Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Ulm

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Stenger

# Antigen- und sauerstoffabhängige Steigerung der Expression des antimikrobiellen Peptids Granulysin durch den Hypoxie-induzierten Faktor-1α (HIF-1α) in humanen T-Lymphozyten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von Esra Schercher

aus Aalen

2017

| | |
|---|---|
| **Amtierender Dekan:** | **Prof. Dr. T. Wirth** |
| **1. Berichterstatter:** | **Prof. Dr. S. Stenger** |
| **2. Berichterstatter:** | **Prof. Dr. C. Sinzger** |
| **Tag der Promotion:** | **14.06.2018** |

**Inhaltsverzeichnis**

**Abkürzungsverzeichnis ..... III**

**1 Einleitung ..... 1**

1.1 Epidemiologie der Tuberkulose ..... 1
1.2 Der *Mtb*-Komplex – mikrobiologische Grundlagen ..... 1
1.3 Therapie der Tuberkulose ..... 1
1.4 Die Immunantwort bei der Tuberkulose ..... 2
1.5 Sauerstoffrestriktion bei der Tuberkulose und die Folgen für das Überleben von *Mtb* ..... 5
1.6 Fragestellung der Arbeit ..... 10
1.7 Experimentelles Vorgehen ..... 10

**2 Material und Methoden ..... 11**

2.1 Materialliste ..... 11
2.1.1 Arbeitsgeräte ..... 11
2.1.2 Arbeitsmaterialien ..... 12
2.1.3 Chemikalien ..... 13
2.1.4 Medien und Puffer ..... 14
2.1.5 Zytokine ..... 15
2.1.6 Antikörper ..... 15
2.1.7 Antigene ..... 16
2.1.8 Primer ..... 16
2.1.9 Zellen ..... 16

2.2 Methoden ..... 17
2.2.1 Herstellung, Kultivierung und Stimulation *Mtb*-spezifischer T-Zellen ..... 17
2.2.2 Inkubation unter mikroaerophilen Sauerstoffbedingungen ..... 20
2.2.3 Analyse- und Messverfahren ..... 20
2.2.3.1 IFN-$\gamma$-ELISA ..... 20
2.2.3.2 Quantitative real-time-PCR ..... 22
2.2.3.3 Durchflusszytometrie ..... 26
2.2.4 Statistische Auswertung ..... 29
2.2.5 Software ..... 30

**3 Ergebnisse ..... 31**

3.1 Zelluläre Zusammensetzung von Kurzzeit-T-Zelllinien ..... 31
3.2 *Mtb*-Spezifität der Kurzzeit-T-Zelllinien ..... 33
3.3 Untersuchung der Granulysinexpression in *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinien ..... 34
3.3.1 Antigenabhängige Hochregulation der Granulysinexpression ..... 34
3.3.2 Sauerstoffrestriktionsabhängige Hochregulation der Granulysinexpression 37
3.3.3 Korrelation zwischen Granulysin- und HIF-1α-Expression ..... 40
3.3.4 Hemmung der Granulysinexpression durch HIF-1α-Inhibition ..... 41

**4 Diskussion ..... 45**

4.1 Die Bedeutung von Granulysin bei der Tuberkulose ..... 45
4.2 Regulation der Granulysinexpression durch HIF-1α ..... 46
4.3 Untersuchung funktioneller Effekte der HIF-1α-Inhibition auf die T-Zell-Immunologie ..... 49
4.4 Die Relevanz von HIF-1α im Kontext von Infektionserkrankungen ..... 49
4.5 HIF-Stabilisatoren – von der Grundlagenforschung in die Klinik ..... 53

**5 Zusammenfassung ..... 56**

**6 Literaturverzeichnis ..... 57**

**7 Anhang ..... 76**

**8 Danksagung ..... 79**

**9 Lebenslauf ..... 80**

**Abkürzungsverzeichnis**

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser |
| APC | Antigen-präsentierende Zelle |
| APC (Durchflusszytometrie) | Allophycocyanin |
| ARDS | Akutes Lungenschädigungs-Syndrom |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAY 87-2243 | (1-Cyclopropyl-4-{4-[(5-methyl-3-{3-[4-(trifluoromethoxy) phenyl]-1,2,4-oxadiazol-5-yl}-1H-pyrazol-1yl)methyl]pyridin-2-yl}piperazin) |
| BCG | Bacillus Calmette-Guérin |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| *C. albicans* | *Candida albicans* |
| CAPG | Makrophagen-Capping Protein |
| CBP | CREB-Bindeprotein |
| CCR | Chemokinrezeptor |
| CD | Cluster of Differentiation |
| $CD1^+$APCs | von $CD14^+$ Monozyten abstammende APCs mit dendritischem Phänotyp |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CM | Komplettmedium |
| $CoCl_2$ | Kobaltchlorid |
| CREB | cAMP (zyklisches Adenosin-Monophosphat)-responsives Element-Bindeprotein |

| | |
|---|---|
| CT | Schwellenwert-Zyklus |
| CTL | zytotoxische T-Lymphozyten |
| DC | dendritische Zelle |
| –dF/dT | erste negative Ableitung der Fluoreszenz über die Zeit |
| DFO | Deferoxamin/Desferrioxamin |
| DMOG | Dimethyloxaloylglycin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DRK | Deutsches Rotes Kreuz |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| EPO | Erythropoietin |
| FACS | Fluorescence-Activated Cell Sorting |
| Fc | kristallisierbares Fragment |
| FCS | fetales Kälberserum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| for (forward) | Vorwärts- |
| FSC | Vorwärtsstreulicht |
| GM-CSF | Granulozyten Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor |
| GNLY | Granulysin |
| GvHD | Graft-versus-Host-Reaktion |
| Gy | Gray |

| | |
|---|---|
| Gzm | Granzyme |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HIF-1α | Hypoxie-induzierter Faktor-1α |
| HK | Hexokinase |
| HRE | Hypoxie-responsives Element |
| $H_2O$ | Wasser |
| $H_2SO_4$ | Schwefelsäure |
| HTLV | humanes T-lymphotropes Virus |
| IFN-γ | gamma-Interferon |
| IL | Interleukin |
| IL-2T6 | Interleukin-2-Überstand aus der T6-Zelllinie von Dr. F. Sallusto, IRB, Bellinzona, Italien |
| kDa | Kilodalton |
| KDM3A | Lysin-spezifische Demethylase 3A |
| kPa | Kilopascal |
| LAMP | Lysosomen-assoziiertes Membranprotein |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| *M.* | *Mycobacterium* |
| MDR | multiresistent |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex |
| mRNA | Boten-RNA |
| MRSA | Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* |

| | |
|---|---|
| *Mtb* | *Mycobacterium tuberculosis* |
| mTOR | mechanistic (früher: mammalian) Target of Rapamycin |
| NKT-Zelle | natürliche Killer-T-Zelle |
| NK-Zelle | natürliche Killerzelle |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| $O_2$ | Sauerstoff |
| OH | Hydroxylgruppe |
| PAMPs | Pathogen-assoziierte molekulare Muster |
| PB | Pacific Blue |
| PBMCs | periphere mononukleäre Blutzellen |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PE | Phycoerythrin |
| PE-Cy7 | Phycoerythrin-Cyanin 7 |
| PerCP | Peridin-Chlorophyll-Protein |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PHD | Prolylhydroxylase |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PN | Perforin |
| $pO_2$ | Sauerstoffpartialdruck als Angabe in % des atmosphärischen Luftdrucks |
| rev (reverse) | Rückwärts- |
| RFU | relative Fluoreszenzeinheiten |
| rhu | rekombinante(r,s) humane(r,s) |

| | |
|---|---|
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| RPMI 1640 | Roswell Park Memorial Institute (ein dort entwickeltes Zellkulturmedium) |
| RR | Rifampicin-resistent |
| RTase | Reverse Transkriptase |
| SEB | Staphylokokken-Enterotoxin B |
| SEM | Standardfehler |
| shRNA | kurze Haarnadel-Ribonukleinsäure |
| siRNA | kleine interferierende Ribonukleinsäure |
| *spp.* | *species* |
| SSC | Seitwärtsstreulicht |
| *S. pyogenes* | *Streptococcus pyogenes* |
| STAT | Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription |
| TCR | T-Zell-Rezeptor |
| TGF | Transformierender Wachstumsfaktor |
| TMB | 3,3‘,5,5‘-Tetramethylbenzidin |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| VHL | von-Hippel-Lindau |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |
| XDR | extensiv resistent |

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie der Tuberkulose

Die Tuberkulose ist eine durch den *Mtb (Mycobacterium tuberculosis*)-Komplex hervorgerufene Infektionskrankheit, die in erster Linie die Lunge befällt, sich aber im ganzen Körper manifestieren kann [105]. Derzeit ist sie weltweit die häufigste tödlich endende behandelbare bakterielle Infektionskrankheit [147]. Ein Drittel der Weltbevölkerung ist latent mit *Mtb* infiziert [148]. Laut dem „Global Tuberculosis Report" der WHO von 2015 erkrankten 2014 weltweit 9,6 Millionen Menschen an Tuberkulose, 1,5 Millionen starben daran. Der weitaus größte Teil der Neuerkrankungen trat in Afrika, Südostasien und der westlichen Pazifikregion auf. In Europa waren es 3%. Besonders betroffen ist Osteuropa [117]. In Deutschland lagen die jährlichen Fallzahlen in letzter Zeit zwischen 4210 (2012) und 5865 (2015). Aufgrund demografischer Veränderungen und Migrationsbewegungen ist die Erkrankung wieder auf dem Vormarsch [118].

## 1.2 Der *Mtb*-Komplex – mikrobiologische Grundlagen

*Mtb*, der häufigste Erreger der Tuberkulose beim Menschen, ist Teil des *Mtb*-Komplexes, der auch *M. bovis* mit Impfstamm BCG, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti* und *M. pennipedii* umfasst [117]. Die Erreger sind fakultativ intrazelluläre, langsam wachsende Stäbchen mit einer sehr lipidhaltigen Zellwand. *Mtb* ist ein aerobes Bakterium [130], das sich allerdings durch Änderung seiner Genexpression und seines Stoffwechsels an anaerobe Bedingungen und andere Stressfaktoren anpassen kann. Dieser „Schlafzustand" ist durch geringe metabolische Aktivität, veränderte Genregulation, Antibiotikatoleranz und langsames Wachstum gekennzeichnet [82].

## 1.3 Therapie der Tuberkulose

Eine klinisch manifeste Infektion mit *Mtb* wird durch eine mehrmonatige Kombinationstherapie behandelt, wobei das Schema je nach Resistogramm, Medikamentenverträglichkeit, Krankheitsbild und Compliance des Patienten variiert [157].

Aufgrund eines inadäquaten Umgangs mit den Tuberkulostatika konnten sich im Laufe der Jahre allerdings Resistenzen gegen die Standardtherapeutika (Rifampicin, Isoniazid,

Ethambutol und Pyrazinamid) entwickeln [157]. Man unterscheidet RR-Tuberkulose (Rifampicin-Resistenz), MDR-Tuberkulose (Rifampicin- und Isoniazid-Resistenz) sowie XDR-Tuberkulose (MDR-Tuberkulose plus Resistenz gegenüber einem der Fluorchinolone und einem injizierbaren Tuberkulostatikum) [77, 117]. Bedingt durch Migrationsprozesse und Reiseaktivitäten werden auch in Europa immer mehr Fälle von MDR- und XDR-Tuberkulose registriert [77]. Zur Therapie muss auf Zweitlinientuberkulostatika mit teilweise ungeklärter Wirksamkeit und schlechter Verträglichkeit zurückgegriffen werden [157].

Diese Entwicklung macht die Erforschung neuer Therapieansätze zur Behandlung der Tuberkulose insbesondere vor dem Hintergrund einer fehlenden wirksamen Vakzine [97] dringend erforderlich [22, 157]. Als Lösungsstrategie bietet sich einerseits die Entwicklung neuer Antibiotika mit anderen Wirkmechanismen an. Andererseits ist auch ein immunmodulatorischer Ansatz denkbar, bei dem durch Unterstützung körpereigener Abwehrmechanismen die Immunantwort gegen *Mtb* optimiert wird [156]. Für einen derartigen Ansatz ist die Erforschung grundlegender Schaltmechanismen bezüglich der Interaktion des menschlichen Immunsystems mit *Mtb* nötig. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Teil dieser Schaltmechanismen auf molekularer und immunologischer Ebene näher zu charakterisieren.

## 1.4 Die Immunantwort bei der Tuberkulose

Tuberkelbazillen werden aerogen über infektiöse Droplets übertragen. Die Infektionsgefahr hängt von der eingeatmeten Bakterienmenge, der Dauer und Enge des Kontakts sowie vom Immunstatus des Betroffenen ab [2].

Mehr als 90% der Infizierten entwickeln eine latente Tuberkulose [67, 157]. In diesem chronischen Infektionszustand ist der Patient weder krank noch infektiös. Ein komplexes Zusammenspiel zwischen angeborener und erworbener Abwehr sorgt für ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Erreger und Wirt [98]. Bei gestörter Immunlage schreitet die Erkrankung lokal in der Lunge fort, oder es kommt in seltenen Fällen zur hämatogenen Streuung [83].

Bei aerogener Infektion werden die eingedrungenen Mykobakterien in den Lungenalveolen durch ortsständige Alveolarmakrophagen aufgenommen, jedoch zunächst nicht zerstört.

Makrophagen erkennen *Mtb* über Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRRs), deren Stimulation zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine mit konsekutiver lokaler und systemischer Mobilisation und Aktivierung von Immunzellen führt [70, 98].

Viable Mykobakterien werden vorübergehend durch infizierte $CCR2^+$ Monozyten in die drainierenden mediastinalen Lymphknoten gebracht. Dort erfolgt durch nicht-infizierte dendritische Zellen (DCs) das Priming naiver $CD4^+$ und $CD8^+$ Lymphozyten [121, 150].

Zwischen Infektion und Beginn des T-Zell-Primings vergehen im Mausmodell 7–11 Tage [19, 44]. In dieser „Leerlaufphase“ kann sich *Mtb* trotz Aktivität der angeborenen Abwehr in der Lunge etablieren. Erst mit dem Auftreten der spezifischen T-Zellen entwickelt sich ein Gleichgewicht zwischen Erreger und Abwehr [67].

Das Priming unterscheidet sich je nach Lymphozytensubtyp. $CD4^+$ T-Zellen interagieren mit MHC-Molekülen der Klasse II professioneller APCs über kostimulatorische Signale. Präsentiert wird phagozytiertes Material. $CD8^+$ T-Lymphozyten hingegen brauchen zur Antigenerkennung MHC I-Moleküle, die prinzipiell mit Peptiden aus proteolytischem Abbau im Zytosol beladen werden [86]. Im Zusammenhang der Tuberkulose besonders bedeutsam ist die Kreuzpräsentation, bei der phagozytierte oder endozytierte Proteinantigene, beispielsweise apoptotische Vesikel aus infizierten Makrophagen [3], der Präsentation über MHC I zugeführt werden [86]. Neben der Antigenpräsentation über MHC I und II gibt es in Säugetieren die Möglichkeit der Präsentation von Lipidantigenen über nicht polymorphe CD1-Moleküle. Makrophagen und Monozyten exprimieren konstitutiv CD1d. Auf dendritischen Zellen gibt es CD1a–c-Moleküle, die sich auf Monozyten *in vitro* mit GM-CSF und IL-4 induzieren lassen [8, 138, 140].

Die geprimten T-Lymphozyten wandern aus den drainierenden Lymphknoten über den Blutstrom an den Ort der Primärinfektion. Besonders wichtig für die immunologische Kontrolle von *Mtb* sind dabei Zellen mit ausgeprägter Homing-Tendenz [120].

Ein wichtiger Aspekt der adaptiven Abwehr von *Mtb* besteht in der zytolytischen T-Zell-Aktivität. Diese umfasst neben der Zytokinproduktion (insbesondere von IFN-$\gamma$ und TNF-$\alpha$) die Apoptoseinduktion (über Zell-Zell-Interaktionen) sowie die Produktion zytotoxischer Effektormoleküle [134].

**Zytotoxische Effektormoleküle**

Zu den zytotoxischen Effektormolekülen, die in verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen exprimiert werden, gehören Perforin (PN) und verschiedene Granzyme (Gzm). Im Menschen und einigen anderen Säugetieren, nicht aber in Mäusen, findet sich zusätzlich Granulysin (GNLY), ein Lipid-bindendes, saposinartiges Molekül. In humanen zytotoxischen Granula wird Granulysin mit Perforin und Granzym koexprimiert [107, 133]. Ihre volle Wirksamkeit gegen intrazelluläre Erreger entfalten die drei Effektormoleküle nach Degranulation durch ein synergistisches Zusammenspiel [143] (**Abb. 1**).

Perforin wird benötigt, um den Zugang zum Zytosol der infizierten Zelle zu schaffen. Es bildet Poren in der Membran der Zielzelle [112]. Es verfügt selbst über keine antimikrobielle Wirkung [133].

Granulysin wird in aktivierten $CD4^+$ T-Lymphozyten [99], $CD8^+$ T-Lymphozyten [133], NK-Zellen [59] und γδ-T-Lymphozyten [131] exprimiert und kommt in einer 15 kDa- und einer 9 kDa-Form vor [74]. Während die 15 kDa-Form kontinuierlich sezerniert wird, erfolgt die Freisetzung der 9 kDa-Form über T-Zell-Rezeptor (TCR)-vermittelte Exozytose nach Stimulation mit Mitogen oder Alloantigen in T-Lymphozyten [63, 107, 142] sowie IL-2-abhängig in NK-Zellen [59]. Granulysin wirkt toxisch auf grampositive und gramnegative Bakterien inklusive Mykobakterien (Tuberkulose, Lepra), Pilze (Kryptokokkose) und Parasiten (Malaria) [74, 133]. Granulysin-Plasmaspiegel korrelieren mit erfolgreicher Tuberkulose-Behandlung [29, 119]. Auch gegenüber eukaryontischen Zellen entfaltet Granulysin seine Wirkung, indem es Apoptose in Tumorzellen auslöst sowie in niedrigeren Konzentrationen Chemotaxis fördert und Monozyten aktiviert [28]. Daneben ist Granulysin ein wichtiger Mediator der Graft-versus-Host-Reaktion (GvHD) [92] und zahlreicher Hauterkrankungen wie dem Stevens-Johnson-Syndrom [20].

Auf molekularer Ebene ermöglicht Granulysin über Permeabilitätserhöhung der Cholesterol-freien, negativ geladenen Membranen den Eintritt von Granzymen in die Bakterien [7]. Seine bakterizide Wirkung erreicht es durch ultrastrukturelle Läsionen der bakteriellen Zellwand [133], die einen osmotischen Schock induzieren [94]. Die Elimination der intrazellulären Erreger ist hierbei von der Wirtszellapoptose unabhängig [143].

Granzyme produzieren als Serinproteasen Sauerstoffradikale (reaktive Sauerstoffspecies, ROS), die intrazelluläre Erreger abtöten. Zugleich induzieren Granzyme die Apoptose der Wirtszelle [143].

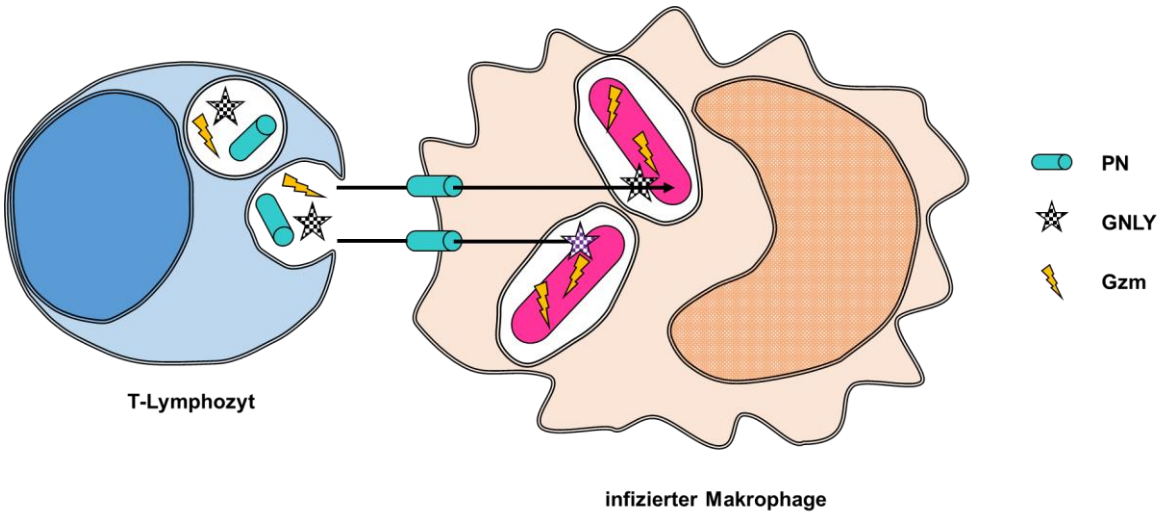



**Abb. 1: Der Wirkmechanismus der zytotoxischen Effektorproteine Perforin, Granulysin und Granzym.**
T-Zellen und NK-Zellen bilden Perforin, Granulysin und Granzym, die in Granula gespeichert und bei Aktivierung ausgeschüttet werden. Perforin bildet Poren in der Membran infizierter Zellen, durch die Granulysin und Granzyme ins Zytosol gelangen. Granulysin erleichtert Granzymen den Eintritt in die Bakterien, die im Innern von Phagolysosomen liegen. Granzyme bilden antibakterielle Sauerstoffradikale und zerstören das Pathogen. (Abkürzungen: PN = Perforin, GNLY = Granulysin, Gzm = Granzyme).

## 1.5 Sauerstoffrestriktion bei der Tuberkulose und die Folgen für das Überleben von *Mtb*

Sauerstoff ist für aerobe Atmung und ATP-Gewinnung unerlässlich. In höheren Organismen wird er über das Gefäßsystem und *per diffusionem* im Körper verteilt. Dabei kommt im Gewebe physiologischerweise nur ein Bruchteil des Sauerstoffs aus der Umgebungsluft an. Die Sauerstoffspannung in einer Zelle hängt von ihrer Nähe zu Gefäßen, dem lokalen Sauerstoffverbrauch und ihrem eigenen Sauerstoffverbrauch ab. Es gibt zahlreiche physiologische und pathologische Zustände, in denen die Sauerstoffversorgung unzureichend ist – dies wird als Hypoxie bezeichnet. Erniedrigter Sauerstoffpartialdruck ist ein entscheidendes Charakteristikum chronisch entzündeter Gewebe, wie sie bei malignen Tumoren, atherosklerotischen Plaques, Synovialitis, heilenden Wunden, Adipositas und bakteriellen Infektionen vorkommen [89, 91, 152]. Hypoxie entsteht hier unter anderem durch erhöhte metabolische Aktivität der Immunzellen, Vergrößerung der interkapillären Distanz durch interstitielle Ödembildung sowie erhöhte Temperatur bei Fieber [89]. Auch bei der Tuberkulose muss mit hypoxischen Gewebearealen gerechnet werden – nicht zuletzt deshalb, weil die Tuberkulose eine granulomatöse Erkrankung ist.

**Das Tuberkulosegranulom**

Granulome sind kompakte, organisierte Ansammlungen von Immunzellen im Gewebe, die unter anderem bei Sarkoidose, Morbus Wegener, Morbus Crohn, Mykosen und Leishmaniose vorkommen [4, 6, 15, 43, 55, 123].

Ein typisches Tuberkulosegranulom besteht aus Makrophagen, Schaumzellen, Epitheloidzellen, Langhans-Riesenzellen und einem Randwall aus Lymphozyten. Die Mykobakterien liegen im Zentrum des Granuloms sowie in Phagolysosomen infizierter Makrophagen [48]. In Menschen, Kaninchen, Meerschweinchen und Primaten sind größere Tuberkulosegranulome im Gegensatz zur Maus verkäsend. Bei der Verkäsung handelt es sich um ein zentrales, lipidreiches, nekrotisches Areal bestehend aus Zelltrümmern und abgetöteten Bakterien [48, 141]. Die Granulombildung wird durch Chemokine eingeleitet, die Immunzellen zum Infektionsort locken. Zur anschließenden Infektionskontrolle ist ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Komponenten essentiell [46, 139].

Einerseits dient das Granulom zur Eindämmung des bakteriellen Wachstums und der Infektion. Anderseits können Granulome aber auch als Nische zur jahrzehntelangen Persistenz von *Mtb* betrachtet werden, die bei geschwächter Abwehrlage zum Ausgangspunkt von Dissemination und Transmission werden [32].

