M J und BALLAY T. Picture of the month. *Mycobacterium marinum* facial abscess. *Arch Pediatr Adolesc Med* 153(5): 543–4. **1999**
- GEORGE K M, CHATTERJEE D, GUNAWARDANA G, WELTY D, HAYMAN J, LEE R und SMALL P L. Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science* 283(5403): 854–7. **1999**
- GONZALEZ V D, BJÖRKSTRÖM N K, MALMBERG K J, MOLL M, KUYLENSTIERNA C, MICHAËLSSON J, LJUNGGREN H G und SANDBERG J K. Application of nine-color flow cytometry for detailed studies of the phenotypic complexity and functional heterogeneity of human lymphocyte subsets. *J Immunol Methods* 330(1-2): 64–74. **2008**
- GOODING T M, JOHNSON P D R, SMITH M, KEMP A S und ROBINS-BROWNE R M. Cytokine profiles of patients infected with *Mycobacterium ulcerans* and unaffected household contacts. *Infect Immun* 70(10): 5562–7. **2002**
- HERBINGER K H, ADJEI O, AWUA-BOATENG N Y, NIENHUIS W A, KUNAA L, SIEGMUND V, NITSCHKE J, THOMPSON W, KLUTSE E, AGBENORKU P, SCHIPF A, REU S, RACZ P, FLEISCHER B, BEISSNER M, FLEISCHMANN E, HELFRICH K, VAN DER WERF T S, LÖSCHER T und BRETZEL G. Comparative study of the sensitivity of different diagnostic methods for the laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease. *Clin Infect Dis* 48(8): 1055–64. **2009**
- HONG H, COUTANCEAU E, LECLERC M, CALEECHURN L, LEADLAY P F und DEMANGEL C. Mycolactone diffuses from *Mycobacterium ulcerans*-infected tissues and targets mononuclear cells in peripheral blood and lymphoid organs. *PLoS Negl Trop Dis* 2(10): e325. **2008**
- JUNGHANSS T, UM BOOCK A, VOGEL M, SCHUETTE D, WEINLAEDER H und PLUSCHKE G. Phase change material for thermotherapy of Buruli ulcer: a prospective observational single centre proof-of-principle trial. *PLoS Negl Trop Dis* 3(2): e380. **2009**
- KISZEWSKI A E, BECERRIL E, AGUILAR L D, KADER I T A, MYERS W, PORTAELS F und HERNÁNDEZ PANDO R. The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease. *Clin Exp Immunol* 143(3): 445–51. **2006**
- MACCALLUM P und TOLHURST J C. A new mycobacterial infection in man. *J Pathol Bacteriol* 60(1): 93–122. **1948**

- MARSTON B J, DIALLO M O, HORSBURGH C R JR, DIOMANDE I, SAKI M Z, KANGA J M, PATRICE G, LIPMAN H B, OSTROFF S M und GOOD R C. Emergence of Buruli ulcer disease in the Daloa region of Cote d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg* 52(3): 219–24. **1995**
- NIENHUIS W A, STIENSTRA Y, THOMPSON W A, AWUAH P C, ABASS K M, TUAH W, AWUA-BOATENG N Y, AMPADU E O, SIEGMUND V, SCHOUTEN J P, ADJEI O, BRETZEL G und VAN DER WERF T S. Antimicrobial treatment for early, limited *Mycobacterium ulcerans* infection: a randomised controlled trial. *Lancet* 375(9715): 664–72. **2010**
- O'BRIEN D P, HUGHES A J, CHENG A C, HENRY M J, CALLAN P, McDONALD A, HOLTEN I, BIRRELL M, SOWERBY J M, JOHNSON P D R und ATHAN E. Outcomes for *Mycobacterium ulcerans* infection with combined surgery and antibiotic therapy: findings from a south-eastern Australian case series. *Med J Aust* 186(2): 58–61. **2007**
- OLIVEIRA M S, FRAGA A G, TORRADO E, CASTRO A G, PEREIRA J P, FILHO A L, MILANEZI F, SCHMITT F C, MEYERS W M, PORTAELS F, SILVA M T und PEDROSA J. Infection with *Mycobacterium ulcerans* induces persistent inflammatory responses in mice. *Infect Immun* 73(10): 6299–310. **2005**
- PAHLEVAN A A, WRIGHT D J, ANDREWS C, GEORGE K M, SMALL P L und FOXWELL B M. The inhibitory action of *Mycobacterium ulcerans* soluble factor on monocyte/T cell cytokine production and NF-kappa B function. *J Immunol* 163(7): 3928–35. **1999**
- PHILLIPS R, HORSFIELD C, KUIJPER S, SARFO S F, OBENG-BAAH J, ETUAFUL S, NYAMEKYE B, AWUAH P, NYARKO K M, OSEI-SARPONG F, LUCAS S, KOLK A H J und WANSBROUGH-JONES M. Cytokine response to antigen stimulation of whole blood from patients with *Mycobacterium ulcerans* disease compared to that from patients with tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 13(2): 253–7. **2006a**
- PHILLIPS R, HORSFIELD C, MANGAN J, LAING K, ETUAFUL S, AWUAH P, NYARKO K, OSEI-SARPONG F, BUTCHER P, LUCAS S und WANSBROUGH-JONES M. Cytokine mRNA expression in *Mycobacterium ulcerans*-infected human skin and correlation with local inflammatory response. *Infect Immun* 74(5): 2917–24. **2006b**
- PHILLIPS R, SARFO F S, GUENIN-MACÉ L, DECALF J, WANSBROUGH-JONES M, ALBERT M L und DEMANGEL C. Immunosuppressive signature of cutaneous *Mycobacterium ulcerans* infection in the peripheral blood of patients with buruli ulcer disease. *J Infect Dis* 200(11): 1675–84. **2009**
- PORTAELS F, MEYERS W M, ABLORDEY A, CASTRO A G, CHEMLAL K, DE RIJK P, ELSSEN P, FISSETTE K, FRAGA A G, LEE R, MAHROUS E, SMALL P L C, STRAGIER P, TORRADO E, VAN AERDE A, SILVA M T und PEDROSA J. First cultivation and characterization of *Mycobacterium ulcerans* from the environment. *PLoS Negl Trop Dis* 2(3): e178. **2008**
- PORTAELS F, SILVA M T und MEYERS W M. Buruli ulcer. *Clin Dermatol* 27(3): 291–305. **2009**
- PRÉVOT G, BOURREAU E, PASCALIS H, PRADINAUD R, TANGHE A, HUYGEN K und LAUNOIS