Aufgrund der dichten Zellaggregation und spärlichen Gefäßversorgung ist in Granulomen von Nähr- und Sauerstoffrestriktion auszugehen. Aktuelle Untersuchungen und Berechnungen zur Sauerstoffverteilung in verkäsenden, tuberkulösen Granulomen führen zu einer Untergliederung in vier Zonen [27] (**Abb. 2**).

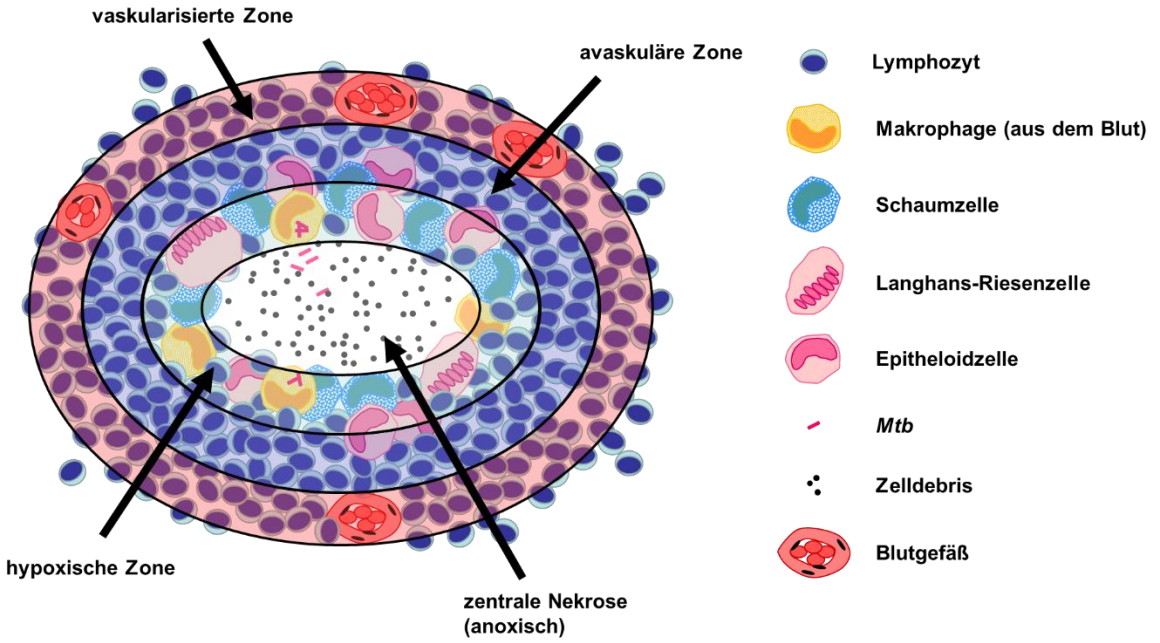



**Abb. 2: Einteilung eines nekrotisierenden Granuloms in Sauerstoff-Zonen.**
Die äußere, vaskularisierte Zone verfügt über eine verhältnismäßig gute Sauerstoffversorgung, obwohl berücksichtigt werden muss, dass die Gefäße in Granulomen eine abnorme Struktur und Funktion aufweisen [26]. In der daran anschließenden Zone sind keine Gefäße mehr zu finden. Die Sauerstoffversorgung nimmt mit zunehmender Nähe zum Zentrum ab. In der hypoxischen Region lassen sich die Zellen mit dem Gewebehypoxiemarker Pimonidazol anfärben [141]. Im nekrotischen Zentrum herrschen anoxische Bedingungen. (Abkürzungen: *Mtb* = *Mycobacterium tuberculosis*).

## Einfluss von Hypoxie auf die Tuberkulose

Viele Indizien weisen darauf hin, dass Tuberkuloseerreger Hypoxie meiden. Obwohl die transmittierten, infektiösen Droplets zunächst in den gut ventilierten Arealen der Lungenbasis landen [104] und die Parenchymschäden bei Primär-Tuberkulose überall in der Lunge entstehen können, werden Reaktivierung und Kavernenbildung vorwiegend in den Oberlappen beobachtet [80, 104]. Dort ist einerseits die Clearance von Antigenen schlechter, andererseits sind diese Areale aufgrund des eingeschränkten Gasaustausches verhältnismäßig gut ventiliert [49]. Das relativ schnelle bakterielle Wachstum in den Oberlappen hat eine starke Entzündungsreaktion zur Folge, was in Gewebszerstörung und Kavernenbildung mit dadurch bedingt guter Oxygenierung resultiert [51, 80].

Dementsprechend beeinflusst Sauerstoffrestriktion den Krankheitsverlauf bei Tuberkulose positiv. Vor der Entwicklung von Antibiotika wurden Tuberkulosepatienten zur Genesung in Hochgebirgssanatorien geschickt, wo sie sich zumindest kurzfristig erstaunlich gut erholten [56]. In Studien konnte gezeigt werden, dass in einer Gruppe von Probanden aus Hochgebirgsregionen in Südamerika die Reaktion auf den Tuberkulin-Hauttest geringer

ausgeprägt war als in der Kontrollgruppe, die sich aus Gegenden auf Höhe des Meeresspiegels rekrutierte. Dies weist auf verringerte Transmission des Pathogens unter reduzierter Sauerstoffspannung hin [103]. Bei Meerschweinchen und Kaninchen, die in Käfigen unter Sauerstoffrestriktion gehalten wurden, verlief die *Mtb*-Infektion schwächer als bei Tieren, die atmosphärischen Sauerstoffbedingungen ausgesetzt waren [116]. Umgekehrt war das Überleben von *Mtb*-infizierten Mäusen unter erhöhter Sauerstoffspannung im Vergleich zu Kontrolltieren bei normaler Sauerstoffspannung verkürzt [127]. Schließlich löste die Angiogenesehemmung mit konsekutiver Sauerstoffrestriktion im Zebrafischmodell der Tuberkulose ein reduziertes Wachstum von *M. marinum* aus [100].

Das verminderte Wachstum von *Mtb* unter Sauerstoffrestriktion lässt sich unter anderem durch die Modulation des angeborenen und adaptiven Immunsystems erklären. *In vitro*-Experimente zeigten reduziertes Wachstum von *Mtb* unter hypoxischen Bedingungen in humanen Makrophagen [95]. Unter diesen atmosphärischen Bedingungen werden humanes β-Defensin-2 [95], TNF [45] und Arginase [31] als entscheidende antimikrobielle Effektoren in Makrophagen hochreguliert. Im adaptiven Immunsystem löst ein Sauerstoffpartialdruck von 1% eine verstärkte Expression der zytotoxischen Moleküle Perforin, Granzym [30] sowie Granulysin [153] aus.

**HIF-1α**

Auch wenn die Empfindlichkeit gegenüber und Reaktion auf reduzierte Sauerstoffbedingungen zwischen Geweben und Zelltypen variiert, treten hypoxische Anpassungsreaktionen auf Zellebene gewöhnlich bei einem Sauerstoffpartialdruck von 1 kPa auf, was einem Sauerstoffanteil von 1% entspricht [89]. Diese Anpassungsreaktionen werden auf molekularer Ebene über Hypoxie-induzierte Faktoren (HIFs) vermittelt. HIFs sind heterodimere Transkriptionsfaktoren, die sauerstoffrestriktionsabhängig hochreguliert werden [62, 106]. Am besten untersucht ist HIF-1α [89].

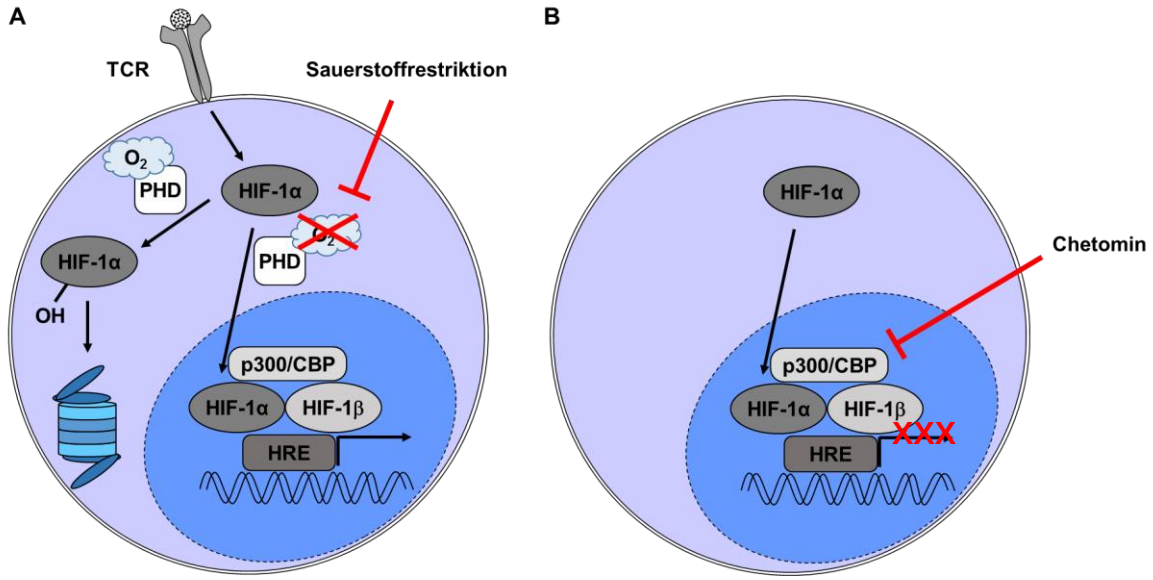



**Abb. 3: Aktivierung und Inhibition von HIF-1α..**

**A** Aktivierung des HIF-Signalwegs. HIF-1α wird unter atmosphärischen Sauerstoffbedingungen rasch proteasomal abgebaut, wohingegen Sauerstoffrestriktion den Transkriptionsfaktor stabilisiert. Daneben kann in T-Zellen die Expression von HIF-1α T-Zell-Rezeptor-abhängig gesteigert werden. **B** Inhibition des HIF-Signalwegs. Chetomin hemmt die HIF-1α-Signaltransduktion durch Inhibition der Interaktion von HIF-1α mit dem Transkriptionskoaktivator p300. Die Expression HIF-1α-abhängiger Gene wird dadurch blockiert. (Abkürzungen: CBP = CREB [= cAMP-responsives Element-Bindeprotein]-Bindeprotein, GNLY = Granulysin, HIF = Hypoxie-induzierter Faktor, HRE = Hypoxie-responsives Element, $O_2$ = Sauerstoff, OH = Hydroxylgruppe, PHD = Prolylhydroxylase, TCR = T-Zell-Rezeptor).

Unter normalen Sauerstoffbedingungen werden HIFs im Zytoplasma rasch durch sauerstoffabhängige Prolylhydroxylasen (PHDs) hydroxyliert, durch das von-Hippel-Lindau (VHL)-Protein ubiquitiniert und anschließend proteasomal abgebaut. Unter reduzierten Sauerstoffbedingungen stellen die PHDs ihre Aktivität ein. HIF-1α und HIF-1β werden in den Zellkern transloziert. Dort initiieren sie mittels des Koaktivators p300/CBP die Expression der Gene, die unter dem Einfluss eines Hypoxie-responsiven Elements (HRE) stehen [106] (**Abb. 3A**).

Die HIF-Induktion erfolgt jedoch nicht ausschließlich durch Sauerstoffrestriktion. PHDs benötigen neben Sauerstoff noch weitere Kosubstrate wie Eisen, α-Ketoglutarat, Vitamin C oder Glutathion. Entzug dieser Faktoren – beispielsweise durch Eisenchelatoren wie Deferoxamin (DFO) – hat ebenfalls eine Stabilisierung von HIFs zur Folge [145].

In T-Lymphozyten existiert neben der Hypoxie-induzierten HIF-Stabilisierung eine TCR-abhängige Steigerung der HIF-1α-Expression über den PI3K/mTOR-Signalweg [93] (**Abb. 3A**). Bei der Differenzierung von $T_H17$-Zellen kommt es zudem über den STAT3-Signalweg zu einer Induktion der HIF-1α-Expression [25].

Der HIF-1α-Signaltransduktionsweg lässt sich an vielen Stellen pharmakologisch beeinflussen: HIF-1α-Proteinsynthese, HIF-1α-Proteinstabilisierung, Heterodimerisierung von HIF-1α mit HIF-1β, HIF-1-Heterodimer-DNA-Bindung und Interaktion mit anderen Proteinen [16]. Ein Beispiel für einen pharmakologischen HIF-1α-Inhibitor ist Chetomin, das die Interaktion von HIF-1α mit dem Transkriptionskoaktivator p300 verhindert [66, 115] (**Abb. 3B**).

## 1.6 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte eine potentielle antigen- und sauerstoffabhängige Steigerung der Expression des antimikrobiellen Peptids Granulysin bei der adaptiven Immunantwort auf die Tuberkulose untersucht werden. Da der Transkriptionsfaktor HIF-1α als ein zentraler molekularer Schalter bei der Expression von Granulysin vermutet wurde, sollte mittels zielgerichteter pharmakologischer Inhibition die HIF-1α-abhängige Expressionssteigerung von Granulysin wieder aufgehoben werden.

## 1.7 Experimentelles Vorgehen

Humane *Mtb*-spezifische Kurzzeit-T-Zelllinien wurden aus frisch isolierten PBMCs hergestellt. Zur Überprüfung ihrer Antigenspezifität wurden Spezifitätsassays mit anschließender IFN-γ-Messung durchgeführt. Die Antigenstimulation erfolgte mit *Mtb*-Extrakt. Zur Sauerstoffrestriktion (mikroaerophile Bedingungen) wurde das GENbag-System der Firma bioMérieux verwendet. Granulysin wurde auf mRNA- und Proteinebene mittels quantitativer real-time-PCR bzw. durchflusszytometrisch bestimmt. Die pharmakologische Inhibition der durch *Mtb*-Extrakt antigenspezifisch aktivierten TCR-Signalkaskade erfolgte über den HIF-1α-Inhibitor Chetomin.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Materialliste

### 2.1.1 Arbeitsgeräte

Flockeneisbereiter ..... Kälte-Berlin

ELISA-Reader ..... ASYS

FACS Canto II ..... BD Biosciences

γ-Strahler ..... ND Nuclear Data Frankfurt

Gefrierschrank (-80 °C) ..... Thermo Scientific

Heizblock Thermostat 5320 ..... Eppendorf

Herasafe HSP 12-Werkbank ..... Thermo electron corporation

Inkubator 6000 ..... Heraeus

Laborschüttler ..... Heidolph

LaminAir HB2472 ..... Heraeus

Lichtmikroskop Axiovert 40CF ..... Zeiss

Lichtmikroskop CH-2 ..... Olympus

LightCycler nano ..... Roche

Pipettierhilfe Easypet ..... Eppendorf

Sauerstoffmessgerät GOX 100 ..... Greisinger

Stickstofftank ..... MG Messer Griesheim

Thermocycler T Professional ..... Biometra

Wasserbad ..... Köttermann

Neubauer-Zählkammer ..... Marienfeld

Zentrifuge 5810 R ..... Eppendorf

Zentrifuge 5417 R ..... Eppendorf

Zentrifuge Rotina 380 R .....Hettich

### 2.1.2 Arbeitsmaterialien

Einfrierröhrchen .....Greiner Bio One

Deckglas .....Marienfeld

ELISA-Platten, 96 Well .....Nunc

FACS-Röhrchen .....Corning

Filterspitzen (0,1-10 µL, 2-100 µL, 2-200 µL) ..Sarstedt

GENbag-System .....bioMérieux

Gewebekulturplatten, 24 Well .....Corning Incorporated

12-Kanal-Pipette Research, 100 µL .....Eppendorf

Kunststoffpipetten, serologische
(5 mL, 10 mL, 25 mL) .....Corning

Latexeinmalhandschuhe .....Sempercare

Pipette Research 100 µL .....Eppendorf

Pipette Research Plus 10 µL .....Eppendorf

Pipette Research Plus 1000 µL .....Eppendorf

Pipetten pipetman (P2, P10, P100, P200) .....Gilson

Pipettenspitzen 0,5-10 µL .....Brand

Pipettenspitzen 10-100 µL .....Roth

Pipettenspitzen 100 -1000 µL .....Sarstedt

Rundbodenplatte, 96 Well .....Thermo Scientific

8-Tube-Strips .....Roche

Röhrchen (500 mL, 1500 mL) .....Eppendorf

Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL) .....Corning BD Biosciences

Zellkulturflaschen, 50 mL ..... Corning

### 2.1.3 Chemikalien

Aqua dest. für Ethanol 75% ..... Apotheke des Universitätsklinikums Ulm

Bovines Serumalbumin (BSA) ..... Sigma-Aldrich

Chloroform ..... Sigma

Chetomin ..... Sigma

Dimethylsulfoxid ..... Sigma-Aldrich

DNase I Puffer ..... New England Biolabs

DNase I recombinant RNase-free ..... Roche

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) ..... Gibco

Ethylendiamintetraacetat ..... Sigma

Ethanol ..... Apotheke des Universitätsklinikums Ulm

Lightcycler FastStart DNA Master$^{PLUS}$
SYBR Green I ..... Roche

Ficoll® Paque Plus ..... GE Healthcare

Fötales Kälberserum (FCS) ..... Biochrom

$H_2SO_4$ ..... Roth

HEPES ..... Biochrom

Humanserum AB, hitzeinaktiviert ..... Sigma

Isopropanol ..... Roth

L-Glutamin ..... Pan Biotech

LIVE/DEAD® Fixable Dead Stain Kit ..... Life Technologies

L-Mimosin ..... Sigma

Natriumazid ..... Roth

Nucleotidmix dNTPs ..... Roche

Oligo-d(T)-Primer ..... New England BioLabs

Paraformaldehyd (PFA) ..... Sigma-Aldrich

Penicillin/Streptomycin ..... Biochrom

Perm/Wash ..... BD

Peroxidase, biotinyliert ..... Life Technologies

Protector RNase-Inhibitor ..... Roche

Reaction Buffer 5x ..... Thermo Scientific

RevertAid H minus RTase ..... Thermo Scientific

RNase-freies Wasser ..... Qiagen

RPMI 1460 ..... Gibco

Streptavidin ..... Life Technologies

TMB Substrate Solution ..... Thermo Scientific

Trizma ..... Sigma

Trizol-Reagens ..... Thermo Fisher

Trypanblau ..... Biochrom AG

Tween 20 ..... Sigma

### 2.1.4 Medien und Puffer

**Durchflusszytometrie**

FACS-Puffer ..... PBS + Natriumazid (0,1%) + FCS (1%)

Fixationspuffer ..... PBS + PFA (4%)

Permeabilisierungspuffer ..... PBS + Perm/Wash (10%)

**ELISA**

ELISA-Assay-Puffer ..... PBS + BSA (2%)

ELISA-Stopp-Lösung ..... $H_2O$ + $H_2SO_4$ (0,18 M)

ELISA-Waschpuffer ..... PBS + Trizma (50 mM) + BSA (0,1%) + Tween (0,2%)

**Zellkultur**

Auftaumedium ..... RPMI 1460 + FCS (10%)

Einfriermedium ..... FCS + DMSO (20%)

Komplettmedium (CM) ..... RPMI 1640 + HEPES (10 mM) + Penicillin (60 µg/mL) + L-Glutamin (2 mM) + Streptomycin (100 µg/mL)

Medium ..... CM + 5% hitzeinaktiviertes Humanserum

### 2.1.5 Zytokine

IL-2T6-Überstand ..... eigene Herstellung, MyTB-Labor, aus der T6-Zelllinie von Dr. F. Sallusto, IRB, Bellinzona, Italien

rhu GM-CSF ..... Miltenyi

rhu IFN-γ ..... R&D Systems

rhu IL-4 ..... Biolegend

### 2.1.6 Antikörper

**Durchflusszytometrie**

**Tabelle 1: Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper und zugehörige Isotypen.**

| Zielstruktur | Isotyp | Konjugation | Hersteller |
|---|---|---|---|
| CD3 | IgG2a | FITC | Biolegend |
| CD4 | IgG2b | PB | Biolegend |
| CD8 | IgG1 | PerCP | BD (Antikörper), Invitrogen (Isotyp) |
| CD56 | IgG1 | PE/Cy7 | BD |
| Granulysin | IgG1 | PE | eBiosciences |

**ELISA**

Human-IFN-γ, Coating Antikörper .....Thermo Scientific

Human-IFN-γ, Detection Antikörper .....Thermo Scientific

### 2.1.7 Antigene

Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) .....Sigma

*Mtb*-Extrakt (Vollextrakt aus *Mtb* H37Rv) .....eigene Herstellung, MyTB-Labor

*C. albicans*-Extrakt .....eigene Herstellung, MyTB-Labor

*S. pyogenes*-Extrakt .....eigene Herstellung, MyTB-Labor

### 2.1.8 Primer

**Tabelle 2: Für die quantitative real-time PCR verwendete Primer.**

| Produkt | Primerpaar | Sequenz | Hersteller |
|---|---|---|---|
| β-Aktin | β-Aktin for | 5'-GGCCACGGCTGCTTC-3' | Thermo Scientific |
| | β-Aktin rev | 5'-GTTGGCGTACAGGTCTTTGC -3' | |
| Granulysin | Granulysin for | 5'-TGGGCCGTGACTACAGGA-3' | Thermo Scientific |
| | Granulysin rev | 5'-GGGTCGCAGCATTGGAAACACT-3' | |

### 2.1.9 Zellen

Buffy Coats .....DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg/Hessen, Ulm

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herstellung, Kultivierung und Stimulation *Mtb*-spezifischer T-Zellen

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen handelt es sich um aus frischen humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) hergestellte *Mtb*-spezifische Kurzzeit-T-Zelllinien sowie deren autologe Antigen-präsentierende Zellen (APCs). Es liegt eine positive Stellungnahme der Ethikkommission der Universität Ulm mit dem Aktenzeichen 426/15 vor.

**Herstellung von PBMCs aus Buffy Coats**

PBMCs wurden aus frischen Buffy Coats gesunder Spender der Blutspendezentrale des DRK mittels Dichtezentrifugation gewonnen. Die hierfür verwendete Ficoll® Paque Plus-Lösung hat eine Dichte von 1,077 g/mL und enthält Ficoll, ein synthetisch hergestelltes, stark verzweigtes, hydrophiles Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin. Durch Zentrifugation kommt es zur Aggregation und Sedimentation von Erythrozyten sowie zum Absinken von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Wie in **Abb. 4** gezeigt, bilden sich optisch gut unterscheidbare Schichten. Die PBMCs liegen mit Thrombozyten und mitunter einer geringen Menge basophiler Granulozyten in der Interphase. PBMCs wurden in mehreren Schritten aufgereinigt und schließlich in CM + 5% Humanserum auf eine Endkonzentration von 100 Mio. Zellen/mL eingestellt. Bis zum Gebrauch wurden sie auf Eis gelagert.

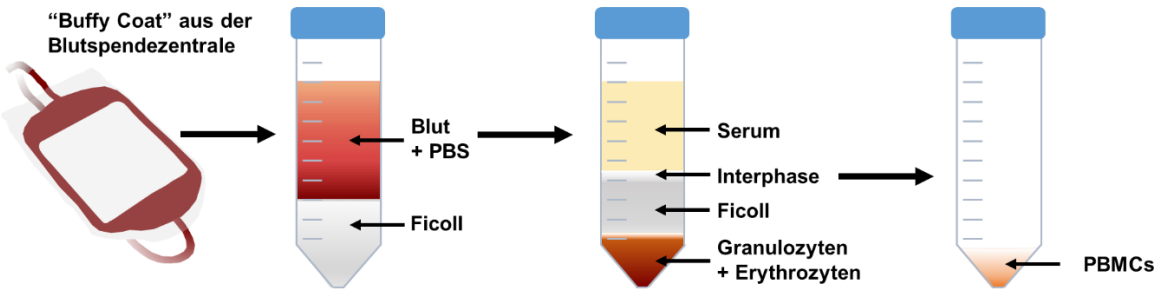



**Abb. 4: Aufreinigung von PBMCs aus Buffy Coats der Blutspendezentrale des DRK.**
Wichtigster Schritt der Aufreinigung ist die Dichtegradientenzentrifugation mithilfe von Ficoll® Paque Plus-Lösung, das „Ficollieren“. Die Buffy Coats aus dem Blutbeutel werden dadurch in Phasen aufgetrennt. Die Interphase enthält unter anderem die PBMCs. (Abkürzungen: PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBMCs = periphere mononukleäre Blutzellen).

## Herstellung *Mtb*-spezifischer Kurzzeit-T-Zelllinien und ihrer autologen APCs

In allen Experimenten wurden *Mtb*-spezifische Kurzzeit-T-Zelllinien mit ihren autologen $CD1^+$APCs eingesetzt, die nach dem Schema in **Abb. 5** hergestellt wurden.

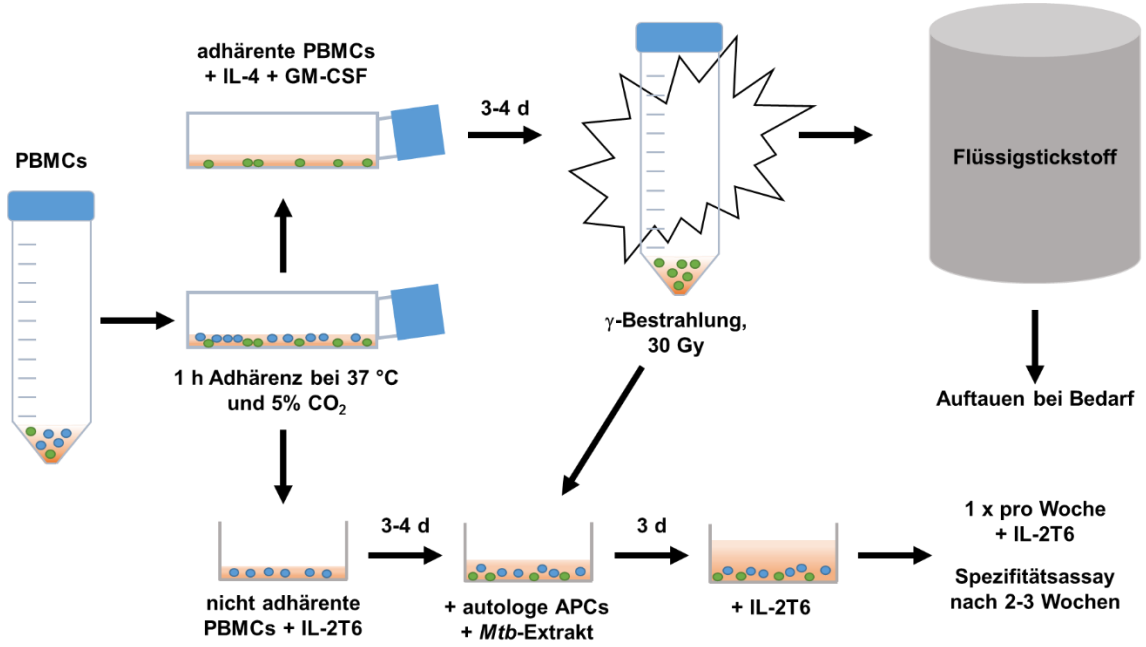



**Abb. 5: Generierung von Kurzzeit-T-Zelllinien und autologen $CD1^+$APCs.**
Zur Herstellung einer Zelllinie wurden 2,4 x $10^8$ PBMCs eines Spenders durch einstündige Inkubation in adhärente und nicht-adhärente Zellen aufgetrennt. Die adhärenten PBMCs wurden mit einer finalen Konzentration von 10 ng/mL IL-4 und 10 ng/mL GM-CSF für 3–4 d inkubiert. Anschließend wurden die so differenzierten $CD1^+$APCs mit PBS-EDTA gelöst und mit 30 Gy bestrahlt. Die Bestrahlung der APCs sollte deren Fähigkeit zur Proliferation und Zytokinfreisetzung einschränken sowie nicht eliminierte T-Lymphozyten inaktivieren. Die $CD1^+$APCs wurden dann entweder zur Antigenpräsentation bei der Herstellung der *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinie eingesetzt oder kryokonserviert, und im Flüssigstickstofftank bei –180 °C für weitere Experimente weggefroren. Aus den nicht-adhärenten PBMCs entstand die *Mtb*-spezifische Kurzzeit-T-Zelllinie. Die Zellen wurden hierzu in 24-Well-Platten zu je 2 x $10^6$ Zellen pro Well ausgesät. Nach 3–4 Tagen, in denen die T-Zellen unter dem Einfluss von IL-2T6 proliferierten, wurde jedes Well mit *Mtb*-Extrakt (Endkonzentration 10 µg/mL) und 2 x $10^5$ $CD1^+$APCs stimuliert. Die Kurzzeit-T-Zelllinie wurde an Tag 7 und danach wöchentlich mit frischem IL-2T6-haltigen Medium (1:1000 Verdünnung aus einer Stocklösung) versorgt. Ab einem Volumen von 1000 µL pro Well wurde ein Mediumwechsel mit jeweils der Hälfte des Überstands durchgeführt. Nach zwei bis drei Wochen, allerdings mindestens 5 Tage nach IL-2T6-Applikation, wurden die Zellen mittels eines Spezifitätsassays auf ihre Fähigkeit zur Freisetzung von IFN-γ als Reaktion auf *Mtb*-Extrakt geprüft. (Abkürzungen: APCs = Antigen-präsentierende Zellen, $CO_2$ = Kohlenstoffdioxid, GM-CSF = Granulozyten Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor, Gy = Gray, IL-2T6 = Interleukin-2-Überstand aus der T6-Zelllinie von Dr. F. Sallusto, *Mtb* = *Mycobacterium tuberculosis*, PBMCs = periphere mononukleäre Blutzellen).

## Einfrieren und Auftauen von $CD1^+$APCs

Zur Kryokonservierung der $CD1^+$APCs kam ein FCS- und DMSO-haltiges Einfriermedium (FCS + 20% DMSO) zum Einsatz. Das organische Lösungsmittel DMSO verhindert

während des Einfrierprozesses die Bildung von Eiskristallen im Innern der Zellen. Auch einige Serumbestandteile haben schützende Wirkung. Um die Zellen der toxischen Wirkung des DMSOs bei Raumtemperatur nur so lange wie nötig auszusetzen, wurden Einfrierröhrchen und Einfriermedium vorgekühlt. Beim Auftauen der Zellen wurde DMSO möglichst rasch entfernt. Dazu wurden die Zellen im Wasserbad aus den Einfrierröhrchen gelöst und sofort mit Auftaumedium (RPMI 1460 + 10% FCS) gewaschen.

**Stimulation *Mtb*-spezifischer Kurzzeit-T-Zelllinien**

Um die Antigenspezifität der hergestellten Kurzzeit-T-Zelllinien zu überprüfen, wurden die T-Zellen mit *Mtb*-Extrakt stimuliert und die Freisetzung von IFN-γ als antigenspezifische Immunantwort ermittelt.

Für einen Spezifitätsassay wurden 2,5 x $10^4$ Zellen einer Kurzzeit-T-Zelllinie und 2,5 x $10^4$ autologe $CD1^+$APCs bei 37 °C und 20% Sauerstoff mit Medium bzw. verschiedenen Antigenen inkubiert. Als Stimuli dienten *Mtb*-Extrakt, das Superantigen SEB (Positivkontrolle) sowie *C. albicans*-Extrakt und *S. pyogenes*-Extrakt (Negativkontrollen). Die Antigene wurden in einer Endkonzentration von 10 µg/mL eingesetzt. Nach 16 ± 2 h wurden die Überstände abgenommen und mittels eines Sandwich-ELISAs auf ihre IFN-γ-Konzentration untersucht. Bei Bedarf wurden die Überstände bis zur Durchführung des ELISAs bei –20 °C weggefroren.

In ähnlicher Weise, jedoch mit entsprechend angepassten Zellzahlen, erfolgte die Stimulation *Mtb*-spezifischer Kurzzeit-T-Zelllinien zur Messung der Granulysin- bzw. der HIF-1α-Expression. Für die Untersuchung der Granulysinexpression wurden pro Ansatz 2 x $10^6$ Zellen einer *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinie mit 2 x $10^5$ autologen $CD1^+$APCs für 48 ± 2 h bei 37 °C inkubiert. Für die Analyse der intrazellulären Menge an HIF-1α wurden 8 x $10^6$ T-Zellen und 2 x $10^6$ autologe $CD1^+$APCs verwendet. Je nach Fragestellung wurden die Zellen mit unterschiedlichen Antigenen in einer Endkonzentration von 10 µg/mL stimuliert, bei mikroaerophilen Sauerstoffbedingungen inkubiert oder mit einem pharmakologischen HIF-1α-Inhibitor behandelt.

### 2.2.2 Inkubation unter mikroaerophilen Sauerstoffbedingungen

Mikroaerophile Sauerstoffbedingungen wurden mit dem GENbag-System der Firma bioMérieux erzeugt. Dieses System wird in der mikrobiologischen Diagnostik zur Anzucht mikroaerophiler Erreger wie *Campylobacter spp.* verwendet. Ein Gasgenerator reduziert den Sauerstoff im luftdicht abgeschlossenen GENbag von normoxischen ($pO_2$ = 20%) auf mikroaerophile Sauerstoffbedingungen ($pO_2$ = 5–12%). Zur Verifizierung der Herstellerangaben wurde der Sauerstoffpartialdruck mit einem Sauerstoffmessgerät (GOX 100) der Firma GHM Greisinger überprüft. Ein $pO_2$ von 5% wurde nach etwa 3 h erreicht und blieb über einen Zeitraum von 48 h bei verschlossenem GENbag konstant (**Abb. 6**).

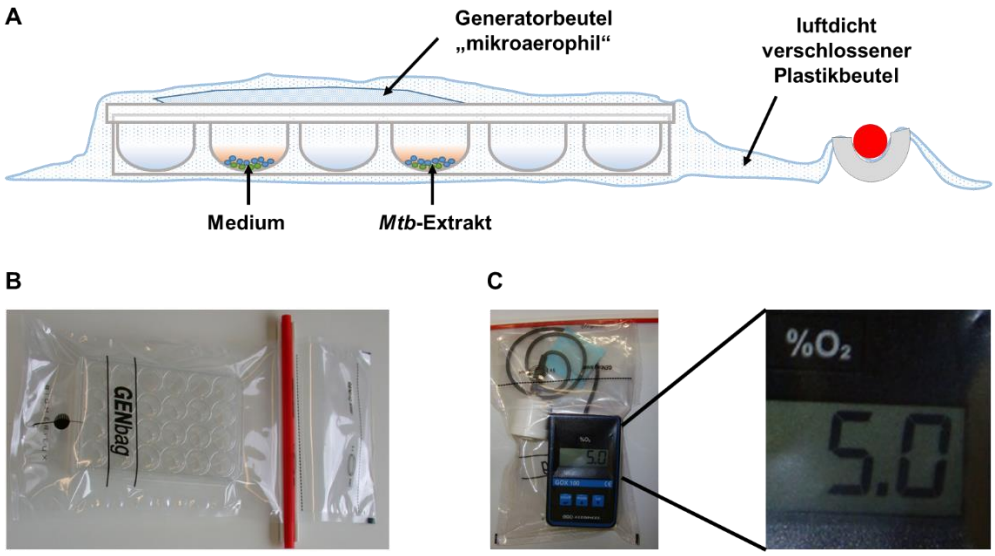



**Abb. 6: Inkubation unter mikroaerophilen Sauerstoffbedingungen.**
**A** Im luftdicht verschließbaren GENbag-System wurden mithilfe eines Generatorbeutels (blau) innerhalb von 3 h Sauerstoffbedingungen von 5% erzeugt, was der unteren Grenze der erwarteten $pO_2$-Angaben des Herstellers (bioMérieux) entspricht. **B** Das GENbag-System ist ausreichend groß für die Inkubation einer 24-Well-Platte. **C** Zur Bestätigung der Sauerstoffrestriktion wurden kontinuierliche Messungen über einen Zeitraum von 48 h mit einem Sauerstoffmessgerät (GOX 100) durchgeführt. (Abkürzungen: *Mtb* = *Mycobacterium tuberculosis*, $O_2$ = Sauerstoff).

### 2.2.3 Analyse- und Messverfahren

#### 2.2.3.1 IFN-γ-ELISA

IFN-γ ist ein Zytokin, das von aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen freigesetzt wird und insbesondere der Aktivierung von Makrophagen dient. Die Quantifizierung der IFN-γ-

Freisetzung durch Kurzzeit-T-Zelllinien mittels eines ELISAs diente als Nachweis für deren antigenspezifische Reaktion auf *Mtb*-Extrakt.

Prinzip dieses immunologischen Nachweisverfahrens ist die Enzym-gekoppelte Umsetzung eines fluorochromen Substrates. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sandwich-ELISA wird IFN-γ zwischen einem „Coating"-Antikörper und einem „Detection"-Antikörper gebunden. Die Durchführung erfolgte nach dem Schema in **Abb. 7**.

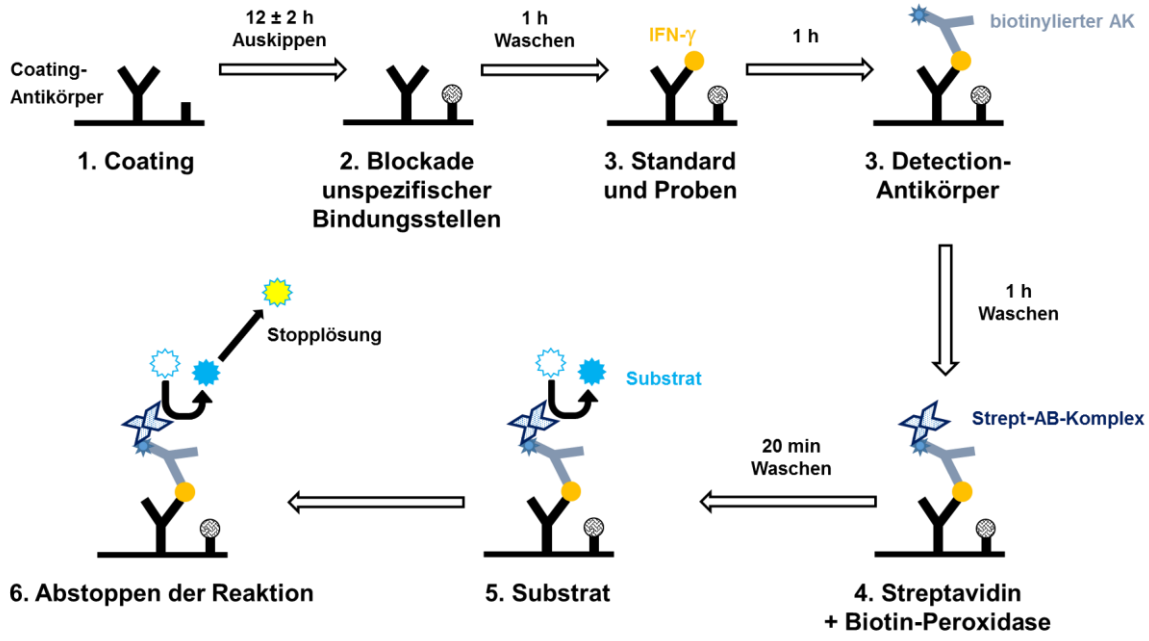



**Abb. 7: Prinzip eines Sandwich-IFN-γ-ELISAs.**
Über Nacht erfolgte die Bindung des Coating-Antikörpers an den Boden der ELISA-Platte. Am nächsten Morgen wurden unspezifische Bindungsstellen mit dem im ELISA-Assay-Puffer enthaltenen BSA blockiert. Nach einem Waschschritt wurden die Standardreihe pipettiert sowie die IFN-γ enthaltenden Proben in einer 1:2-Verdünnung mit ELISA-Assay-Puffer zugegeben. Die Standardreihe hatte eine maximale IFN-γ Konzentration von 4000 pg/mL. Die anschließende sequentielle Zugabe von biotinyliertem anti-IFN-γ-Antikörper, Enzymen und Substrat löste letztendlich eine Farbreaktion aus, deren Stärke abhängig von der initial vorhandenen Menge an IFN-γ war. Die Farbreaktion wurde abgestoppt, sobald die IFN-γ-Standardmessreihe einen deutlichen Farbumschlag nach blau zeigte. (Abkürzungen: IFN-γ = gamma-Interferon, Strept-AB-Komplex = Komplex aus Streptavidin und biotinylierter Peroxidase).

Die optische Dichte des beim IFN-γ ELISA umgesetzten Substrates wurde bei 450 nm gemessen. Aus den bekannten Konzentrationen der Standardreihe und den ermittelten Werten wurde mit Microsoft Excel die Kalibrierungskurve errechnet, mit deren Hilfe sich die IFN-γ-Konzentration der Proben bestimmen ließen. Fiel die IFN-γ-Konzentration zu hoch aus, d.h. lag sie außerhalb des linearen Bereichs, wurde die Analyse in einer

entsprechend höheren Verdünnung (bis 1:10) wiederholt. Die Sensitivität lag bei allen Messungen bei mindestens ≤ 125 pg/mL.

#### 2.2.3.2 Quantitative real-time-PCR

Zur Quantifizierung der Granulysin-mRNA kam eine quantitative real-time-PCR zum Einsatz. Dafür wurde die Granulysin-mRNA zunächst aufgereinigt, von störenden Faktoren befreit und durch Reverse Transkription in stabilere komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

**mRNA-Aufreinigung und DNase-Verdau**

Granulysin-mRNA wurde mit Trizol-Reagenz aufgereinigt. Es handelt sich hierbei um eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat zur Isolierung von RNA-, DNA- und Proteinfraktionen aus Zell- und Gewebeproben. Nach dem Ernten und Waschen der Zellen wurde das Reagenz 5 min zu den Zellen gegeben und die Probe dann mit Chloroform versetzt. Nach 3-minütiger Einwirkzeit folgte ein Zentrifugationsschritt, bei dem die in **Abb. 8** gezeigten Phasen entstanden. Die gesuchte RNA aus der Interphase wurde aufgereinigt und anschließend bei Bedarf bei –20 °C zwischengelagert.

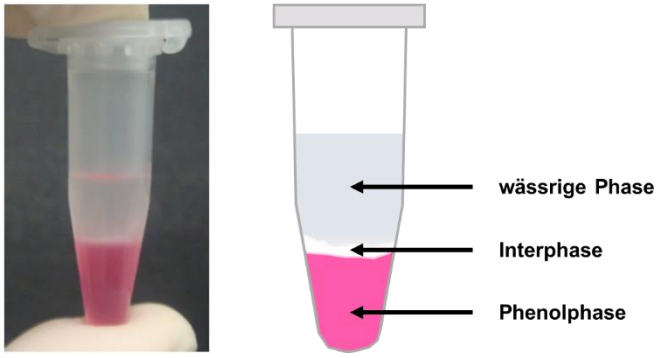



**Abb. 8: Probenröhrchen nach Zugabe von Trizol-Reagenz und Chloroform sowie nach Zentrifugation.**
Foto und Abbildung zeigen drei Phasen: Die wässrige, obere Phase enthält hierbei die gesuchte mRNA.

Um potentielle DNA-Reste zu eliminieren, schloss sich der Aufreinigung ein DNase-Verdau an. Dafür wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser, Protector RNase-Inhibitor, rekombinanter RNase-freier DNase I sowie DNase I-Puffer versetzt und im Thermocycler nach einem vorgegebenen Programm inkubiert. Auf eine Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C

folgte ein 5-minütiger Enzyminaktivierungsschritt bei 75 °C. Anschließend wurden die Proben bei –70 °C bis zur Reversen Transkription weggefroren.

### Reverse Transkription

**Abb. 9** zeigt das Prinzip der Reversen Transkription mit Oligo-d(T)-Primern und H-minus-RTase. Die H-minus-RTase ist eine spezielle Reverse Transkriptase, die über keine RNase H-Aktivität verfügt. Ihre Polymerase-Aktivität ist jedoch uneingeschränkt.

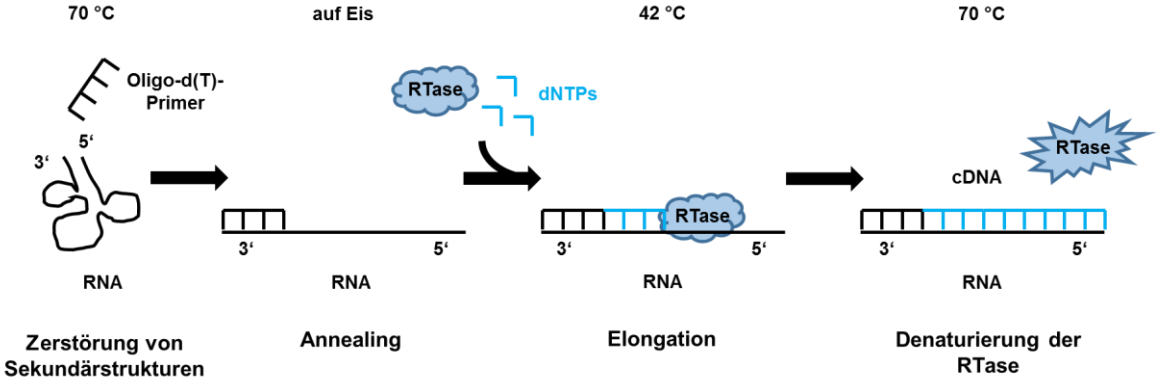



**Abb. 9: Prinzip der Reversen Transkription.**
Für die Reverse Transkription wurde RNA mit RNase-freiem Wasser und Oligo-d(T)-Primern gemischt und im Thermocycler zur Zerstörung von Sekundärstrukturen 10 min lang auf 70 °C erwärmt. Zum Annealing der Primer wurden die Proben danach 1 min lang auf Eis gestellt. Anschließend wurden dNTPs in 5-fach-Puffer und nach 5 min bei 37 °C im Thermocycler H-minus-RTase zugefügt. Die Elongation bei 42 °C dauerte 50 min. Danach wurde die H-minus-RTase innerhalb von 10 min bei 70 °C denaturiert. Fertige cDNA wurde bis zur quantitativen real-time-PCR bei –20 °C zwischengelagert. (Abkürzungen: cDNA = komplementäre Desoxynukleinsäure, dNTP = Desoxynukleotidtriphosphat, Oligo-d(T)-Primer = Oligo-Desoxythymidin-Primer, RNA = Ribonukleinsäure, RTase = Reverse Transkriptase).

### Quantitative real-time-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Menge der in der Gesamt-cDNA enthaltenen Granulysin-cDNA wurde mittels quantitativer real-time-PCR bestimmt. Dieses Verfahren dient der Amplifikation kurzer DNA-Abschnitte. Zeitgleich zur Amplifikation werden die neu synthetisierten Granulysin-DNA-Doppelstränge über eine Fluoreszenzmessung quantifiziert, wobei die Fluoreszenz der amplifizierten DNA proportional zu ihrer Menge ist.

Die Sequenzen der verwendeten Primer für Granulysin und β-Aktin sind in **Tabelle 2** aufgeführt. In der vorliegenden Arbeit kam als Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green zur Anwendung.

Um die Menge an Granulysin-cDNA der einzelnen Proben miteinander vergleichen zu können, wurde das Haushaltsgen (Housekeeping-Gen) β-Aktin gewählt, das ein in allen eukaryonten Zellen vorkommendes Zytoskelettprotein codiert.

Die Vorbereitung für die PCR im Lightcycler verlief nach dem Schema in **Abb. 10**.

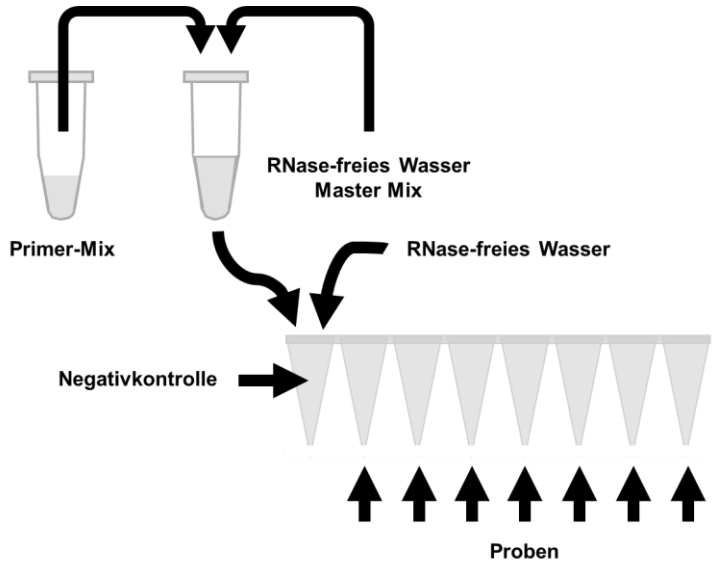



**Abb. 10: Vorbereitung der quantitativen real-time-PCR.**
Der Primer-Mix aus Vorwärts- und Rückwärts-Primern wurde mit RNase-freiem Wasser und Master Mix aus Desoxyribonukleotiden gemischt und mit cDNA bzw. RNase-freiem Wasser (Negativkontrolle) in 8-Tube-Strips gefüllt. Dieser Arbeitsschritt wurde sowohl für Granulysin als auch für β-Aktin durchgeführt. (Abkürzungen: RNA = Ribonukleinsäure).