- P. Differential production of systemic and intralésional gamma interferon and interleukin-10 in nodular and ulcerative forms of Buruli disease. *Infect Immun* 72(2): 958–65. **2004**
- RONDINI S, MENSAH-QUAINOO E, TROLL H, BODMER T und PLUSCHKE G. Development and application of real-time PCR assay for quantification of *Mycobacterium ulcerans* DNA. *J Clin Microbiol* 41(9): 4231–7. **2003**
- SARFO F S, PHILLIPS R O, AMPADU E, SARPONG F, ADENTWE E und WANSBROUGH-JONES M. Dynamics of the cytokine response to *Mycobacterium ulcerans* during antibiotic treatment for *M. ulcerans* disease (Buruli ulcer) in humans. *Clin Vaccine Immunol* 16(1): 61–5. **2009**
- SCHIPPER H S, RUTGERS B, HUITEMA M G, ETUAFUL S N, WESTENBRINK B D, LIMBURG P C, TIMENS W und VAN DER WERF T S. Systemic and local interferon-gamma production following *Mycobacterium ulcerans* infection. *Clin Exp Immunol* 150(3): 451–9. **2007**
- SCHÜTTE D und PLUSCHKE G. Immunosuppression and treatment-associated inflammatory response in patients with *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer). *Expert Opin Biol Ther* 9(2): 187–200. **2009**
- SCHÜTTE D, UM-BOOCK A, MENSAH-QUAINOO E, ITIN P, SCHMID P und PLUSCHKE G. Development of highly organized lymphoid structures in Buruli ulcer lesions after treatment with rifampicin and streptomycin. *PLoS Negl Trop Dis* 1(1): e2. **2007**
- SCRIBA T J, KALSDORF B, ABRAHAMS D A, ISAACS F, HOFMEISTER J, BLACK G, HASSAN H Y, WILKINSON R J, WALZL G, GELDERBLOEM S J, MAHOMED H, HUSSEY G D und HANEKOM W A. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J Immunol* 180(3): 1962–70. **2008**
- SNYDER D S und SMALL P L C. Uptake and cellular actions of mycolactone, a virulence determinant for *Mycobacterium ulcerans*. *Microb Pathog* 34(2): 91–101. **2003**
- STRAGIER P, ABLORDEY A, BAYONNE L M, LUGOR Y L, SINDANI I S, SUYKERBUYK P, WABINGA H, MEYERS W M und PORTAELS F. Heterogeneity among *Mycobacterium ulcerans* isolates from Africa. *Emerg Infect Dis* 12(5): 844–7. **2006**
- VAN DER WERF T S, STIENSTRA Y, JOHNSON R C, PHILLIPS R, ADJEI O, FLEISCHER B, WANSBROUGH-JONES M H, JOHNSON P D R, PORTAELS F, VAN DER GRAAF W T A und ASIEDU K. *Mycobacterium ulcerans* disease. *Bull World Health Organ* 83(10): 785–91. **2005**
- WALSH D S, MEYERS W M, PORTAELS F, LANE J E, MONGKOLSIRICHAIKUL D, HUSSEM K, GOSI P und MYINT K S A. High rates of apoptosis in human *Mycobacterium ulcerans* culture-positive buruli ulcer skin lesions. *Am J Trop Med Hyg* 73(2): 410–5. **2005**
- WALTERS G und ALEXANDER S I. T cell receptor BV repertoires using real time PCR: a comparison of SYBR green and a dual-labelled HuTrec fluorescent probe. *J Immunol Methods* 294(1-2): 43–52. **2004**
- WANSBROUGH-JONES M und PHILLIPS R. Buruli ulcer: emerging from obscurity. *Lancet* 367(9525): 1849–58. **2006**