Die PCR wurde anschließend im Lightcycler Nano in 8-Tube-Strips durchgeführt. Nach einer initialen Aufwärmphase folgte die 3-Schritt-Amplifikation: Bei 95 °C fand die Denaturierung der DNA-Doppelstränge, bei 60 °C das Annealing der Primer statt. Die Elongation zur Synthese neuer DNA-Doppelstränge erfolgte dann bei 72 °C durch die hitzestabile Polymerase in 5‘–3‘-Richtung. Erneutes Erhitzen auf 95 °C leitete den Folgezyklus ein. Ingesamt erstreckte sich die Amplifikation über 40 Zyklen. Durch die Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green in die neu synthetisierten DNA-Doppelstrangamplifikate konnte die Menge des DNA-Produkts bestimmt werden. Die Interpretation der entstandenen Amplifikationskurven wird in **Abb. 11** erklärt.

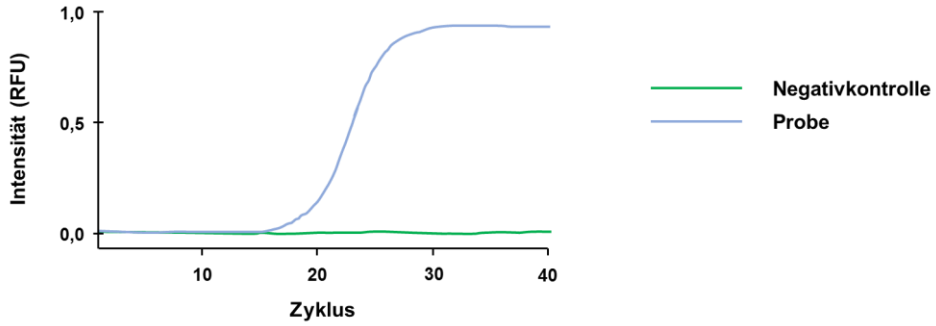



**Abb. 11: Kurvenverlauf bei der quantitativen real-time-PCR (Negativkontrolle und Probe).**

Zu Beginn der Reaktion geht das Signal des Amplifikationsprodukts in der Hintergrundfluoreszenz unter. In der darauffolgenden exponentiellen Phase entstehen bei n Zyklen $2^n$ DNA-Kopien. Über einen weiten Teil dieser Phase ist die Zunahme der Fluoreszenzintensität (RFU) in der hier verwendeten linearen Darstellung im Gegensatz zu einer exponentiellen Darstellung nicht sichtbar. Der Schwellenwert-Zyklus (CT-Wert) ist die Zyklusnummer innerhalb der exponentiellen Phase, bei der die Fluoreszenzintensität eine vom Benutzer festgelegte Schwelle überschreitet. Schließlich verlangsamt sich die Reaktion, erreicht ein Plateau und sistiert, weil die verfügbare Menge an Oligonukleotiden und Primern ab einer gewissen Menge Amplifikationsprodukt aufgebraucht ist. (Abkürzungen: RFU = relative Fluoreszenzeinheiten).

Zum Vergleich der cDNA-Menge zweier Proben wurde die Delta-delta-CT-Methode (ΔΔCT) nach folgendem Berechnungsschema verwendet:

$$\Delta CT = CT_{Granulysin} - CT_{\beta\text{-}Aktin}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{Probe\ 1} - \Delta CT_{Probe\ 2}$$

$$\text{relativer Expressionsunterschied} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Zur Überprüfung der Amplifikationsprodukte diente die Schmelzkurvenanalyse (**Abb. 12**).

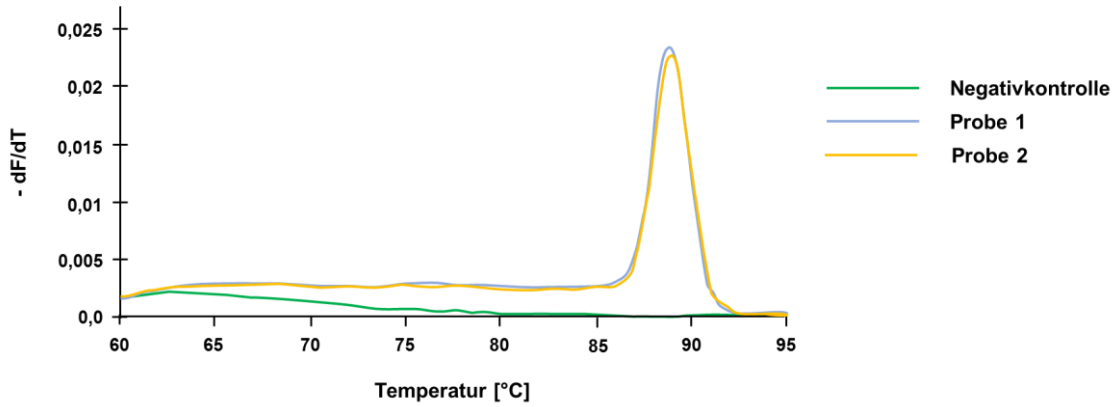



**Abb. 12: Schmelzkurven für β-Aktin.**

Der Schmelzpunkt für β-Aktin liegt bei ca. 88 °C. Dort sind die Peaks der Schmelzkurven zu finden. Die Kurve ist umso höher, je mehr Amplifikationsprodukt vorliegt. In diesem Beispiel ist die Menge an Amplifikationsprodukt ähnlich. Es wurden in etwa gleiche Mengen an Zellmaterial in beiden Proben analysiert. In der Negativkontrolle konnte kein β-Aktin amplifiziert werden, was zeigt, dass die Reagenzien keine potentiell Ergebnis-verfälschende DNA enthielten. Bei unspezifischen Amplifikationsprodukten wären die Maxima der Schmelzkurven bei anderen Temperaturen zu finden. So weisen Primerdimere aufgrund ihrer geringeren Stabilität einen niedrigeren Schmelzpunkt auf. (Abkürzungen: –dF/dT = erste negative Ableitung der Fluoreszenz über die Zeit).

### 2.2.3.3 Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie (FACS) ist ein Verfahren zur Analyse von Zellen hinsichtlich ihrer Größe und Granularität. Einzelzellen werden in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl durch Laserstrahlen geführt. Die dabei emittierten unterschiedlichen Lichtsignale werden in elektronische Signale verwandelt und als Messdaten gespeichert. Die Impulshöhen der einzelnen Parameter werden digitalisiert und die Werte an einen Computer übermittelt. So genannte Streulichtparameter, die sich im Vorwärtsstreulicht (FSC) bzw. Seitwärtsstreulicht (SSC) abbilden, erlauben Aussagen bezüglich der Zellmorphologie. FSC und SSC wurden zur Abgrenzung der untersuchten Zellpopulationen verwendet (**Abb. 13**).

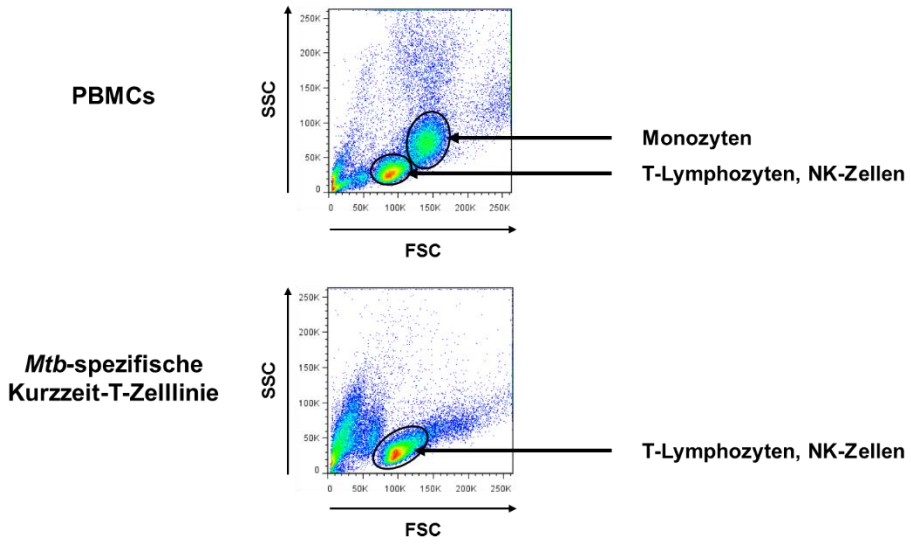



**Abb. 13: Vergleichende Darstellung von PBMCs bzw. einer Kurzzeit-T-Zelllinie im Vorwärtsstreulicht (FSC) bzw. Seitwärtsstreulicht (SSC).**

Bei PBMCs imponieren zwei zellreiche Populationen, die großen Monozyten und die Population der kleineren Lymphozyten und NK-Zellen. In *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinien finden sich hingegen fast nur T-Lymphozyten und NK-Zellen. Im Laufe der Zeit nimmt der Anteil an Zelldedritus zu, der sich durch geringe Größe und Granularität auszeichnet. (Abkürzungen: FSC = Vorwärtsstreulicht, *Mtb* = *Mycobacterium tuberculosis*, NK-Zellen = natürliche Killerzellen, PBMCs = periphere mononukleäre Blutzellen, SSC = Seitwärtsstreulicht).

Die weitere, subtypspezifische Charakterisierung von Zellen ist mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper möglich, die entweder Oberflächenantigene oder intrazelluläre Zielstrukturen binden. Fluoreszenzmarkierte Zellen absorbieren Lichtenergie eines charakteristischen Wellenlängenbereiches (Absorptionsspektrum) und heben damit Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Beim Zurückfallen auf das Ausgangsniveau emittieren die Elektronen Licht (Fluoreszenz). Das abgestrahlte Licht (Emissionsspektrum)

ist langwelliger als das Anregungslicht (**Abb. 14**). Es wird vom Durchflusszytometer detektiert. Bei einer Zellfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen.

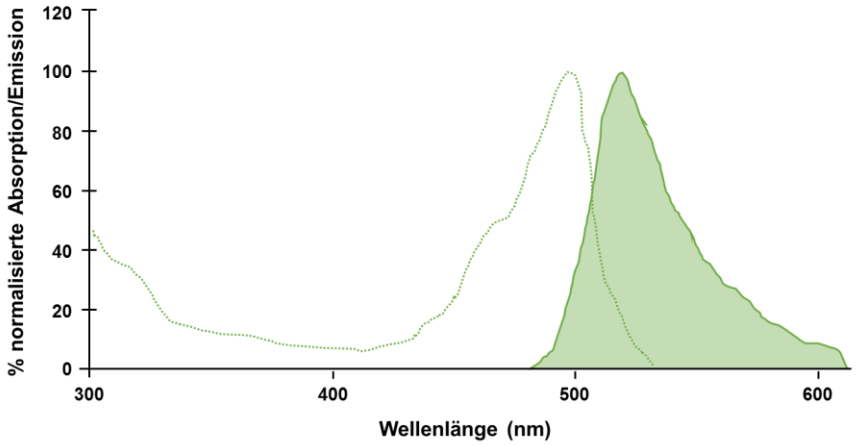



**Abb. 14: Beispiel für das Absorptions- und Emissionsspektrum des Fluorophors FITC nach Biolegend Spectra Analyzer.**
Das Absorptionsspektrum von FITC wird durch die gestrichelte Linie, das Emissionsspektrum durch die farbig hinterlegte Fläche repräsentiert.

Ein Ereignis gilt als positiv und somit eine Struktur als vorhanden, wenn die Fluoreszenzintensität durch einen gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper deutlich über der maximalen Fluoreszenzintensität einer nicht markierten Struktur liegt. Die nicht markierte, aber ansonsten identische Vergleichsprobe ist der Isotyp. Der Isotyp-Antikörper besteht aus der gleichen Immunglobulinklasse wie der für die Färbung verwendete Antikörper. Im Unterschied zum spezifischen Antikörper fehlt dem Isotypen jedoch die spezifische Antigenbindungsdomäne. Unspezifische Bindungen über den Fc-Anteil des Antikörpers sollen so ausgeschlossen werden (**Abb. 15**). Die Darstellung der Daten kann bei Analyse eines einzelnen Parameters als Prozent positiver Zellen oder als Histogramm (Häufigkeitsverteilung der Messsignale eines gemessenen Parameters) erfolgen.

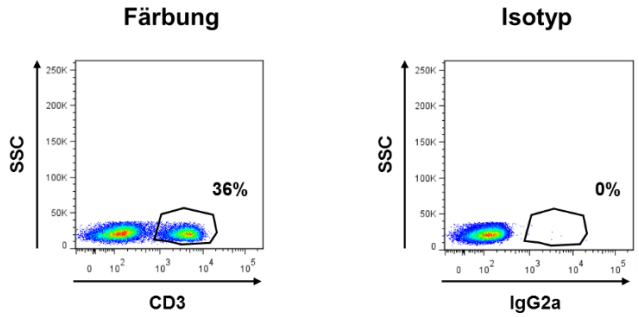



**Abb. 15: Färbung mit einem FITC-gekoppelten anti-CD3-Antikörper. Darstellung der Ergebnisse als Prozent positiver Zellen.**

Innerhalb der dargestellten Lymphozytenpopulation konnten 36% der dargestellten Zellen als abgrenzbare $FITC^+$ Population gewertet werden. Bei Verwendung des Isotypen für Zellen desselben Ansatzes erscheint die stärker leuchtende Population nicht. Die hohe Fluoreszenzintensität der Population ist also durch den verwendeten FITC-gekoppelten anti-CD3-Antikörper bedingt und diese Zellen tragen CD3 auf ihrer Oberfläche. (Abkürzungen: CD = Cluster of Differentiation, FSC = Vorwärtsstreulicht, SSC = Seitwärtsstreulicht).

Für die gleichzeitige Analyse verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe müssen die Emissionsmaxima der unterschiedlich markierten Antikörper deutlich voneinander getrennt sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie für verschiedene Fragestellungen verwendet:

(1) Charakterisierung von Zellpopulationen.

(2) Untersuchung der Viabilität.

(3) Quantifizierung von intrazellulärem Granulysin.

Je nach Fragestellung wurden unterschiedliche Antikörper eingesetzt. Die Aufnahme erfolgte an einem FACS Canto II mit der BD FACSDiva™ Software. Zur Auswertung der gemessenen Daten wurde FlowJo in der Version 7.6.5 verwendet.

### Charakterisierung von Zellpopulationen

Für Populationsanalysen wurden die Zellen nach einem Waschschritt in Färbung und Isotyp aufgeteilt. Es folgte die Inkubation der Zellen mit konjugierten Oberflächenantikörpern (siehe **Tabelle 1**) für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Vor der Aufnahme wurden die Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen, um überschüssige, ungebundene Antikörper zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend in FACS-Puffer resuspendiert.

**Untersuchung der Viabilität**

Für die Überprüfung der Viabilität wurden Kurzzeit-T-Zelllinien nach 48 h Inkubation unter mikroaerophilen Bedingungen bzw. Inkubation in Gegenwart von Chetomin mittels des LIVE/DEAD® Fixable Dead Stain Kit in der Ausführung „Violet“ analysiert. Der Fluoreszenzfarbstoff reagiert mit zellulären Aminen. Bei gesunden Zellen geschieht dies nur an der Zelloberfläche, wohingegen der Farbstoff bei nekrotischen Zellen die Membran überwinden und auch im Zytosol mit freien Aminen reagieren kann. Dies führt im Vergleich mit viablen Zellen zu einer intensiveren Fluoreszenz im PB-Kanal. Vorteil dieser Vitalitätsfärbung im Vergleich zu einer Annexin V-FITC-Färbung ist ihre Kombinierbarkeit mit anderen Oberflächen- oder intrazellulären Färbungen. Die Färbung erfolgte in Analogie zur Oberflächenfärbung. Für den LIVE/DEAD® Fixable Dead Stain Kit gibt es keinen Isotypen, da es sich nicht um ein antikörperbasiertes Verfahren handelt.

**Quantifizierung von intrazellulärem Granulysin**

Zur Quantifizierung der Granulysinexpression wurde ein muriner PE-gekoppelter anti-Granulysin-Antikörper verwendet (**Tabelle 1**). Die Zellen wurden nach einem Waschschritt mit FACS-Puffer in Färbung und Isotyp aufgeteilt. Anschließend erfolgte eine Fixation mit 4%-igem Paraformaldehyd bei 4 °C für 15 min unter Lichtausschluss. Danach wurden zwei Waschschritte mit FACS-Puffer bzw. mit Permeabilisierungspuffer durchgeführt. Zur Färbung wurden die Zellen für mindestens 30 min bei 4 °C unter Lichtausschluss mit dem intrazellulär bindenden anti-Granulysin-Antikörper inkubiert. Vor der Aufnahme am Durchflusszytometer wurden die Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen, um ungebundene, überschüssige Antikörper zu entfernen. Bei der Auswertung wurde der prozentuale Anteil Granulysin-positiver ($Granulysin^+$) Lymphozyten bestimmt.

### 2.2.4 Statistische Auswertung

Das Vorliegen statistischer Signifikanz wurde (soweit nicht anders beschrieben) mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests überprüft. Es wurde ein Konfidenzintervall von 95% angenommen, wodurch Werte als signifikant galten, wenn sich rechnerisch ein $p \leq 0{,}05$ ergab. Zur Kennzeichnung des Signifikanzniveaus in den Abbildungen wurden Sterne (*) nach folgendem Prinzip verwendet:

| | |
|---|---|
| * | $p \leq 0,05$ |
| ** | $p \leq 0,01$ |
| *** | $p \leq 0,001$ |
| **** | $p \leq 0,0001$ |

Die Daten wurden entweder als arithmetisches Mittel oder als Einzelwerte dargestellt, was aus der jeweiligen Bildunterschrift hervorgeht. Als Fehlerindikator wurde der Standardfehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean, SEM) verwendet.

### 2.2.5 Software

In **Tabelle 3** sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Computerprogramme mit ihrer jeweiligen Anwendung aufgelistet.

**Tabelle 3: Verwendete Computerprogramme.**

| Programm | Hersteller | Anwendung |
|---|---|---|
| BD FACSDiva™ | BD Biosciences | Aufnahme der FACS-Daten |
| Excel | Microsoft Inc. | Datenerfassung und –bearbeitung |
| FlowJo 7.6.5 | Tree Star Inc. | Auswertung von FACS-Daten |
| Lightcycler Software | Roche | Auswertung von PCR-Daten |
| PowerPoint | Microsoft Inc. | Erstellen von Abbildungen |
| Prism | GraphPad Inc. | Statistische Auswertung |
| Word | Microsoft Inc. | Textbearbeitung |

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Zelluläre Zusammensetzung von Kurzzeit-T-Zelllinien

Um die antigen- und sauerstoffabhängige Regulation von Granulysin zu untersuchen, wurden *Mtb*-spezifische Kurzzeit-T-Zelllinien hergestellt und fünf dieser Zelllinien hinsichtlich der Expression von CD3-, CD4-, CD8- und CD56-Oberflächenantigenen untersucht (**Abb. 16A, B**).

Kurzzeit-T-Zelllinien bestanden hierbei aus 81–92% $CD3^+$ Lymphozyten sowie 7–15% $CD3^-$ Lymphozyten. Die $CD3^+$ Zellen umfassten durchschnittlich 45–74% $CD4^+$ sowie 15–20% $CD8^+$ T-Zellen (**Abb. 16C**). Der überwiegende Anteil der $CD3^-$ Lymphozyten entfiel auf die $CD56^+$ NK-Zellen (80–81%). 3–13% der $CD3^+$ Zellen waren $CD56^+$ NKT-Zellen (**Abb. 16D**).

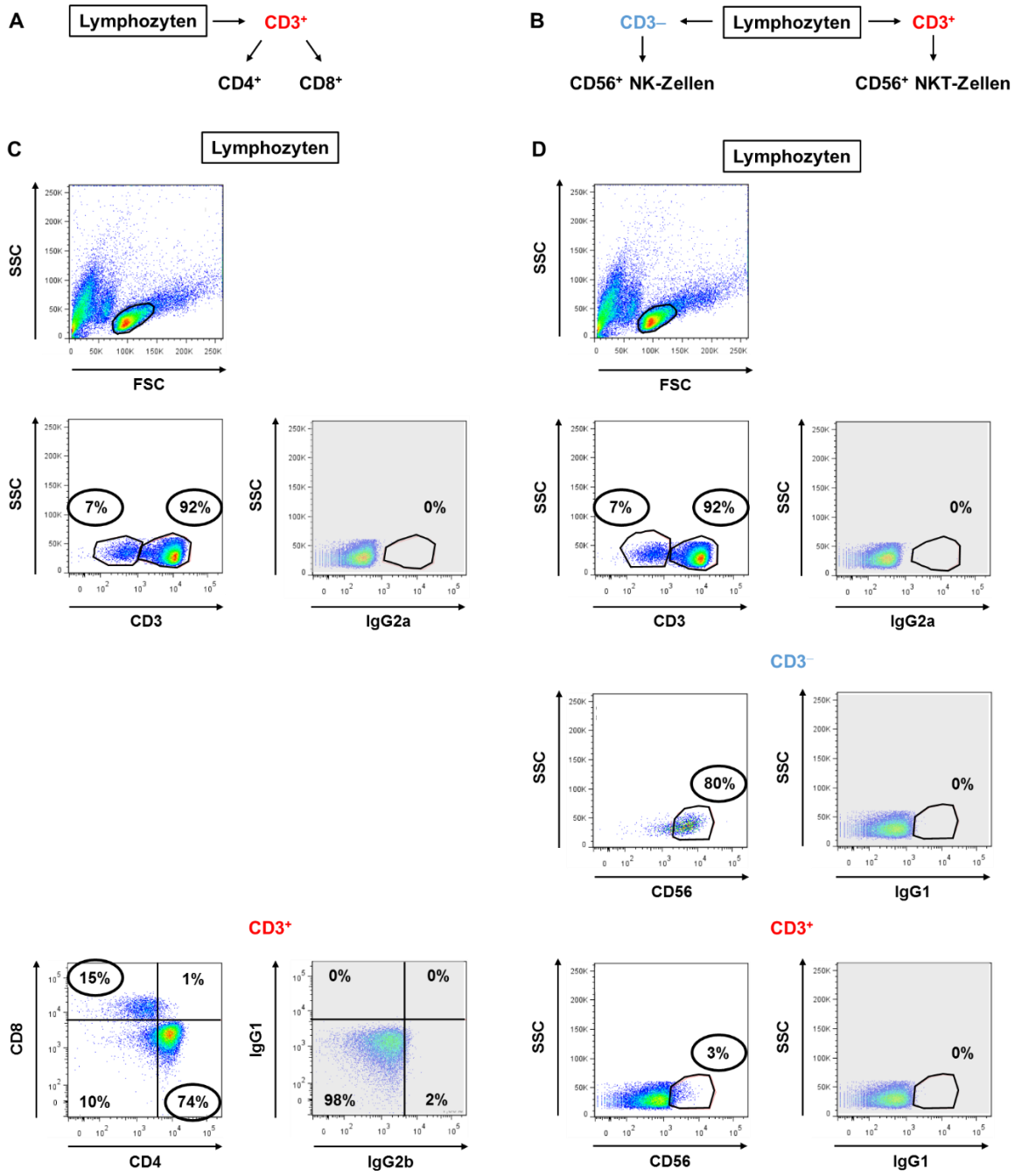



**Abb. 16: Durchflusszytometrische Charakterisierung der Lymphozyten einer Kurzzeit-T-Zelllinie.**

2 x $10^6$ Zellen einer 2,5 Wochen alten Kurzzeit-T-Zelllinie wurden auf die Expression von CD3 (FITC), CD4 (PB), CD8 (PerCP) und CD56 (PE/Cy7) hin untersucht. Abschnitt **A** zeigt die in Abschnitt C, Abschnitt **B** die in Abschnitt D verwendete Gating-Strategie. Eine Aufteilung in zwei Färbungen wurde durchgeführt, um Überschneidungen der Emissionsspektren der Antikörper auszuschließen. Für beide Färbungen wurden jeweils passende Isotypen mitgeführt. In der FSC-SSC-Kanaldarstellung lagen T-Lymphozyten und NK-Zellen in einer gut abgrenzbaren Population von relativ geringer Größe und Granularität. Zunächst erfolgte in beiden Färbungen die Analyse auf die Expression von CD3, einem Bestandteil des TCR. **C** Die $CD3^+$ Zellen wurden dann auf die Expression von CD4 und CD8 hin analysiert. **D** Analyse der Expression von CD56 in $CD3^-$ Zellen (NK-Zellen) sowie in $CD3^+$ Zellen (NKT-Zellen). (Abkürzungen: CD = Cluster of Differentiation, FSC = Vorwärtsstreulicht, Ig = Immunglobulin, SSC = Seitwärtsstreulicht).

## 3.2 *Mtb*-Spezifität der Kurzzeit-T-Zelllinien

Um die Antigenspezifität der Kurzzeit-T-Zelllinien zu überprüfen, wurden T-Zellen mit verschiedenen Antigenen für 16 ± 2 h stimuliert und die freigesetzte Menge an IFN-γ anschließend mittels ELISA bestimmt (**Abb. 17**). Stimulation mit *Mtb*-Extrakt führte zu einer 13 ± 2-fachen, hochsignifikanten ($p < 0{,}0001$) IFN-γ-Freisetzung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Medium). In ähnlicher Weise bewirkte das Superantigen SEB, das als Positivkontrolle mitgeführt wurde, eine 15 ± 2-fache ($p < 0{,}0001$) IFN-γ-Freisetzung (**Abb. 17A**). Als antigenspezifisch wurde Zelllinien definiert, bei denen *Mtb*-Extrakt im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu einer ≥ 3-fachen IFN-γ-Freisetzung führte.

Um die Antigenspezifität zu bestätigen, wurde in einem separaten Ansatz die Freisetzung von IFN-γ auf Stimulation mit nicht-mykobakteriellen Antigenen (*Streptococcus pyogenes*-Extrakt, *Candida albicans*-Extrakt) bestimmt. Bei keinem dieser unspezifischen Antigene, die in gleicher Weise wie *Mtb*-Extrakt hergestellt wurden, konnte eine ≥ 3-fache IFN-γ-Freisetzung im Vergleich zur unstimulierte Kontrolle gemessen werden, wohingegen *Mtb*-Extrakt eine signifikante ($p = 0{,}004$) Steigerung der IFN-γ-Freisetzung in den T-Zellen im Vergleich zu *Streptococcus pyogenes*-Extrakt und *Candida albicans*-Extrakt hervorrief (**Abb. 17B**). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass mit diesem Protokoll zuverlässig *Mtb*-spezifische T-Zellen hergestellt werden konnten.

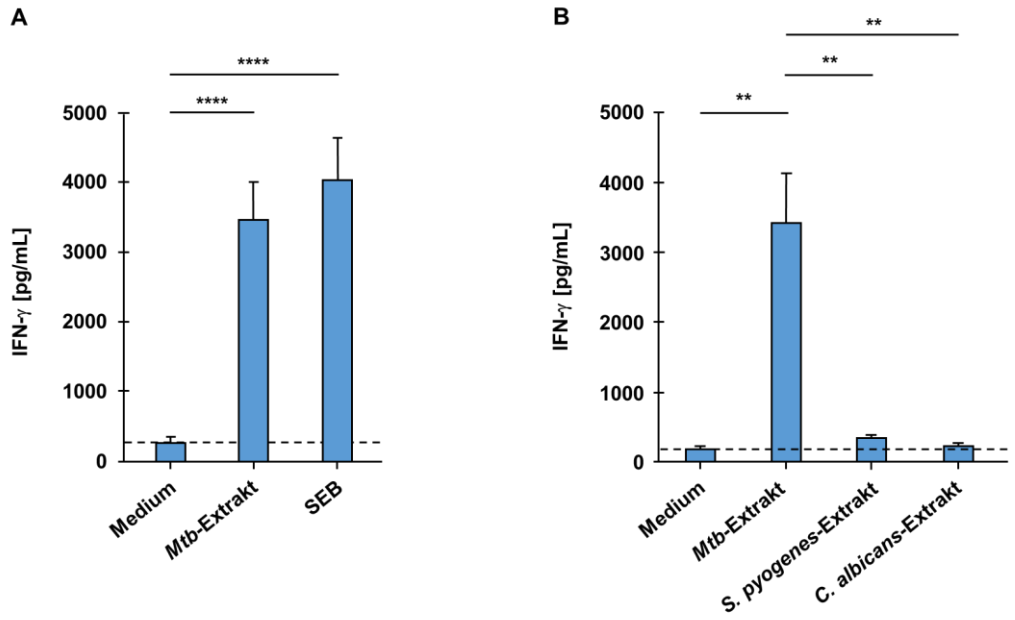



**Abb. 17: Antigenspezifische IFN-γ-Freisetzung *Mtb*-spezifischer Kurzzeit-T-Zelllinien.**
2,5 x $10^4$ Zellen einer Kurzzeit-T-Zelllinie und 2,5 x $10^4$ autologe $CD1^+$APCs wurden bei 37 °C und 20% Sauerstoff ohne bzw. mit dargestellten Antigenen stimuliert. Alle Antigene wurden in einer Endkonzentration von 10 µg/mL eingesetzt. Nach 16 ± 2 h wurden die Überstände abgenommen und mittels eines Sandwich-ELISAs auf ihre IFN-γ-Konzentration untersucht. Darstellung als Mittelwert ± SEM. **A** IFN-γ-Freisetzung in 25 T-Zelllinien nach Inkubation mit Medium, SEB und *Mtb*-Extrakt. **B** IFN -γ-Freisetzung in 8 T-Zelllinien nach Inkubation mit Medium, *Mtb*-Extrakt, *S. pyogenes*-Extrakt und *C. albicans*-Extrakt. (Abkürzungen: *C. albicans* = *Candida albicans*, IFN-γ = gamma-Interferon, *Mtb* = *Mycobacterium tuberculosis*, SEB = Staphylokokken-Enterotoxin B, *S. pyogenes* = *Streptcoccus pyogenes*).

## 3.3 Untersuchung der Granulysinexpression in *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinien

### 3.3.1 Antigenabhängige Hochregulation der Granulysinexpression

#### Antigenabhängige Granulysinexpression auf mRNA-Ebene

Zunächst sollte überprüft werden, ob eine antigenspezifische T-Zell-Aktivierung zu einer antigenabhängigen Hochregulation von Granulysin-mRNA unter normoxischen Sauerstoffbedingungen führt. Hierzu wurden *Mtb*-spezifische T-Zellen für einen Zeitraum von 48 h mit *Mtb*-Extrakt stimuliert. In insgesamt acht unabhängigen Experimenten konnte eine 2,5 ± 0,3-fache Hochregulation (p = 0,004) der Granulysin-mRNA ermittelt werden **(Abb. 18)**.

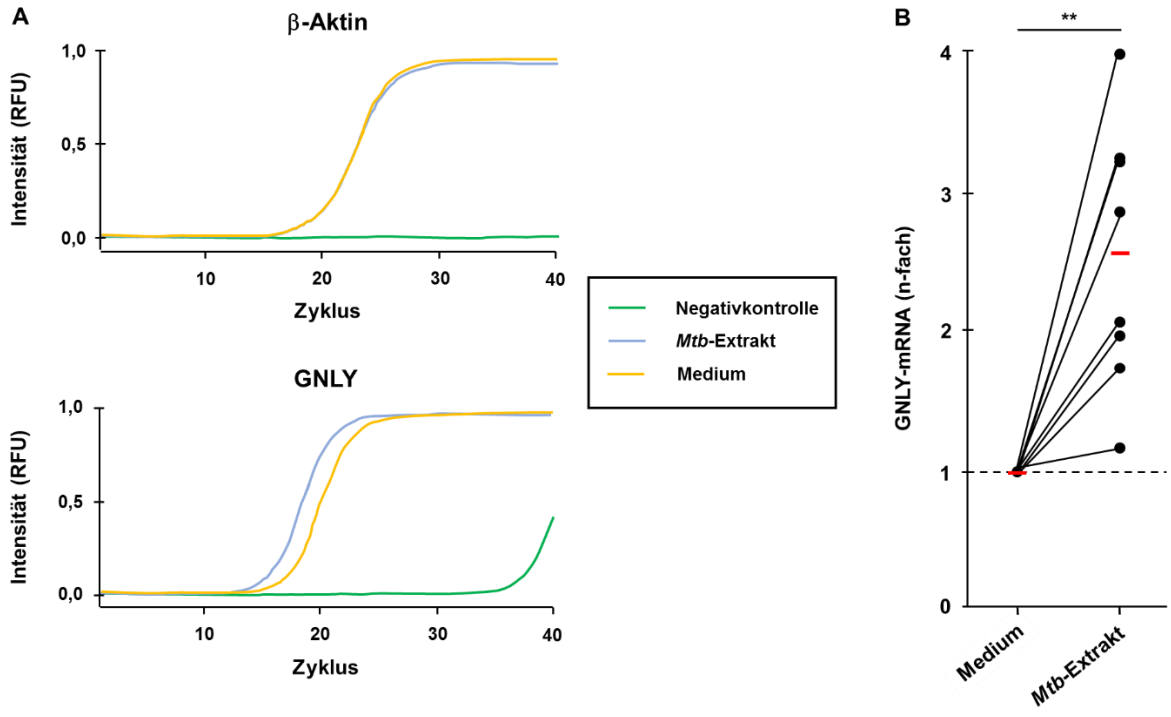



**Abb. 18: Antigenabhängige Granulysinexpression auf mRNA-Ebene.**

2 x $10^6$ Zellen einer *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinie und 2 x $10^5$ autologe $CD1^+$APCs wurden für 48 ± 2 h bei 37 °C und 20% Sauerstoff mit Medium bzw. *Mtb*-Extrakt in einer Endkonzentration von 10 µg/mL inkubiert. Die Quantifizierung der Granulysin-mRNA erfolgte nach Aufreinigung und Reverser Transkription mittels quantitativer real-time-PCR. **A** Im abgebildeten Beispiel sind die CT-Werte der beiden Proben für β-Aktin fast identisch, was bedeutet, dass sich die Menge an Amplifikationsprodukt kaum unterscheidet und die analysierte Zellmenge annähernd gleich ist. Bei Granulysin hingegen liegen die CT-Werte weiter auseinander. Daraus ergibt sich nach der Delta-delta-CT-Methode, dass die stimulierten Zellen mehr Granulysin produziert haben. In der Negativkontrolle konnte entsprechend kein Produkt amplifiziert werden. **B** Darstellung der Einzelwerte für alle 8 analysierten T-Zelllinien. Die Menge an Granulysin-mRNA in stimulierten Zellen wurde mit der in unstimulierten Zellen verglichen, welche als 1 definiert wurde. Der Wert 3,2 kam zweimal vor. Die roten Balken stellen den Mittelwerten für unstimulierte bzw. stimulierte Proben dar. (Abkürzungen: GNLY = Granulysin, mRNA = Boten-Ribonukleinsäure, *Mtb* = *Mycobacterium tuberculosis*, RFU = relative Fluoreszenzeinheiten).

## Antigenabhängige Granulysinexpression auf Proteinebene

Um diese Befunde auf Proteinebene zu verifizieren, wurden in einem separaten Ansatz *Mtb*-spezifische T-Zellen für einen Zeitraum von 48 h mit *Mtb*-Extrakt stimuliert und die Granulysinexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Auch hier ergab sich eine signifikante 1,5 ± 0,3-fache (p = 0,002) Hochregulation von Granulysin in den *Mtb*-Extrakt-stimulierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Proben (**Abb. 19**).

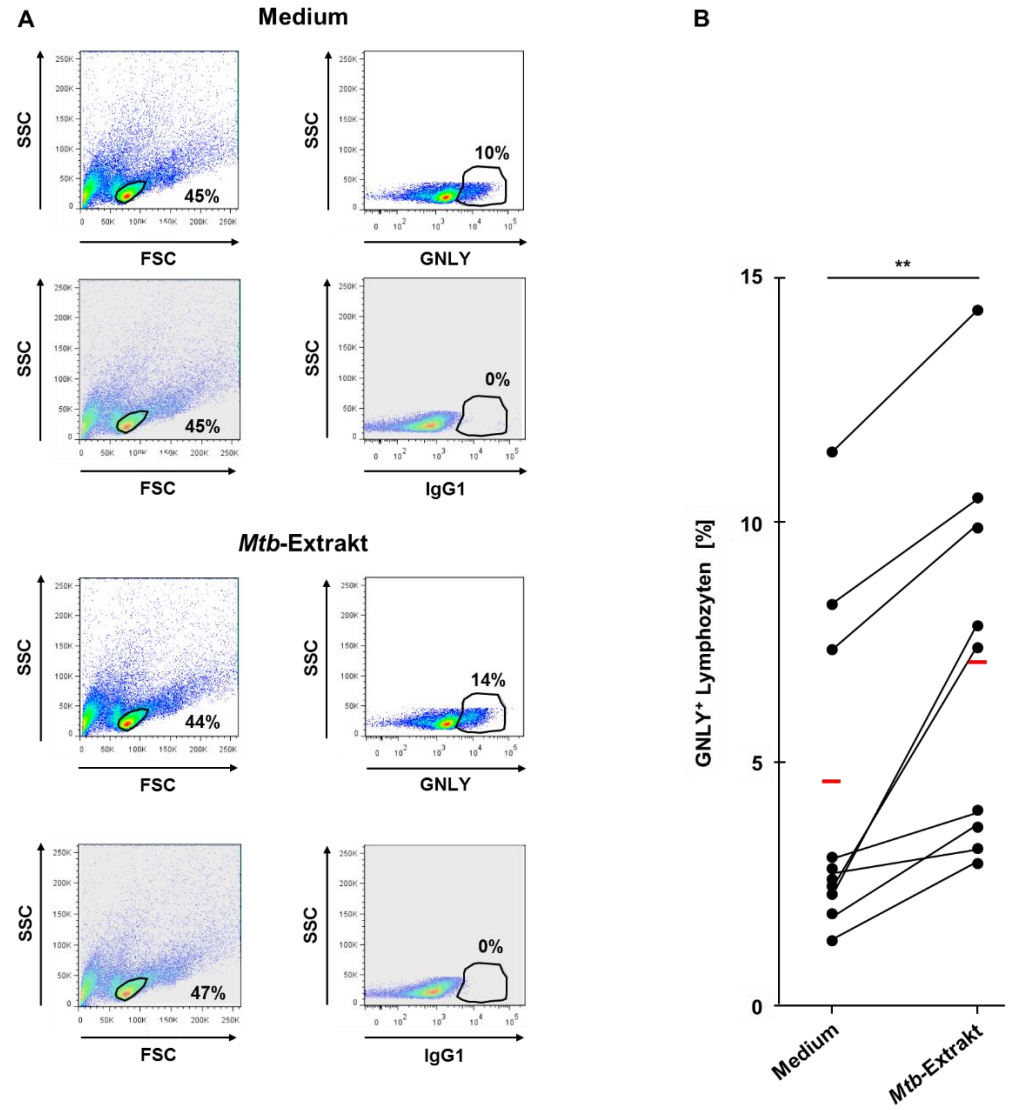



**Abb. 19: Antigenabhängige Granulysinexpression auf Proteinebene.**

2 x $10^6$ Zellen einer *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinie und 2 x $10^5$ autologe $CD1^+$APCs wurden für 48 ± 2 h bei 37 °C und 20% Sauerstoff mit Medium bzw. *Mtb*-Extrakt in einer Endkonzentration von 10 µg/mL inkubiert und durchflusszytometrisch auf ihren Gehalt an Granulysin untersucht. Dabei wurde die Lymphozytenpopulation auf $Granulysin^+$ Lymphozyten hin analysiert. **A** Repräsentatives Beispiel einer intrazellulären Granulysinfärbung. Isotypen sind jeweills grau unterlegt und unter der Färbung angeordnet. **B** Das Diagramm zeigt die Einzelwerte für 9 unterschiedliche *Mtb*-spezifische Kurzzeit-T-Zelllinien. Die roten Balken entsprechen den Mittelwerten für unstimulierte und stimulierte Proben (Abkürzungen: FSC = Vorwärtsstreulicht, GNLY = Granulysin, Ig = Immunglobulin, *Mtb* = *Mycobacterium tuberculsis*, SSC = Seitwärtsstreulicht).

Zur Verifizierung einer antigenspezifischen Hochregulation von Granulysin in *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinien wurde die Expression von Granulysin nach Stimulation mit nicht-mykobakteriellen Antigenen (*Streptococcus pyogenes*-Extrakt, *Candida albicans*-Extrakt) bestimmt. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle wurde bei *Streptococcus pyogenes*-Extrakt (0,97-fach, p = 0,5) bzw. *Candida albicans*-Extrakt (0,97-fach, p = 0,3)

keine Veränderung der Granulysinexpression festgestellt, wohingegen *Mtb*-Extrakt eine signifikante (p = 0,01) Steigerung der Granulysinexpression in den T-Zellen hervorrief (**Abb. 20**).

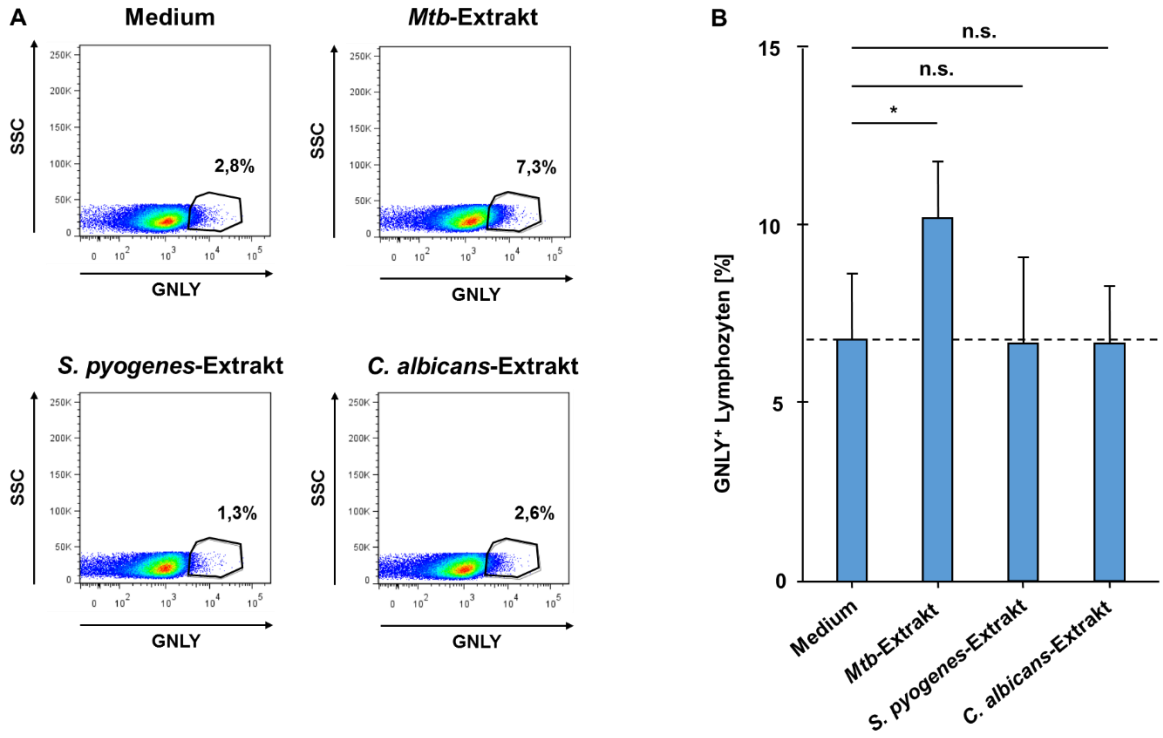



**Abb. 20: Einfluss unspezifischer Antigene auf die Granulysinexpression.**
2 x $10^6$ Zellen einer *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinie und 2 x $10^5$ autologe $CD1^+$APCs wurden für 48 ± 2 h bei 37 °C und 20% Sauerstoff mit Medium bzw. *Mtb*-Extrakt, *S. pyogenes*-Extrakt oder *C. albicans*-Extrakt in einer Endkonzentration von 10 µg/mL inkubiert. Anschließend wurden die $Granulysin^+$ Lymphozyten ermittelt. **A** Repräsentatives Beispiel einer intrazellulären Granulysinfärbung. **B** Das Diagramm zeigt zusammenfassend das Ergebnis der Analyse von 3 unterschiedlichen *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinien. Die blauen Balken stellen die Mittelwerte der $Granulysin^+$ Lymphozyten für unstimulierte und stimulierte Proben dar. Aufgrund des geringen Probenumfangs wurde hier die Signifikanz mit dem Student's t-Test berechnet, * p = 0,01. (Abkürzungen: *C. albicans* = *Candida albicans*, GNLY = Granulysin, *Mtb* = *Mycobacterium tuberculosis*, n.s. = nicht signifikant, SSC = Seitwärtsstreulicht, *S. pyogenes* = *Streptococcus pyogenes*).

Zusammenfassend zeigen diese Experimente somit eine Hochregulation von Granulysin in *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinien auf mykobakterielle Antigene.

### 3.3.2 Sauerstoffrestriktionsabhängige Hochregulation der Granulysinexpression

Neben der antigenspezifischen Hochregulation von Granulysin sollte im Folgenden die sauerstoffabhängige Komponente der Regulation von Granulysin näher charakterisiert

werden. In diesem Zusammenhang wurde in unserem Labor bereits gezeigt, dass Hypoxie ($pO_2$ = 1%) die Expression von Granulysin steigert [153]. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass die Expression von Granulysin möglicherweise unter der Kontrolle des sauerstoffabhängigen Transkriptionsfaktors HIF-1α stehen und damit abhängig vom herrschenden Sauerstoffpartialdruck sein könnte. Um diese Hypothese zu untermauern, wurden Experimente unter mikroaerophilen Bedingungen ($pO_2$ = 5%) durchgeführt.

### Einfluss von mikroaerophilen Sauerstoffbedingungen auf die Viabilität von T-Zellen

Zunächst wurde die Viabilität der Zellen unter mikroaerophilen Sauerstoffbedingungen ($pO_2$ = 5%) überprüft (**Abb. 21**). In unstimulierten wie auch *Mtb*-Extrakt-stimulierten Proben bewirkte eine 48-stündige Inkubation von Kurzzeit-T-Zelllinien unter mikroaerophilen Bedingungen keine Veränderung des zellulären Überlebens.

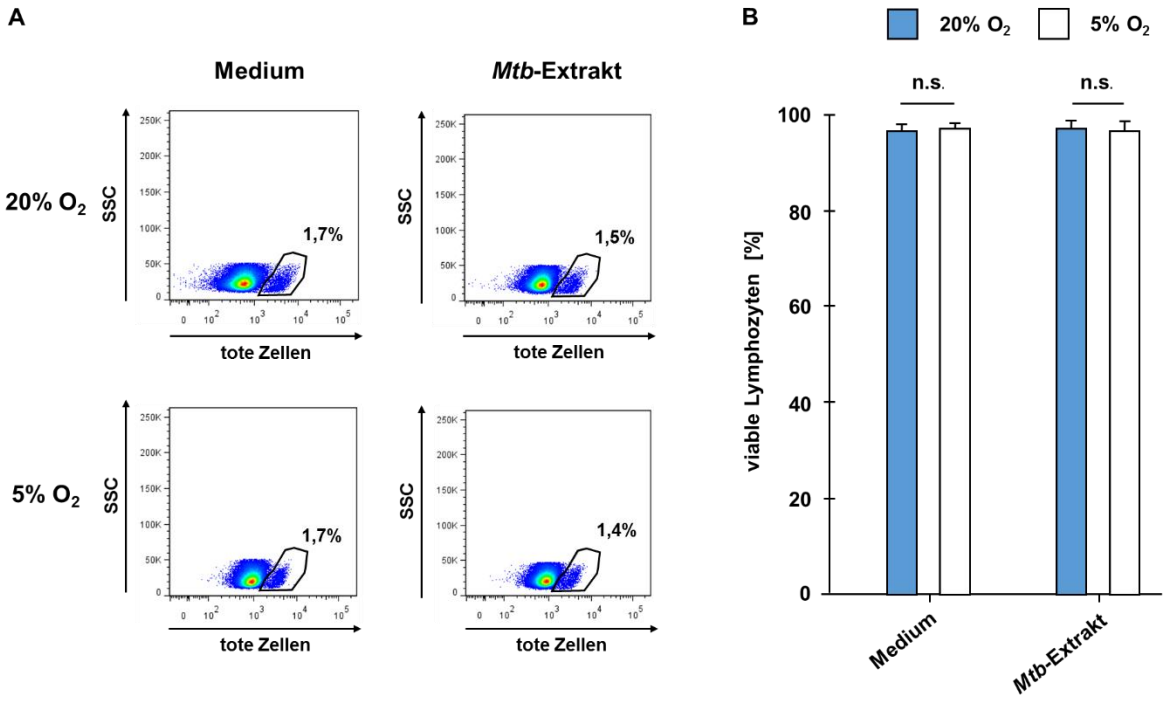



**Abb. 21: Einfluss von mikroaerophilen Sauerstoffbedingungen ($pO_2$ = 5%) auf die Viabilität von T-Zellen.**
$10^6$ Zellen einer *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinie wurden für 48 h bei 37 °C und 20% bzw. 5% Sauerstoff inkubiert und anschließend mit dem LIVE/DEAD® Fixable Dead Stain Kit gefärbt. Es wurden sowohl unstimulierte als auch *Mtb*-Extrakt-stimulierte Zellen analysiert. Die Lymphozytenpopulation wurde auf ihren Anteil an fluoreszierenden und damit toten Zellen untersucht. **A** Repräsentatives Beispiel einer LIVE/DEAD®-Färbung. **B** Zusammenfassendes Ergebnis der Viabilitätsanalyse von 5 unterschiedlichen *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinien. Der Anteil viabler Lymphozyten wurde ermittelt, indem die gesamte Lymphozytenpopulation als 100% definiert und der Anteil toter Zellen davon abgezogen wurde. Die Balken stellen den durchschnittlichen Anteil lebendiger Zellen in der Lymphozytenpopulation für unstimulierte und *Mtb*-Extrakt-stimulierte Proben unter 20% (blau) bzw. 5% Sauerstoff (weiß) dar. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. (Abkürzungen: *Mtb* = *Mycobacterium tuberculosis*, n.s. = nicht signifikant, $O_2$ = Sauerstoff, SSC = Seitwärtsstreulicht).