- WESTENBRINK B D, STIENSTRA Y, HUITEMA M G, THOMPSON W A, KLUTSE E O, AMPADU E O, BOEZEN H M, LIMBURG P C und VAN DER WERF T S. Cytokine responses to stimulation of whole blood from patients with Buruli ulcer disease in Ghana. *Clin Diagn Lab Immunol* 12(1): 125–9. **2005**
- YEBOAH-MANU D, PEDUZZI E, MENSAH-QUAINOO E, ASANTE-POKU A, OFORI-ADJEI D, PLUSCHKE G und DAUBENBERGER C A. Systemic suppression of interferon-gamma responses in Buruli ulcer patients resolves after surgical excision of the lesions caused by the extracellular pathogen *Mycobacterium ulcerans*. *J Leukoc Biol* 79(6): 1150–6. **2006**

Abbildungsverzeichnis

1.1	Weltweite Endemiegebiet des Buruli Ulkus	2
1.2	Endemische Verteilung des Buruli Ulkus in Afrika	2
1.3	Strukturformel von Mykolakton B	4
1.4	Wundbilder von Burulipatienten ((A) A/MI/349/08 und (B) A/AJ/359/08) im präluzerativen Stadium	5
1.5	Bilder eines nicht therapierten BU-Patienten (A/EA/352/08) im Ulkusstadium (A) im Vergleich zu einem therapierten BU-Patienten (A/AM/353/08) im Ulkusstadium (B)	5
1.6	Patient (A/MI/351/08) mit Narbe nach einer Hauttransplantation nach Buruli Ulkus an der rechten Schulter	6
1.7	Ziehl-Neelsen Färbung eines histologischen Präparats eines Ulkusrands	7
1.8	Schema der Zellinfiltration eines heilenden Ulkusrands	8
1.9	Modell des zytotoxischen und apoptotischen Effekts von Mykolakton auf Immunzellen	12
2.1	Auswertungsschema einer intrazellulären FACS-Messung zur Analyse der Zytokinexpression nach Stimulation mit SEB	27
2.2	Auswertungsschema einer intrazellulären FACS-Messung zur Analyse der Multizytokinexpression nach Stimulation mit SEB	28
2.3	Übersicht über die verwendeten Ausgangsmaterialien und Analyseverfahren	32
3.1	Zytokinproduktion der CD4 ⁺ -Subpopulationen von Burulipatienten nach Stimulation mit <i>M. ulcerans</i> -Lysat	34
3.2	IFN γ -Expression der CD4 ⁺ CD45RA ⁺ -T-Zellen von Buruli- und Kontrollpatienten	35
3.3	Individuelles Verhältnis der Zytokinexpression von PBMC von Burulipatienten mit > 0,1% <i>M. ulcerans</i> -spezifischer Zytokinexpression und BCG-vakzinierten Kontrollen	36
3.4	Multizytokinproduktion nach Stimulation mit SEB, PPDsens und <i>M. ulcerans</i> -Lysat bei Buruli- und Kontrollpatienten	38
3.5	IFN γ -Expression der CD4 ⁺ CD45RA ⁻ -T-Zellen von Burulipatienten nach Stimulation mit <i>M. ulcerans</i> -Lysat in Korrelation zum Patientenalter	39
3.6	Zytokinexpression der CD4 ⁺ CD45RA ⁻ -T-Zellen von 56 Tage behandelten und unbehandelten Burulipatienten im Vergleich zu BCG-vakzinierten Kontrollen	42
3.7	Bilder der beiden Ulzera von Patient AP/KB/026/08 vor Operation	43
3.8	Analyse des TCR-BV-Repertoires der vier Randzonen von Läsion I	44
3.9	Analyse des TCR-BV-Repertoires der drei Randzonen von Läsion II	45
3.10	TCR-BV-Repertoire im Gesamtrand (a-d) der Läsion I bzw. im Gesamtrand (a-c) der Läsion II im Vergleich mit PBMC.	46
3.11	TCR-BV-Repertoire der TCL von Läsion I bzw. II im Vergleich mit PBMC	47

3.12 Exemplarische FACS-Färbung der Analyse der Zytokinexpression von PBMC und TCL nach Stimulation mit PMA/Ionomycin.	49
3.13 Expressionstärke typischer Th ₁ -, Th ₂ - und Th ₁₇ -Zytokine von PBMC und TCL.	49
4.1 Schematische Darstellung der Zellinfiltration in ein Ulkus im Krankheitsverlauf	58