### Einfluss von mikroaerophilen Sauerstoffbedingungen auf die Granulysin-mRNA-Expression

Um den Effekt von mikroaerophilen Bedingungen auf Expression von Granulysin zu untersuchen, wurden *Mtb*-spezifische T-Zellen zum einen bei normoxischen Sauerstoffbedingungen ($pO_2$ = 20%), zum anderen unter mikroaerophilen Sauerstoffbedingungen ($pO_2$ = 5%) inkubiert. Bei sieben unterschiedlichen *Mtb*-spezifischen T-Zelllinien konnte sowohl ohne Stimulation (2,3 ± 0,4-fach, p = 0,008) als auch bei *Mtb*-Extrakt-Stimulation (2,2 ± 0,4-fach, p = 0,004) eine Hochregulation der Granulysin-mRNA unter mikroaerophilen Bedingungen beobachtet werden (**Abb. 22**).

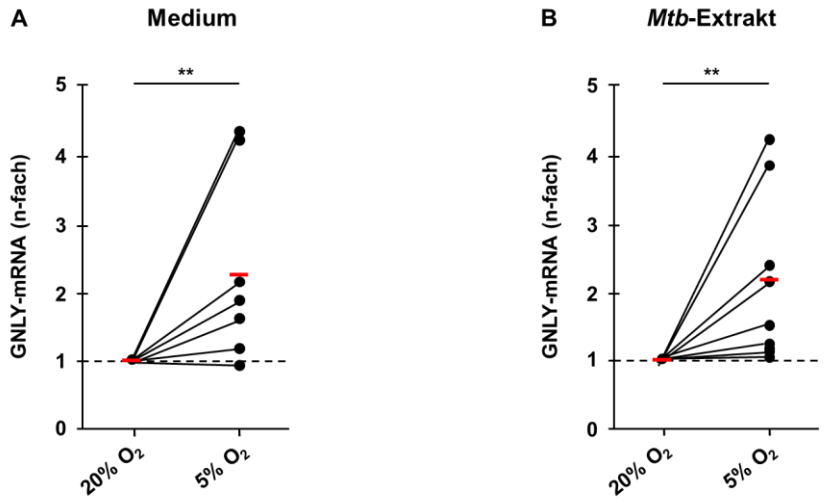



**Abb. 22: Einfluss von mikroaerophilen Sauerstoffbedingungen ($pO_2$ = 5%) auf die Granulysin-mRNA-Expression.**
2 x $10^6$ Zellen einer *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinie und 2 x $10^5$ autologe $CD1^+$APCs wurden für 48 ± 2 h bei 37 °C mit Medium bzw. *Mtb*-Extrakt in einer Endkonzentration von 10 µg/mL stimuliert. Jeder dargestellte Datenpunkt wurde aus einem Doppelansatz berechnet. Jeweils ein Probenpaar wurde bei 20%, das zweite bei 5% Sauerstoff (mikroaerophile Sauerstoffbedingungen) inkubiert. Die Quantifizierung der Granulysin-mRNA erfolgte mittels quantitativer real-time-PCR. Die Menge an Granulysin-mRNA in Zellen unter 5% Sauerstoff wurde mit derjenigen in Zellen bei 20% verglichen. Der 20%-Wert wurde für Medium bzw. *Mtb*-Extrakt jeweils auf 1 gesetzt. Das Diagramm zeigt die Einzelwerte für 7 unterschiedliche *Mtb*-spezifische Kurzzeit-T-Zelllinien. Die roten Balken entsprechen den Mittelwerten. **A** Einfluss von Sauerstoffrestriktion auf unstimulierte Zellen. **B** Einfluss von Sauerstoffrestriktion auf *Mtb*-Extrakt-stimulierte Zellen. (Abkürzungen: GNLY = Granulysin, mRNA = Boten-Ribonukleinsäure, *Mtb* = *Mycobacterium tuberculosis*, $O_2$ = Sauerstoff).

### Einfluss von mikroaerophilen Sauerstoffbedingungen auf die Granulysin-Protein-Expression

Um diese Befunde auf Proteinebene zu verifizieren, erfolgte in Analogie die durchflusszytometrische Analyse der Expression von Granulysin (**Abb. 23**). Inkubation der Zellen unter mikroaerophilen Bedingungen ($pO_2$ = 5%) resultierte in unstimulierten

(1,2 ± 0,3-fach, p = 0,01), wie auch in *Mtb*-Extrakt-stimulierten Zellen (1,4 ± 0,3-fach, p = 0,004) in einer signifikanten Hochregulation von Granulysin.

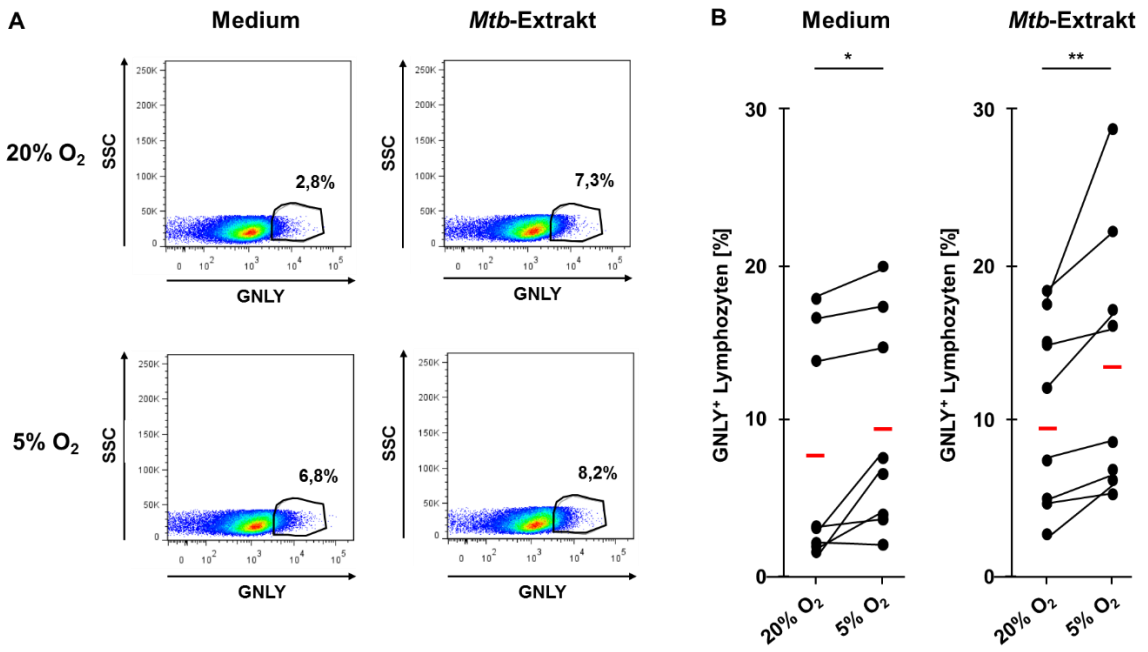



**Abb. 23: Einfluss von mikroaerophilen Sauerstoffbedingungen ($pO_2$ = 5%) auf die Granulysin-Protein-Expression.** 2 x $10^6$ Zellen einer *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinie und 2 x $10^5$ autologe $CD1^+$APCs wurden für 48 ± 2 h bei 37 °C mit Medium bzw. *Mtb*-Extrakt in einer Endkonzentration von 10 µg/mL stimuliert. Die Analyse auf den Gehalt an Granulysin-Protein erfolgte durchflusszytometrisch. Der prozentuale Anteil $Granulysin^+$ Lymphozyten wurde bestimmt. **A** Repräsentatives Beispiel einer intrazellulären Granulysinfärbung. **B** Einzelwerte für 8 unterschiedliche *Mtb*-spezifische Kurzzeit-T-Zelllinien. Die roten Balken entsprechen den Mittelwerten für unstimulierte bzw. stimulierte Proben bei einem $pO_2$ von 5% bzw. 20%. (Abkürzungen: GNLY = Granulysin, *Mtb* = *Mycobacterium tuberculosis*, $O_2$ = Sauerstoff, SSC = Seitwärtsstreulicht).

### 3.3.3 Korrelation zwischen Granulysin- und HIF-1α-Expression

Als potentielles Bindeglied der antigen- und sauerstoffabhängigen Expression von Granulysin wurde ein HIF-1α-abhängiger Signaltransduktionsweg vermutet, da die Aktivität von HIF-1α sowohl TCR-abhängig als auch durch Sauerstoffrestriktion gesteigert wird [93, 106].

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden *Mtb*-spezifische Kurzzeit-T-Zelllinien unter normoxischen ($pO_2$ = 20%) wie auch mikroaerophilen ($pO_2$ = 5%) Bedingungen über 48 h in Medium inkubiert bzw. mit *Mtb*-Extrakt stimuliert und anschließend Ganzzelllysate hergestellt. Die Detektion von HIF-1α erfolgte mittels Westernblot (**Supplement 1**, Anhang). Diese Versuche wurden von Dr. Sebastian Zenk (MyTB-Labor) durchgeführt und

dankenswerterweise für die Dissertation zur Verfügung gestellt. Unter normoxischen Sauerstoffbedingungen ($pO_2$ = 20%) führte *Mtb*-Extrakt zu einer Steigerung der Expression von HIF-1α gegenüber unstimulierten Kontrollbedingungen. Dieser Effekt wurde bei mikroaerophilen Sauerstoffkonzentrationen ($pO_2$ = 5%) noch einmal verstärkt und entsprach in etwa der HIF-1α-Stabilisierung durch den Eisenchelator Deferoxamin (DFO).

Zusammenfassend korreliert somit die antigen- bzw. sauerstoffabhängige Expression von Granulysin mit der Menge an intrazellulärem HIF-1α.

### 3.3.4 Hemmung der Granulysinexpression durch HIF-1α-Inhibition

Die oben dargestellten Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass die antigenspezifische Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (TCR) in einer Steigerung der Expression von HIF-1α resultiert. Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass die Inhibition dieses Signaltransduktionsweges zu einer Reduktion der Granulysinexpression führen müsste. Aus diesem Grund wurden Experimente konzipiert, bei denen die Wirkung des Transkriptionsfaktors HIF-1α durch pharmakologische Inhibition mittels Chetomin gehemmt werden sollte. Das Epidithiodiketopiperazin Chetomin ist ein Pilzmetabolit, der die Interaktion von HIF-1α und HIF-2α mit dem Transkriptionskoaktivator p300 verhindert und so spezifisch mit einer Protein-Protein-Interaktion des HIF-1α-Signaltransduktionswegs interferiert [76].

#### Einfluss von Chetomin auf die Viabilität von T-Zellen

Um den Einfluss von Chetomin auf die Inhibition von HIF-1α zu untersuchen, mussten zunächst toxische Effekte durch das Pharmakon auf Kurzzeit-T-Zelllinien ausgeschlossen werden. Durchflusszytometrisch konnte mittels LIVE/DEAD® Fixable Dead Stain Kit nach 48 h keine signifikante Toxizität von Chetomin in unstimulierten wie auch *Mtb*-Extrakt-stimulierten Zellen gefunden werden (**Abb. 24**).

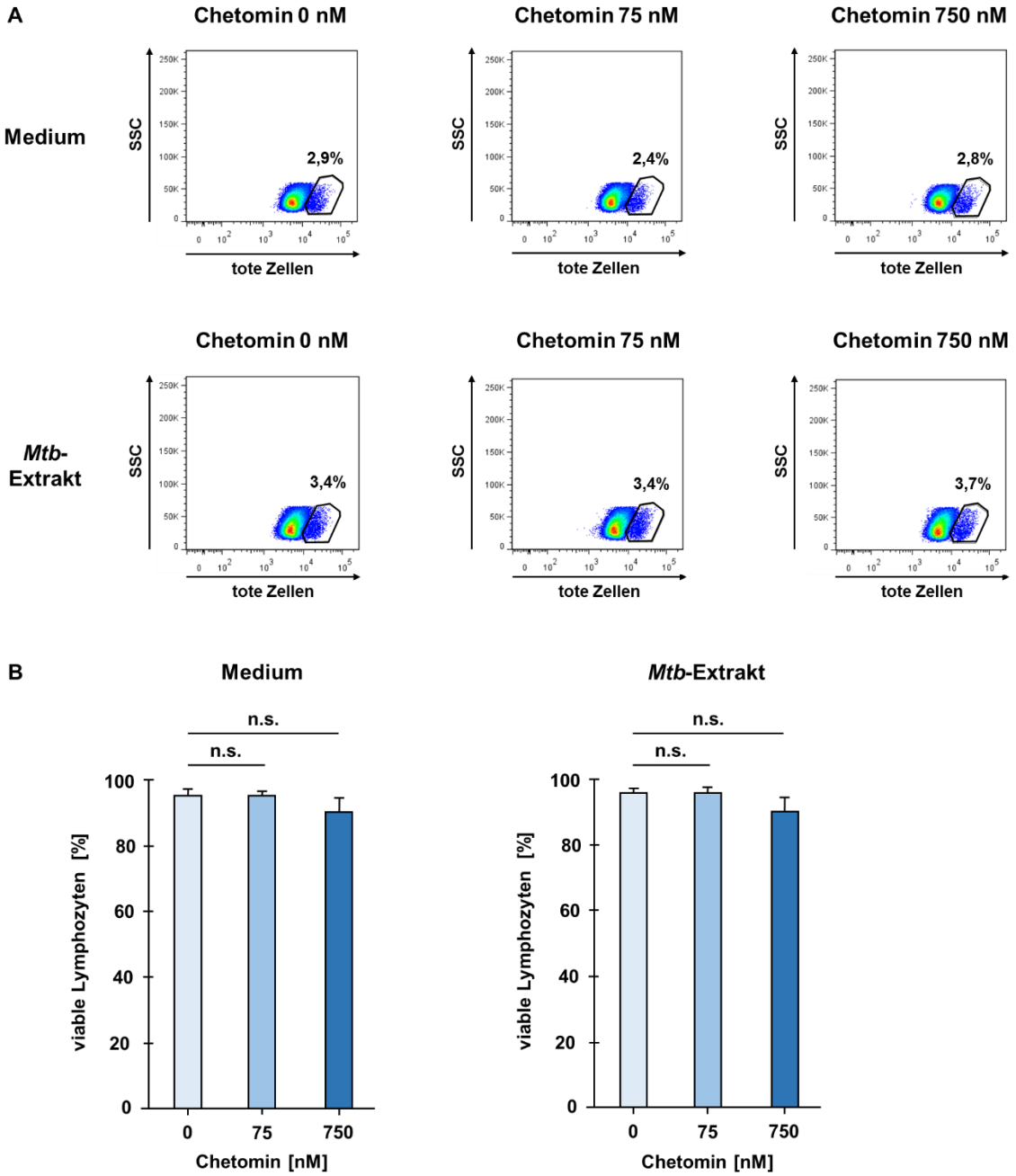



**Abb. 24: Einfluss von Chetomin auf die Viabilität von T-Zellen.**

$10^6$ unstimulierte bzw. *Mtb*-Extrakt-stimulierte Zellen einer *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinie wurden für 48 h bei 37 °C und 20% Sauerstoff mit steigenden Konzentrationen Chetomin inkubiert. Anschließend wurde die Lymphozytenpopulation mittels LIVE/DEAD® Fixable Dead Stain Kit auf Viabilität untersucht. **A** Repräsentatives Beispiel einer LIVE/DEAD-Färbung. Die markierten Populationen zeigen den Anteil der floureszierenden, toten Lymphozytenpopulation. **B** Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Viabilitätsanalyse von 5 unterschiedlichen *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinien. Der Anteil viabler Lymphozyten wurde ermittelt, indem die gesamte Lymphozytenpopulation als 100% definiert und der Anteil toter Zellen davon subtrahiert wurde. Die blau gefärbten Balken stellen den durchschnittlichen Anteil lebendiger Zellen in der Lymphozytenpopulation dar. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. (Abkürzungen: *Mtb* = *Mycobacterium tuberculosis*, nM = nanomolar, n.s. = nicht signifikant, SSC = Seitwärtsstreulicht).

**Inhibition der HIF-1α-Expression durch Chetomin**

Um die Hemmung der Expression von HIF-1α durch Chetomin nachzuweisen, wurden *Mtb*-spezifische Kurzzeit-T-Zelllinien mit *Mtb*-Extrakt stimuliert und in Anwesenheit aufsteigender Konzentrationen Chetomin inkubiert. 48 h später wurden die Zellen lysiert und mittels Westernblot auf die Menge an vorhandenem HIF-1α überprüft. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle führte *Mtb*-Extrakt zu einer Steigerung der Expression von HIF-1α. Zusätzliche Inkubation der *Mtb*-Extrakt-stimulierten Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen Chetomin (75 µM, 750 µM) lösten umgekehrt eine Hemmung der TCR-vermittelten HIF-1α-Expression aus (**Supplement 2**, Anhang).

**Inhibition der Granulysinexpression durch Chetomin**

Neben der Inhibition der Expression von HIF-1α führten aufsteigende Konzentrationen Chetomin zu einer Hemmung der Granulysinexpression. Dieser Effekt betraf die konstitutive Expression von Granulysin in unstimulierten Zellen gleichermaßen wie die antigenspezifische Expression auf Stimulation mit *Mtb*-Extrakt (**Abb. 25**). Der Einsatz von 750 nM Chetomin führte im Vergleich zur jeweils unbehandelten Probe zu einer 40 ± 20%igen Reduktion der Granulysinexpression in unstimulierten ($p = 0{,}008$) bzw. einer 50 ± 20%igen Reduktion der Granulysinexpression in *Mtb*-Extrakt-stimulierten Zellen ($p = 0{,}008$).

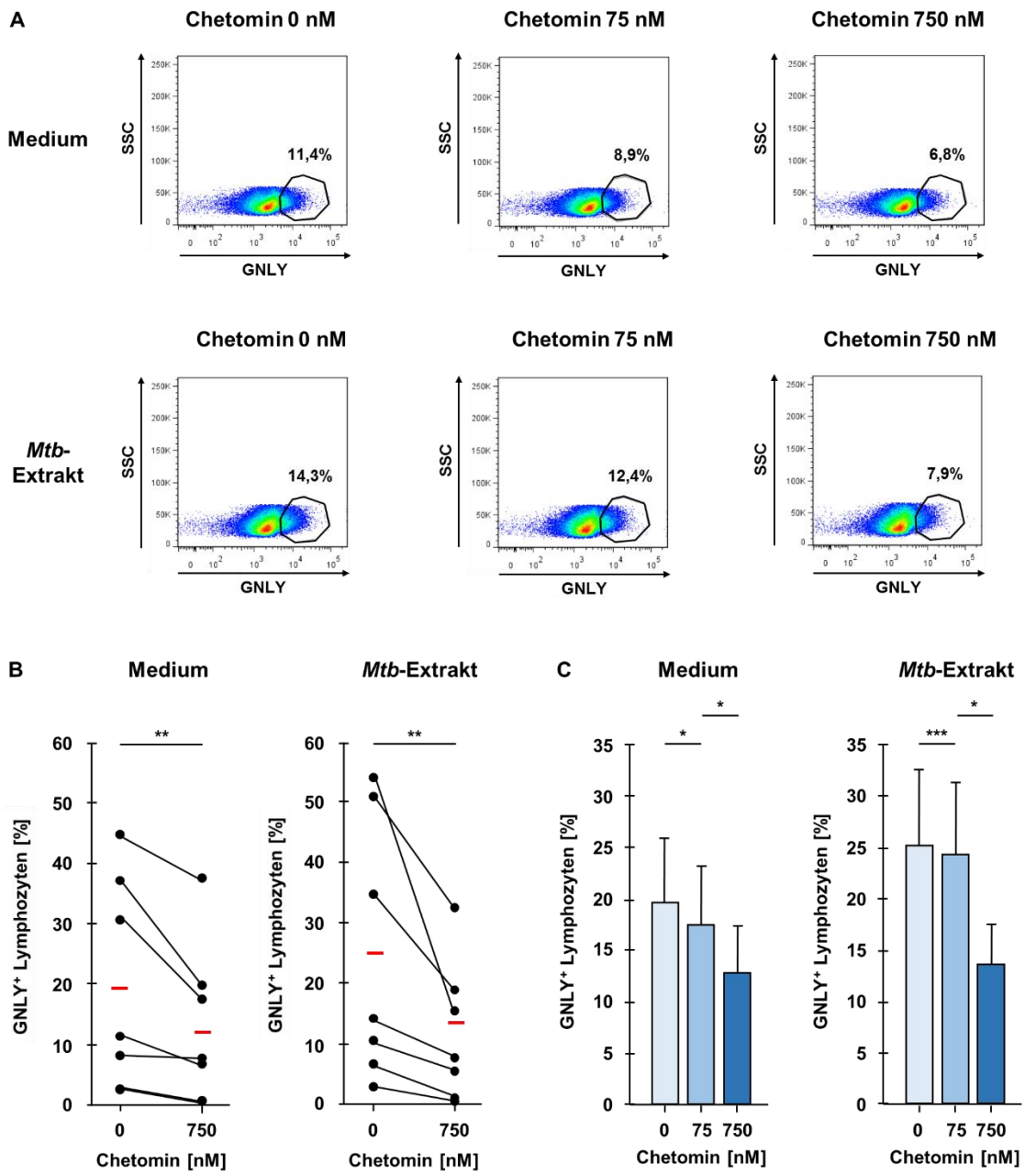



**Abb. 25: Inhibition der Granulysin-Expression durch Chetomin.**

2 x $10^6$ Zellen einer *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinie und 2 x $10^5$ autologe $CD1^+$APCs wurden für 48 ± 2 h bei 37 °C und 20% Sauerstoff inkubiert. Die Zellen blieben entweder unstimuliert oder wurden mit *Mtb*-Extrakt in einer Endkonzentration von 10 µg/mL inkubiert. In den unstimulierten bzw. stimulierten Proben wurde Chetomin in Endkonzentrationen 75 bzw. 750 nM appliziert. Die Messung der Granulysin$^+$ Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. **A** Repräsentatives Beispiel einer intrazellulären Granulysinfärbung für unstimulierte (oben) bzw. *Mtb*-Extrakt-stimulierte Zellen. **B** Darstellung der individuellen Ergebnisse für 7 *Mtb*-spezifische Kurzzeit-T-Zelllinien. Vergleich der Mengen an Granulysin-Protein in unstimulierten (links) und *Mtb*-Extrakt-stimulierten Zellen (rechts) ohne und mit 750 nM Chetomin. Die roten Balken repräsentieren die jeweilgen Mittelwerte. **C** Gesamtdarstellung der Menge an Granulysin$^+$ Lymphozyten für 0, 75 und 750 nM Chetomin sowie vergleichend für unstimulierte Zellen (Medium) und *Mtb*-Extrakt-stimulierte Zellen. Fehlerbalken repräsentieren den SEM. (Abkürzungen: GNLY = Granulysin, *Mtb* = *Mycobacterium tuberculososis*, nM = nanomolar, SSC = Seitwärtsstreulicht).

# 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von Granulysin in humanen Lymphozyten auf mRNA- und Proteinebene sowohl antigenspezifisch als auch durch Sauerstoffrestriktion gesteigert werden kann. Ein Zusammenhang dieser Ergebnisse mit dem HIF-1α-Signaltransduktionsweg konnte durch Chetomin-vermittelte HIF-1α-Inhibition hergestellt werden.

## 4.1 Die Bedeutung von Granulysin bei der Tuberkulose

Granulysin zählt neben Perforin und Granzymen zu den zytotoxischen Effektormolekülen, die synergistisch zur Elimination intrazellulärer Erreger beitragen. Granulysin benötigt Perforin, um ins Zytosol der infizierten Wirtszelle zu gelangen und somit ROS-produzierenden Granzymen Zugang zum Zytosol der Bakterien verschaffen zu können [143]. Zudem verfügt es über die Fähigkeit, extrazelluläre Erreger durch Induktion eines osmotischen Schocks abzutöten. Granulysin ist ein Spezifikum humaner zytotoxischer Zellen. In Mäusen wird Granulysin nicht exprimiert [94].

Granulysin spielt bei der Immunantwort gegen *Mtb* eine wichtige Rolle. So wurde gezeigt, dass Granulysin-Plasmaspiegel mit dem Erfolg der Tuberkulosebehandlung korrelieren [29, 119]. Passend zu diesen Befunden wurden bei Patienten mit frisch diagnostizierter bzw. reaktivierter Tuberkulose signifikant niedrigere Granulysinspiegel gemessen als bei gesunden Kontrollpersonen. Bei Patienten mit latenter Tuberkulose zeigten sich im Vergleich zu Gesunden moderat erniedrigte Plasma-Granulysin-Spiegel. Auch diese Ergebnisse weisen auf eine verstärke immunologische Kontrolle des Erregers hin [113]. In einer Studie von Kita *et al.* konnten sowohl 15 kDa- als auch 9 kDa-Granulysin-transgene Mäuse nach intravenöser Injektion von *Mtb* das Pathogen effektiver bekämpfen als Wildtyp-Mäuse. Es zeigte sich eine Induktion *Mtb*-spezifischer zytotoxischer T-Zellen, eine verstärkte Proliferation *Mtb*-Antigen-stimulierter T-Zellen sowie eine gesteigerte IFN-γ-Produktion in Granulysin-transgenen Mäusen [69]. Ein replikationsdefizientes Adenovirus, das in Makrophagen-ähnlichen Zelllinien (U937, RAW264.7) zur Expression von humanem Granulysin führte, bewirkte eine Reduktion des intrazellulären mykobakteriellen Wachstums. Mäuse, die nach intranasaler *Mtb*-Infektion mit dem Granulysin-exprimierenden Virus behandelt wurden, zeigten in der Lunge eine geringere Bakterienlast als Kontrolltiere [85]. Granulysin wurde auch im Primatenmodell erfolgreich als

therapeutische Vakzine eingesetzt. Der Impfstoff aus einer als Vektor dienenden Sendai-Virus-Hülle und 15 kDa-Granulysin-DNA wurde vier Wochen nach intratrachealer Instillation von *Mtb* sechsmal jeweils im Abstand von zwei Wochen intramuskulär injiziert und führte nach einem Jahr zu einem deutlichen Überlebensvorteil geimpfter Affen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ließ sich in den PBMCs geimpfter Tiere eine gesteigerte Immunantwort in Form verstärkter Proliferation beobachten [69]. Zusammenfassend beweisen diese Studien die Effizienz von Granulysin bei der Bekämpfung von *Mtb*.

## 4.2 Regulation der Granulysinexpression durch HIF-1α

Vor dem Hintergrund der oben dargestellten Bedeutung von Granulysin als Biomarker der antimikrobiellen Aktivität sowie als Bestandteil neuartiger Tuberkulose-Impfstoffe gegen resistente *Mtb*-Stämme [69, 85] war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Regulation des antimikrobiellen Effektormoleküls in humanen T-Zellen genauer zu beleuchten. Dadurch sollte die Grundlage für potentielle neue immunmodulatorische Therapieansätze bei der Tuberkulose untersucht werden. Die antigen- sowie sauerstoffrestriktionsabhängige Regulation von Granulysin ließ vermuten, dass die Expression von Granulysin durch den globalen Transkriptionsfaktor HIF-1α reguliert sein könnte. Durch die Chetomin-vermittelte Inhibition der Interaktion von HIF-1α mit dem Transkriptionskoaktivator p300 [76] konnte tatsächlich die Granulysinexpression in *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinien gehemmt werden.

Die Interpretation von Inhibitorexperimenten ist jedoch grundsätzlich problematisch, weil unspezifische Nebeneffekte nicht ausgeschlossen werden können. Auch bei Chetomin werden solche Effekte diskutiert [66]. Um die Regulation von Granulysin durch HIF-1α zu beweisen, wären daher weitergehende Experimente unverzichtbar. Hierzu sind grundsätzlich drei Optionen denkbar:

(1) Nutzung alternativer HIF-1α-Inhibitoren mit anderen Wirkmechanismen.

(2) Stimulation der HIF-1α-Aktivität durch HIF-Stabilisatoren.

(3) Molekularbiologische Inhibition der HIF-1α-Expression durch siRNA oder shRNA.

Neben Chetomin finden sich in der Literatur weitere HIF-1α Inhibitoren mit anderen Wirkmechanismen. Einer dieser HIF-1 Inhibitoren ist BAY 87-2243, der die Akkumulation

von HIF-1α über Blockade der Aktivität des Komplexes I der Atmungskette hemmt [34]. Initiale Versuche aus unserem Labor, die ebenfalls im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, wiesen darauf hin, dass sich auch durch BAY 87-2243 die Granulysinexpression konzentrationsabhängig inhibieren lässt. 1 nM BAY 87-2243 führte zu einer 40 ± 9%igen Reduktion der Granulysinexpression in unstimulierten bzw. 50 ± 18%igen Reduktion der Granulysinexpression in *Mtb*-Extrakt-stimulierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (bislang unveröffentlichte Daten).

Eine zweite Option, den Effekt von HIF-1α auf die Granulysinexpression zu untersuchen, wäre die Aktivierung des HIF-1α-Pathways. Hierfür stehen insbesondere HIF-1α-Stabilisatoren zur Verfügung, die den Abbau von HIF-1α unter normoxischen Sauerstoffbedingungen durch Hemmung der Prolylhydroxylasen (PHDs) verhindern. Der Wirkmechanismus beruht auf der Blockade des aktiven Zentrums (z.B. Ethyl-3,4-dimethylbenzoat und L-Mimosin), Abfangen des Kosubstrates Eisen durch Chelatoren wie Deferoxamin (DFO) und Hydralazin oder Konkurrenz um die Bindungsstelle von Kosubstraten wie durch Dimethyloxalglycin (DMOG), N-Oxalyl-D-phenylalanin und Metallionen. Oft greifen die Substanzen an mehreren Punkten gleichzeitig an [41]. Von den zahlreichen verschiedenen pharmakologischen Hypoxie-Mimetika wurden im Rahmen dieser Dissertation Pilotversuche mit der pflanzlichen Aminosäure L-Mimosin durchgeführt. L-Mimosin bewirkt neben der Blockade des aktiven Zentrums von PHDs [36, 128] eine Chelatbildung mit Eisen [41]. L-Mimosin induzierte zwar die Expression von HIF-1α (Daten nicht gezeigt), jedoch konnte bei keiner der getesteten L-Mimosinkonzentrationen (5 µM, 50 µM, 500 µM) eine signifikante Steigerung der Granulysinexpression auf Proteinebene in T-Zelllinien festgestellt werden. Stattdessen blieb die Granulysinexpression in 9 unabhängigen Experimenten bei 5 und 50 µM L-Mimosin konstant. Bei einer Konzentration von 500 µM konnte sogar zum Teil ein Rückgang der Granulysinexpression festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Denkbar wäre, dass L-Mimosin unabhängig von seiner Wirkung auf den HIF-1α-Signaltransduktionsweg die T-Zell-Funktion einschränkt, was sich im Endeffekt negativ auf die Expression zytotoxischer Effektormoleküle auswirkt. Für L-Mimosin sind pharmakologische Nebenwirkungen wie die Hemmung der Zellproliferation beschreiben [64], auf die Kurzzeit-T-Zelllinien möglicherweise empfindlicher reagieren als myeloide Zellen und Keratinozyten, deren Abwehrfunktion gegenüber Pathogenen durch L-Mimosin gestärkt wird [108, 155].

Neben der pharmakologischen Inhibition bzw. Aktivierung könnte die HIF-1α-Signalkaskade in humanen T-Zellen *in vitro* mittels eines siRNA- oder shRNA-Knockdowns unterbunden werden. Der Vorteil dieser Technik bestünde darin, dass singulär das vermutete Zielgen ausgeschaltet würde und somit keine pharmakologisch vermittelten Nebenwirkungen zu erwarten wären. In diesem Zusammenhang konnte bereits ein erfolgreicher HIF-1α-siRNA-Knockdown in der humanen HTLV-1-transformierten T-Zell-Leukämie-Zelllinie MT-2 [90] sowie ein HIF-1α-shRNA-Knockdown in murinen T-Zellen [79] gezeigt werden.

Auch wenn noch viele Fragen der Regulation der Expression von Granulysin in humanen T-Zellen offen sind, lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten, dass HIF-1α dabei eine wichtige Rolle spielt. Basierend hierauf ergibt sich unser in **Supplement 3** des Anhangs gezeigtes Modell.

Dieses Modell postuliert, dass das *Granulysin*-Gen, welches auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 liegt (2p11.2), unter dem Einfluss eines Hypoxie-responsiven Elements (HRE) steht. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist diese Vermutung zwar nicht erwiesen, jedoch wurden auf Chromosom 2 mehrere HIF-1α-Zielgene entdeckt, die ebenfalls unter der Kontrolle von HREs stehen. In unmittelbarer Nähe zum *Granulysin*-Gen liegen mindestens drei solcher Zielgene: *HK2* (Hexokinase 2) auf 2p12 sowie *CAPG* (Makrophagen- Capping Protein) und *KDM3A* (Lysin-spezifische Demethylase 3A) auf Chromosom 2p11.2 [129]. Es wäre somit durchaus denkbar, dass auch *Granulysin* ein HIF-1α-Zielgen ist und unter Einfluss eines auf Chromosom 2 gelegenen, noch nicht näher charakterisieren HREs steht. Hierzu passt auch die Beobachtung, dass für die anderen beiden zytotoxischen Effektormoleküle Granzym und Perforin eine ausbleibende Expression in einem murinen HIF-1$^{-/-}$-Modell gezeigt werden konnte [38], und umgekehrt in einem murinen VHL$^{-/-}$-Modell die Expression gesteigert wurde [30]. Zusammenfassend lassen alle diese Beobachtungen eine gemeinsame HIF-1α-abhängige Regulation der drei Effektormoleküle plausibel erscheinen.

## 4.3 Untersuchung funktioneller Effekte der HIF-1α-Inhibition auf die T-Zell-Immunologie

Neben der bislang rein deskriptiven Beschreibung der Regulation der Expression des antimikrobiellen Effektormoleküls Granulysin spielt vor allem die Frage nach den funktionellen Auswirkungen von HIF-1α auf die Granulysinexpression eine entscheidende Rolle. In weiterführenden Experimenten zu dieser Dissertation konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass die Granulysinexpression antigenabhängig sowie unter Sauerstoffrestriktion (*hier* Hypoxie, $pO_2$ = 1%) in $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ sowie $CD3^-CD56^+$ (NK-Zellen) Lymphozyten-Subpopulationen gleichermaßen gesteigert wird [153]. Auch zielgerichtete HIF-1α-Inhibition mittels BAY 87-2243 hemmte die Expression von Granulysin in den verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen zu jeweils gleichen Anteilen [Zenk SF, unveröffentlichte Daten]. Da die Expressionssteigerung eines Proteins auf mRNA- und Proteinebene alleine noch nichts über seine antimikrobiellen Effekte aussagt, wurde der Effekt der Modulation von Granulysin in einem NK-Zell-Degranulationsexperiment funktionell überprüft. Dabei wurden insbesondere die Effekte der NK-Zellen unserer Kurzzeit-T-Zelllinien getestet. Beim Degranulationsassay werden die vorhanden NK-Zellen (Effektorzellen) durch MHC-I-defiziente K652-Zellen einer Leukämie-Zelllinie (Targetzellen) zur Freisetzung zytotoxischer Effektormoleküle angeregt. Die Degranulation wurde durch Messung des Oberflächenmarkers LAMP-1 (CD107a) quantifiziert. Hierbei zeigte sich eine antigenabhängige Steigerung der NK-Zell-Degranulation (vermutlich parakrin IL-2-vermittelt über die antigenspezifische Stimulation $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen) sowie eine BAY 87-2243-vermittelte Hemmung der Degranulation [Zenk SF, unveröffentlichte Daten]. Da die Degranulation auch hier wieder in Analogie zur Expression von Granulysin verlief, lässt diese Beobachtung auch auf funktioneller Ebene einen HIF-1α-abhängigen Effekt vermuten.

## 4.4 Die Relevanz von HIF-1α im Kontext von Infektionserkrankungen

Die Erforschung der Funktion des Transkriptionsfaktors HIF-1α *in vitro* hilft, seine zentrale Bedeutung bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen *in vivo* nachzuvollziehen. Ein Beispiel für einen solchen Prozess sind Infektionserkrankungen.

Zahlreiche molekulare infektions- und entzündungstypische Signale führen auf Transkriptions-, Translations-, und Posttranslationsniveau zur Aktivierung von HIF-1α. Beispielhaft seien hier Effekte von Zytokinen wie IL-1β [65], TNF-α [154] und TGF-β [88] genannt. Die Induktion von HIF-1α kann auch durch LPS [42], humanpathogene Bakterien wie Streptokokken der Gruppe A, MRSA, *Salmonella Typhimurium* und *Pseudomonas aeruginosa* [108], Parasiten wie *Leishmania donovani*, Dermatophyten wie *Trichophyton rubrum* und Viren wie das *Varicella zoster*-Virus getriggert werden [146].

Induktion von HIF-1α in *in vivo*-Tiermodellen verschiedener Infektionserkrankungen bewirkte meist eine Verstärkung der Immunantwort. Umgekehrt resultierte eine Funktionseinschränkung von HIF-1α meist in einem schlechteren Outcome [122].

**Einfluss von HIF-1α auf die angeborene Abwehr**

Es existieren zahlreiche Studien, die den förderlichen Einfluss von HIF-1α auf die Pathogenabwehr durch Zellen des angeborenen Immunsystems bestätigen. So wurde für HIF-1α eine zentrale Rolle bei der Zytokinfreisetzung [1, 137], der Erkennung von Pathogenen [68, 75], der Phagozytose [1, 5, 144), der Chemotaxis [124, 73] und der antimikrobiellen Aktivität [23, 95, 108] beschrieben.

Mäuse mit einem HIF-1α-Knockout ihrer myeloiden Zellen entwickelten in einem Modell der nekrotisierenden Fasziitis nach Infektion mit Streptokokken der Gruppe A signifikant größere Weichteilläsionen als Wildtyp-Mäuse und konnten die systemische Ausbreitung der Erreger ausgehend von einem Weichteilgewebsinfekt nicht eindämmen. Umgekehrt führte die Aktivierung des HIF-1α-Signaltransduktionswegs durch einen VHL-Knockout oder pharmakologische Induktoren (Desferrioxaminmesylat, $CoCl_2$, L-Mimosin) zur Verbesserung der Abwehrfunktion myeloider Zellen. HIF-1α steigerte die Produktion von Schlüsseleffektormolekülen wie Cathepsin G, Neutrophilen-Elastase, Cathelicidin, Stickstoffmonoxid (NO) und TNF-α [108]. In Keratinozyten ließ sich, ebenfalls im Weichteilinfektionsmodell, ein positiver Einfluss von HIF-1α auf die Infektionskontrolle sowie die Produktion des antimikrobiellen Peptids Cathelicidin nachweisen [110]. Umgekehrt konnten Mäuse mit pharmakologisch (L-Mimosin) erhöhten HIF-1α-Spiegeln Hautinfektionen mit MRSA besser kontrollieren [155]. Mäuse mit HIF-1-defizientem intestinalem Epithel erwiesen sich als anfälliger für Infektion mit *Yersinia enterocolitica* [53] und zeigten nach Infektion mit *Clostridium difficile* einen schwereren

Krankheitsverlauf [58]. Bei der Keratitis durch *Pseudomonas aeruginosa* führte ein HIF-1α-Knockdown mit siRNA zu erhöhter Suszeptibilität. HIF-1α erwies sich als zentraler Faktor bei der Abtötung der Bakterien, Produktion antimikrobieller Peptide und Apoptose in Neutrophilen [9]. Der HIF-Stabilisator AKB-4924 verbesserte *in vitro* die antimikrobielle Kapazität von humanen Monozyten, Neutrophilen bzw. Keratinozyten gegenüber *Staphylococcus aureus* (inklusive MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* sowie *Acinetobacter baumanii*. Für *Staphylococcus aureus* wurde der positive Effekt der HIF-Stabilisierung im Mausmodell bestätigt [102]. In einem murinen Harnwegsinfekt-Modell waren Adhärenz und Invasion uropathogener *E. coli* in Urothelzellen bei Behandlung mit AKB-4924 deutlich reduziert. *In vivo* wurden weniger Bakterien aus Urin, Blase und Nieren von transurethral mit AKB-4924 vor- bzw. therapeutisch behandelten Mäusen isoliert, wohingegen die Keimzahl in Mäusen mit HIF-1α-Deletion im Epithel erhöht war und sich durch Behandlung mit AKB-4924 nicht verringern ließ. Der positive Effekt von AKB-4924 korrelierte mit vermehrter Produktion von NO und den antimikrobiellen Peptiden Cathelicidin und β-Defensin-2. Zudem war eine Reduktion der Urothelentzündung bei AKB-4924-behandelten Mäusen nachweisbar [81]. Auch in Mastzellen ließ sich die antimikrobielle Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* durch Echinomycin, einen Transkriptionsinhibitor von HIF-1α-Zielgenen, hemmen und durch AKB-4924 steigern [13].

Während der Effekt von HIF-1α auf die Pathogenabwehr in Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen, Epithelzellen und Mastzellen grundsätzlich als förderlich gilt, scheint seine Wirkung auf die Funktion dendritischer Zellen hingegen widersprüchlich. In mehreren Studien förderten Hypoxie und HIF-1α die Reifung, Migration sowie die Expression von MHC und kostimulatorischen Molekülen [47, 60, 111, 114]. Allerdings existieren für diesen Zelltyp auch Untersuchungen, die teilweise oder ganz das Gegenteil belegen [101, 132]. Gleiches gilt für den Einfluss von HIF-1α auf das Priming naiver T-Zellen durch DCs [101, 151] sowie für die Rolle von HIF-1α in verschiedene *in vivo*-Modellen [11, 52, 71]. Flück *et al*. beobachteten eine HIF-1α-abhängige Induktion von regulatorischen T-Zellen durch dendritische Zellen [40]. An der Immunantwort unreifer und insbesondere reifer dendritischer Zellen auf Hypoxie scheinen neben dem HIF-1α-Signaltransduktionsweg andere Wege beteiligt zu sein [37]. Möglicherweise spielt bei den unterschiedlichen Ergebnissen die Ursache der HIF-1α-Aktivierung (Hypoxie, Entzündung) eine Rolle [11, 61].

**Einfluss von HIF-1α auf die erworbene Abwehr**

Im Vergleich zum Einfluss von HIF-1α auf die angeborene Immunität ist sein Effekt auf das adaptive Immunsystem weniger gut erforscht. HIF-1α ist grundsätzlich unerlässlich für die Funktionalität von Lymphozyten, die sich ständig an wechselnde, oft stark reduzierte Sauerstoffbedingungen anpassen müssen [72, 89].

Lukashev *et al.* postulierten HIF-1α als „negativen T-Zell-Regulator“ [84]. Tatsächlich sprechen Befunde aus unterschiedlichen Studien dafür, dass Hypoxie und Anstieg von HIF-1α das Überleben und die Proliferation von T-Zellen hemmen [78, 135]. Hypoxie bzw. HIF-1α induzierten in einigen Studien einen anti-entzündlichen Lymphozyten-Phänotyp [21, 40]. In diesem Zusammenhang wurde im Rahmen dieser Dissertation die IFNγ-Produktion in *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinien unter mikroaerophilen ($pO_2$ = 5%) sowie anoxischen Sauerstoffbedingungen ($pO_2$ = 0%) untersucht. In fünf Ansätzen zeigte sich unter mikroaerophilen Bedingungen, insbesondere jedoch bei Anoxie, ein deutlicher Rückgang der IFNγ Freisetzung nach 16 ± 2h in SEB- und *Mtb*-Extrakt-stimulierten Proben (Daten nicht gezeigt). Dieser Nachweis reduzierter Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen unter Sauerstoffrestriktion ist kohärent zu den Ergebnissen von Lukashev *et al.* die nach TCR-Stimulation eine verstärkte Zytokinfreisetzung in HIF-1α-defizienten Zellen zeigten [84]. Caldwell *et al.* konnten zeigen, dass dieser Effekt nicht durch eine verminderte Zytokinexpression der einzelnen Zelle zustande kommt, sondern auf der insgesamt reduzierten absoluten Zahl TCR-aktivierter Zellen beruht [17].

Andererseits gibt es auch Untersuchungen, die eine HIF-1α-abhängige Steigerung der antimikrobiellen Aktivität in Lymphozyten zeigen. Eine weitere Studie von Caldwell *et al.* bestätigte zwar reduziertes Überleben muriner zytotoxischer $CD8^+$ T-Lymphozyten unter 2,5% Sauerstoff im Vergleich zu 20%, die überlebenden Zellen wiesen aber eine deutlich gesteigerte lytische Aktivität auf. Eine niedrige Sauerstoffspannung resultierte in einer verspäteten, aber stärkeren CTL-Antwort im Zytotoxizitätsassay [17]. Des Weiteren konnte in einem murinen $VHL^{-/-}$-Modell gezeigt werden, dass die Expression der T-Zell-Effektormoleküle Granzym und Perforin HIF-1α-abhängig gesteigert wird. Im gleichen Modell zeigten HIF-1α-überexprimierende Mäuse eine verbesserte Kontrolle des lymphozytären Choriomeningitisvirus [30]. Die in dieser Arbeit gezeigte HIF-1α-abhängige Regulation des antimikrobiellen Peptids Granulysin in Kurzzeit-T-Zelllinien fügt sich in die Ergebnisse der genannten Studien.

## 4.5 HIF-Stabilisatoren – von der Grundlagenforschung in die Klinik

Da der HIF-1α-Signaltransduktionsweg an zahlreichen pathophysiologischen Zuständen wie Tumoren, Ischämie und Entzündungen beteiligt ist, wird HIF-Modulatoren eine große klinische Relevanz zugeschrieben. Auch im Rahmen von Infektionserkrankungen wird der Einsatz von HIF-Stabilisatoren zunehmend diskutiert [12, 35, 122, 125].

### Potentielle Nebenwirkungen von HIF-Stabilisatoren

Bis jetzt existiert kein HIF-Modulator, der ausschließlich mit dem HIF-1α-Signaltransduktionsweg interferiert, weshalb Nebenwirkungen bei der Applikation *in vivo* zu erwarten sind. Um systemische Nebenwirkungen zu minimieren, müssen die Therapeutika zuverlässig an ihren Bestimmungsort gelangen [125].

Potentielle unerwünschte Nebenwirkungen von HIF-1α-Stabilisatoren sind derzeit durch die mangelnde Selektivität der Pharmaka unumgänglich. Sie ergeben sich je nach Kontext durch die Induktion von Genen wie Endothelin-1 (Vasokonstriktion), Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (Thrombose) oder Fibroblasten-Wachstumsfaktor und Bindegewebs-Wachstumsfaktor (Fibrose). Die Induktion von Angiogenese kann unerwünscht sein, so im Fall ischämischer Retinopathien [57]. Darüber hinaus induzieren Hypoxie-Mimetika in Tumorzellen Tumormetabolismus, -wachstum und Metastasierung. Eine hohe HIF-1α-Expression in Tumoren korreliert mit erhöhter Sterblichkeit [41, 126]. Auch bei Sepsis und systemischen Infektionen ist im Hinblick auf HIF-1α-Induktoren Vorsicht geboten, weil die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Makrophagen nachteilige Effekte haben kann. Hier wäre therapeutisch eine HIF-1α-Inhibition sinnvoller [109].

### Therapeutischer Einsatz von HIF-Stabilisatoren

Zur Induktion des HIF-1α-Signaltransduktionswegs werden momentan in präklinischen und klinischen Studien insbesondere HIF-1α-Stabilisatoren, allen voran PHD-Inhibitoren, getestet. Indikationen ergeben sich aus den Effekten des HIF-1α-Signaltransduktionswegs.

Am weitesten fortgeschritten ist die Etablierung von HIF-1α-Stabilisatoren bei der Therapie der renalen Anämie, wo die Stabilisierung von HIF-1α zur Anregung der Produktion des Hormons Erythropoietin (EPO) genutzt wird. Für diese Indikation befinden sich mehrere PHD-Inhibitoren (FG-2216, Roxadustat, Daprodustat, Molidustat sowie AKB-6548) in

unterschiedlichen klinischen Phasen der Testung. Vorteile liegen in der oralen Bioverfügbarkeit sowie einer potentiell günstigeren Herstellung im Vergleich zu EPO [87]. Auch wurde ein positiver Effekt auf die mit chronischem Nierenversagen assoziierte arterielle Hypertonie beschrieben [39]. Die bisherigen Ergebnisse sind vielversprechend mit Hinweis auf einen eindeutigen Nutzen [14].

Ein weiteres potentielles Einsatzgebiet von Hypoxie-Mimetika liegt im Bereich ischämischer Erkrankungen und Komplikationen. HIF-1α-Stabilisatoren sollen hierbei je nach Indikation Angiogenese induzieren oder Gewebe vor Ischämie- und Reperfusionsschäden schützen [41, 57]. HIF-Induktoren könnten beispielsweise als angiogenetische Masterregulatoren eine Therapiealternative für die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) darstellen, nachdem sich einzelne Angiogenese-stimulierende Faktoren wie VEGF in klinischen Studien nicht behaupten konnten. Leider erbrachte der PHD-Inhibitor Daprodustat in einer klinischen Studie nicht den erwünschten Effekt [54].

HIF-1α-Stabilisatoren werden auch in der Transplantationsmedizin als potentielle Mittel zur Verbesserung des Transplantatüberlebens diskutiert [35]. In einem Rattenmodell konnte der PHD-Inhibitor FG-4497, der im Donortier appliziert wurde und nach Transplantation im Transplantat die Induktion von HIF-1α-Zielgenen steigerte, die Nierenfunktion in der Akutphase verbessern und wirkte sich langfristig positiv auf das Transplantatüberleben aus [10].

Die Behandlung von Wundheilungsstörungen infolge unzureichender Durchblutung ist ein weiteres potentielles Einsatzgebiet der HIF-1α-Induktion, das allerdings bisher auch nur im Tiermodell erprobt wurde. Durch Aufhebung der Aktivitätseinschränkung von HIF-1α bei diabetischer Stoffwechsellage mittels PHD-Inhibitoren konnte in Mäusen die Wundheilung deutlich verbessert werden. Besonders vielversprechend scheint hier die lokale Applikation des bereits seit vielen Jahren therapeutisch eingesetzten Eisenchelators Deferoxamin zu sein [18, 149].

Auch im Bereich entzündlicher Pathologien könnte HIF-1α-Induktion den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen. PHD-Inhibitoren wie DMOG, FG-4497 und TRC160334 zeigten *in vivo* im Mausmodell einen protektiven Effekt bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, der zumindest teilweise durch Hemmung der PHD1 vermittelt wird und durch Verbesserung der Barrierefunktion sowie Verringerung der Epithelzellapoptose zustande kommt [24, 50, 136]. PHD-Inhibitoren stellen daher

potentielle Therapiealternativen zu Immunsuppressiva bei der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen dar. Auch beim Akuten Lungenschädigungs-Syndrom (ARDS) wurde eine protektive Wirkung von HIF-1α auf das Lungengewebe nachgewiesen. Insbesondere vor dem Hintergrund der klinisch angewandten Sauerstofftherapie, die den HIF-1α-Signaltransduktionsweg unterdrückt, stellt der Einsatz von HIF-1α-Stabilisatoren eine Therapieoption dar, die in Mäusen bereits erfolgreich eingesetzt wurde [35].

Der Einsatz von HIF-1α-Stabilisatoren zur Behandlung von Infektionskrankheiten wird momentan noch in keiner klinischen Studie erprobt. Dennoch ist die Verwendung von HIF-Stabilisatoren als neue Klasse von Antiinfektiva denkbar [122], weil Ergebnisse aus diversen Tierversuchen einen protektiven Effekt dieser Substanzen gegenüber Erregern wie *Staphylococcus aureus* und MRSA [102, 155] sowie uropathogenen *Escherichia coli* [81] zeigen. Die pharmakologische (DMOG, Panhydroxylaseinhibitor) Stabilisierung von HIF-1α führte im Zebrafischmodell der Tuberkulose ebenso wie die genetische Stabilisierung (dominate HIF-1α-Variante) zur Verringerung der Bakterienlast [33].

In Bezug auf die Tuberkulose besteht insbesondere vor dem Hintergrund des Auftretens von MDR- und XDR-Resistenzen die dringende Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Medikamente. Eine Möglichkeit sind immunmodulatorische wirtsbezogene Therapien, wie die in dieser Dissertation dargestellte HIF-1α-abhängige Expression von Granulysin. Ziel ist es, durch einen polyfunktionalen immunmodulatorischen Ansatz die körpereigenen antimikrobiellen Effektormechanismen zu verbessern. Die Entstehung neuer Resistenzen ist bei solchen Therapieformen unwahrscheinlich, weil das Medikament am Wirt und nicht am Pathogen ansetzt [96].

# 5 Zusammenfassung

Granulysin, ein Effektormolekül zytotoxischer T-Lymphozyten, ist ein entscheidender Bestandteil des adaptiven Immunsystems, der das Wachstum intrazellulärer Bakterien hemmt. Die biologisch aktive 9 kDa-Untereinheit ist ein Lipid-bindendes, saposinartiges Molekül, das an die bakterielle Zellwand bindet und den Transport von Granzymen in das bakterielle Zytosol vermittelt. Granzyme töten intrazelluläre Pathogene durch Bildung reaktiver Sauerstoffradikale ab. Da in unserem Labor vor Kurzem eine Hypoxie-induzierte Stimulation der Expression von Granulysin in humanen T-Zellen gefunden wurde, lag die Vermutung nahe, dass diese Beobachtung auf molekularer Ebene mit dem Hypoxie-induzierten Faktor-1α (HIF-1α) in Verbindung stehen könnte. HIF-1α ist ein zentraler Transkriptionsfakter, der durch verschiedenste Umwelt- und Metabolismussignale aktiviert wird und die T-Zell-Biologie vielseitig beeinflusst. Um die Regulation der Granulysinexpression zu untersuchen, wurden *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-spezifische Kurzzeit-T-Zelllinien hergestellt und ihre Spezifität mittels eines gamma-Interferon-Enzyme-linked Immunosorbent Assays (IFN-γ-ELISA) überprüft. Es konnte eine spezifische Hochregulation von HIF-1α und Granulysin durch mykobakterielle Antigene nachgewiesen werden, die unter mikroaerophilen Sauerstoffbedindungen (Sauerstoffrestriktion, $pO_2$ (Sauerstoffpartialdruck als Angabe in % des atmosphärischen Luftdrucks) = 5%) gesteigert werden konnte. Die antigenspezifische Hochregulation von Granulysin konnte dadurch verifiziert werden, dass Antigene von *Candida albicans* bzw. *Streptococcus pyogenes*, die in identischer Weise wie die *Mtb*-Antigene gewonnen worden waren, in *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinien weder eine IFNγ-Freisetzung noch eine Steigerung der Granulysinexpression auslösen konnten. Umgekehrt führte Chetomin, ein pharmakologischer Inhibitor von HIF-1α, zu einer signifikant reduzierten HIF-1α- und Granulysinexpression. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass HIF-1α die antigenspezifische T-Zell-Aktivierung mit der Expression des antimikrobiellen Effektormoleküls Granulysin auf molekularer Ebene mechanistisch verbindet.

# 6 Literaturverzeichnis

[1] Acosta-Iborra B, Elorza A, Olazabal IM, Martín-Cofreces NB, Martin-Puig S, Miró M, Calzada MJ, Aragonés J, Sánchez-Madrid F, Landázuri MO: Macrophage oxygen sensing modulates antigen presentation and phagocytic functions involving IFN-gamma production through the HIF-1 alpha transcription factor. J Immunol. 182: 3155–3164 (2009)

[2] Ahmad S: Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. Clin Dev Immunol., https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3017943/pdf/CDI2011-814943.pdf (15.02.2017)

[3] Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N: Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. Nature. 392: 86–89 (1998)

[4] Alvarez-Rueda N, Albassier M, Allain S, Deknuydt F, Altare F, Le Pape P: First human model of in vitro Candida albicans persistence within granuloma for the reliable study of host-fungi interactions. PloS One. 7: e40185 (2012)

[5] Anand RJ, Gribar SC, Li J, Kohler JW, Branca MF, Dubowski T, Sodhi CP, Hackam DJ: Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1alpha- dependent manner. J Leukoc Biol. 82: 1257–1265 (2007)

[6] Aoun J, Habib R, Charaffeddine K, Taraif S, Loya A, Khalifeh I: Caseating granulomas in cutaneous leishmaniasis. PloS Negl Trop Dis. 8: e3255 (2014)

[7] Barman H, Walch M, Latinovic-Golic S, Dumrese C, Dolder M, Groscurth P, Ziegler U: Cholesterol in negatively charged lipid bilayers modulates the effect of the antimicrobial protein granulysin. J Membr Biol. 212: 29–39 (2006)

[8] Barral DC, Brenner MB: CD1 antigen presentation: how it works. Nat Rev Immunol. 7: 929–941 (2007)

[9] Berger EA, McClellan SA, Vistisen KS, Hazlett LD: HIF-1α is essential for effective PMN bacterial killing, antimicrobial peptide production and apoptosis in Pseudomonas aeruginosa keratitis. PLoS Pathog. 9: e1003457 (2013)

[10] Bernhardt WM, Câmpean V, Kany S, Jürgensen JS, Weidemann A, Warnecke C, Arend M, Klaus S, Günzler V, Amann K, Willam C, Wiesener MS, Eckardt KU:

Preconditional activation of hypoxia-inducible factors ameliorates ischemic acute renal failure. J Am Soc Nephrol. 17: 1970–1978 (2006)

[11] Bhandari T, Olson J, Johnson RS, Nizet V: HIF-1α influences myeloid cell antigen presentation and response to subcutaneous OVA vaccination. J Mol Med (Berl). 91: 1199–1205 ( 2013)

[12] Bhandari T, Nizet V: Hypoxia-inducible factor (HIF) as a pharmacological target for prevention and treatment of infectious diseases. Infect Dis Ther. 3: 159–174 (2014)

[13] Branitzki-Heinemann K1, Okumura CY, Völlger L, Kawakami Y, Kawakami T, Naim HY, Nizet V, Von Köckritz-Blickwede M: A novel role for the transcription factor HIF-1α in the formation of mast cell extracellular traps. Biochem J. 446: 159–163 (2012)

[14] Brigandi RA, Johnson B, Oei C, Westerman M, Olbina G, de Zoysa J, Roger SD, Sahay M, Cross N, McMahon L, Guptha V, Smolyarchuk EA, Singh N, Russ SF, Kumar S; PHI112844 Investigators: A novel hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitor (GSK1278863) for anemia in CKD: a 28-day, phase 2A randomized trial. Am J Kidney Dis. 67: 861–871 (2016)

[15] Broos CE, van Nimwegen M, Hoogsteden HC, Hendriks RW, Kool M, van den Blink B: Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis. Front Immunol., https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3857538/pdf/fimmu-04-00437.pdf (15.02.2017)

[16] Burroughs SK, Kaluz S, Wang D, Wang K, Van Meir EG, Wang B: Hypoxia inducible factor pathway inhibitors as anticancer therapeutics. Future Med Chem. 5: 553–572 (2013)

[17] Caldwell CC, Kojima H, Lukashev D, Armstrong J, Farber M, Apasov SG, Sitkovsky MV: Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. J Immunol. 167: 6140–6149 (2001)

[18] Catrina, SB, Zheng X: Disturbed hypoxic responses as a pathogenic mechanism of diabetic foot ulcers. Diabetes Metab Res Rev. 32: 179–185 (2016)

[19] Chackerian AA, Alt JM, Perera TV, Dascher CC, Behar SM: Dissemination of Mycobacterium tuberculosis is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. Infect Immun. 70: 4501–4509 (2002)

[20] Chung WH, Hung SI, Yang JY, Su SC, Huang SP, Wie CY et al: Granulysin is a key mediator for disseminated keratinocyte death in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. Nat Med. 14: 1343–1350 (2008)

[21] Clambey ET, McNamee EN, Westrich JA, Glover LE, Campbell EL, Jedlicka P, de Zoeten EF, Cambier JC, Stenmark KR, Colgan SP, Eltzschig HK: Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. Proc Natl Acad Sci U S A. 109: E2784–2793 (2012)

[22] Cohen J: Approval of novel TB drug celebrated – with restraint. Science. 339: 131 (2013)

[23] Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS: HIF-1α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. Cell. 112: 645–657 (2003)

[24] Cummins EP, Doherty GA, Taylor CT: Hydroxylases as therapeutic targets in inflammatory bowel disease. Lab Invest. 93: 378–383 (2013)

[25] Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, Bordman Z, Fu J, Kim Y, Yen HR, Luo W, Zeller K, Shimoda L, Topalian SL, Semenza GL, Dang CV, Pardoll DM, Pan F: Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. Cell. 146: 772–784 (2011)

[26] Datta M, Via LE, Kamoun WS, LiuC, Chen W, Seano G, Weiner DM, Schimel D, England K, Martin JD, Gao X, Xu L, Barry 3rd CE, Jain RK: Anti-vascular endothelial growth factor treatment normalizes tuberculosis granuloma

vasculature and improves small molecule delivery. Proc Natl Acad Sci U S A. 112: 1827–1832 (2015)

[27] Datta M, Via LE, Chen W, Baish JW, Xu L, Barry III CE, Jain RK: Mathematical model of oxygen transport in tuberculosis granulomas. Ann Biomed Eng. 44: 863–872 (2016)

[28] Deng A, Chen S, Li Q, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM: Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. J Immunol. 174: 5243–5248 (2005)

[29] Di Liberto D, Buccheri S, Caccamo N, Meraviglia S, Romano A, Di Carlo P, Titone L, Dieli F, Krensky AM, Salerno A: Decreased serum granulysin levels in childhood tuberculosis which reverse after therapy. Tuberculosis (Edinb). 87: 322–328 (2007)

[30] Doedens AL, Phan AT, Stradner MH, Fujimoto JK, Nguyen JV, Yang E, Johnson RS, Goldrath AW: Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. Nat Immunol. 14: 1173–1182 (2013)

[31] Duque-Correa MA, Kühl AA, Rodriguez PC, Zedler U, Schommer-Leitner S, Rao M, Weiner J 3rd, Hurwitz R, Qualls JE, Kosmiadi GA, Murray PJ, Kaufmann SH, Reece ST: Macrophage arginase-1 controls bacterial growth and pathology in hypoxic tuberculosis granulomas. Proc Natl Acad Sci USA. 111: E4024–4032 (2014)

[32] Ehlers S, Schaible UE: The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. Front Immunol., https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3538277/pdf/fimmu-03-00411.pdf (15.02.2017)

[33] Elks PM, Brizee S, van der Vaart M, Walmsley SR, van Eeden FJ, Renshaw SA, Meijer AH: Hypoxia inducible factor signaling modulates susceptibility to mycobacterial infection via a nitric oxide dependent mechanism. PloS Pathog. 9: e1003789 (2013)

[34] Ellinghaus P, Heisler I, Unterschemmann K, Haerter M, Beck H, Greschat S, Ehrmann A, Summer H, Flamme I, Oehme F, Thierauch K, Michels M, Hess-Stumpp H, Ziegelbauer K: BAY 87-2243, a highly potent and selective inhibitor

of hypoxia-induced gene activation has antitumor activities by inhibition of mitochondrial complex I. Cancer Med. 2: 611–624 (2013)

[35] Eltzschig HK, Bratton DL, Colgan SP: Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases. Nat Rev Drug Discov. 13: 852–869 (2014)

[36] Fang Y, Zhang H, Zhong Y, Ding X: Prolyl hydroxylase 2 (PHD2) inhibition protects human renal epithelial cells and mice kidney from hypoxia injury. Oncotarget. 7: 54317–54328 (2016)

[37] Filippi I, Morena E, Aldinucci C, Carraro F, Sozzani S, Naldini A: Short-term hypoxia enhances the migratory capability of dendritic cell through HIF-1α and PI3K/Akt pathway. J Cell Physiol. 229: 2067–2076 (2014)

[38] Finlay DK, Rosenzweig E, Sinclair LV, Feijoo-Carnero C, Hukelmann JL, Rolf J, Panteleyev AA, Okkenhaug K, Cantrell DA: PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of $CD8^+$ T cells. J Exp Med. 209: 2441–2453 (2012)

[39] Flamme I, Oehme F, Ellinghaus P, Jeske M, Keldenich J, Thuss U: Mimicking hypoxia to treat anemia: HIF-stabilizer BAY 85-3934 (Molidustat) stimulates erythropoietin production without hypertensive effects. PLoS One. 9: e111838 (2014)

[40] Flück K, Breves G, Fandrey J, Winning S: Hypoxia-inducible factor 1 in dendritic cells is crucial for the activation of protective regulatory T cells in murine colitis. Mucosal Immunol. 9: 379–390 (2016)

[41] Fraisl P, Aragonés J, Carmeliet P: Inhibition of oxygen sensors as a therapeutic strategy for ischaemic and inflammatory disease. Nat Rev Drug Discov. 8: 139–152 (2009)

[42] Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J: Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. Biochem J. 396: 517–527 (2006)

[43] Freeman HJ: Granuloma-positive Crohn's disease. Can J Gastroenterol. 21: 583–587 (2007)

[44] Gallegos AM, Pamer EG, Glickman MS: Delayed protection by ESAT-6-specific effector CD4+ T cells after airborne M. tuberculosis infection. J Exp Med 205: 2359–2368 (2008)

[45] Gautam US, Mehra S, Ahsan MH, Alvarez X, Niu T, Kaushal D Role of TNF in the altered interaction of dormant Mycobacterium tuberculosis with host macrophages. PloS One 9: e95220 (2014)

[46] Gideon HP, Phuah J, Myers AJ, Bryson BD, Rodgers MA, Coleman MT, Maiello P, Rutledge T, Marino S, Fortune SM, Kirschner DE, Lin PL, Flynn JL: Variability in tuberculosis granuloma T cell responses exists, but a balance of pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with sterilization. PloS Pathog. 11: e1004603 (2015)

[47] Goth SR1, Chu RA, Pessah IN: Oxygen tension regulates the in vitro maturation of GM-CSF expanded murine bone marrow dendritic cells by modulating class II MHC expression. J Immunol Methods. 308: 179–191 (2006)

[48] Guirado E, Schlesinger LS: Modeling the Mycobacterium tuberculosis granuloma – the critical battlefield in host immunity and disease. Front Immunol. 4: 98 (2013)

[49] Goodwin RA, Des Prez RM: Apical localization of pulmonary tuberculosis, chronic pulmonary histoplasmosis, and progressive massive fibrosis of the lung. Chest. 83: 801–805 (1983)

[50] Gupta R, Chaudhary AR, Shah BN, Jadhav AV, Zambad SP, Gupta RC, Deshpande S, Chauthaiwale V, Dutt C: Therapeutic treatment with a novel hypoxia-inducible factor hydroxylase inhibitor (TRC160334) ameliorates murine colitis. Clin Exp Gastroenterol. 7: 13–23 (2014)

[51] Haapanen, JH, Kass I, Gensini G, Middlebrook G: Studies on the gaseous content of tuberculous cavities. Am Rev Respir Dis. 80: 1–5 (1959)

[52] Hammami A, Charpentier T, Smans M, Stäger S: IRF-5-mediated inflammation limits CD8+ T cell expansion by inducing HIF-1α and impairing dendritic cell functions during Leishmania infection. PloS Pathog. 11: e1004938 (2015)

[53] Hartmann H, Eltzschig HK, Wurz H, Hantke K, Rakin A, Yazdi AS, Matteoli G, Bohn E, Autenrieth IB, Karhausen J, Neumann D, Colgan SP, Kempf VA: Hypoxia-independent activation of HIF-1 by enterobacteriaceae and their siderophores. Gastroenterology. 134: 756–767 (2008)

[54] Hashimoto T, Shibasaki F: Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch. Front Pediatr., https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4408850/pdf/fped-03-00033.pdf (15.02.20117)

[55] Heninger E, Hogan LH, Karman J, Macvilay S, Hill B, Woods JP, Sandor M: Characterization of the Histoplasma capsulatum-induced granuloma. J Immunol. 177: 3303–3313 (2006)

[56] Herzog, H: History of tuberculosis. Respiration. 65: 5–15 (1998)

[57] Heyman SN, Leibowitz D, Mor-Yosef Levi I, Liberman A, Eisenkraft A, Alcalai R, Khamaisi M, Rosenberger C: Adaptive response to hypoxia and remote ischaemia pre-conditioning: a new hypoxia-inducible factors era in clinical medicine. Acta Physiol (Oxf). 216: 395–406 (2016)

[58] Hirota SA, Fines K, Ng J, Traboulsi D, Lee J, Ihara E, Li Y, Willmore WG, Chung D, Scully MM, Louie T, Medlicott S, Lejeune M, Chadee K, Armstrong G, Colgan SP, Muruve DA, MacDonald JA, Beck PL: Hypoxia-inducible factor signaling provides protection in Clostridium difficile-induced intestinal injury. Gastroenterology. 139: 259–269.e3 (2010)

[59] Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Miyokawa N, Bach FH: Isolation and characterization of NK cell and NK/T cell-specific cDNA clones. J. Mol. Crll. Immunol. 4: 295-306 (1990)

[60] Jantsch J, Chakravortty D, Turza N, Prechtel AT, Buchholz B, Gerlach RG, Volke M, Gläsner J, Warnecke C, Wiesener MS, Eckardt KU, Steinkasserer A, Hensel M, Willam C: Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate

lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. J Immunol. 180: 4697–4705 (2008)

[61] Jantsch J, Wiese M, Schödel J, Castiglione K, Gläsner J, Kolbe S, Mole D, Schleicher U, Eckardt KU, Hensel M, Lang R, Bogdan C, Schnare M, Willam C: Toll-like receptor activation and hypoxia use distinct signaling pathways to stabilize hypoxia-inducible factor 1α (HIF1A) and result in differential HIF1A-dependent gene expression. J Leukoc Biol. 90: 551–562 (2011)

[62] Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH: Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O2 tension. Am J Physiol. 271: C1172–1180 (1996)

[63] Jongstra J, Schall TS, Dyer BJ, Clayberger C, Jorgensen J, Davis MM, Krensky AM: The isolation and sequence of a novel gene from a human functional t cell line. J. Exp. Med. 165: 601–614 (1987)

[64] Ju H, Hao J, Zhao S, Dixon IM: Antiproliferative and antifibrotic effects of mimosine on adult cardiac fibroblasts. Biochim Biophys Acta. 1448: 51–60 (1998)

[65] Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L: IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NfkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. FASEB J. 17: 2115–2117 (2003)

[66] Kessler J, Hahnel A, Wichmann H, Rot S, Kappler M, Bache M, Vordermark D: HIF-1α inhibition by siRNA or granulysin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression. BMC Cancer., https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2992520/pdf/1471-2407-10-605.pdf (15.02.2017)

[67] Khan N, Vidyarthi A, Javed S, Agrewala JN: Innate immunity holding the flanks until reinforced by adaptive immunity against Mycobacterium tuberculosis infection. Front Microbiol., https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4789502/pdf/fmicb-07-00328.pdf (15.02.2017)

[68] Kim SY, Choi YJ, Joung SM, Lee BH, Jung YS, Lee JY: Hypoxic stress up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor. Immunology. 129: 516–524 (2010)

[69] Kita Y, Hashimoto S, Nakajima T, Nakatani H, Nishimatsu S, Nishida Y, Kanamaru N, Kaneda Y, Takamori Y, McMurray D, Tan EV, Cang ML, Saunderson P, Dela Cruz EC, Okada M: Novel therapeutic vaccines [(HSP65 + IL-12)DNA-, granulysin- and Ksp37-vaccine] against tuberculosis and synergistic effects in the combination with chemotherapy. Hum Vaccin Immunother. 9: 526–533 (2013)

[70] Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LAB, Netea MG, Van Crevel R: Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. Clin Dev Immunol., https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3095423/pdf/CDI2011-405310.pdf (15.02.2017)

[71] Köhler T, Reizis B, Johnson RS, Weighardt H, Förster I: Influence of hypoxia-inducible factor 1α on dendritic cell differentiation and migration. Eur J Immunol. 42: 1226–1236 (2012)

[72] Kojima H, Sitkovsky MV, Cascalho M: HIF-1 alpha deficiency perturbs T and B cell functions. Curr Pharm Des. 9: 1827–1832 (2003)

[73] Kong T, Eltzschig HK, Karhausen J, Colgan SP, Shelley CS: Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 10440–10445 (2004)

[74] Krensky AM, Clayberger C: Biology and clinical relevance of granulysin. Tissue Antigens. 73: 193–198 (2009)

[75] Kuhlicke J, Frick JS, Morote-Garcia JC, Rosenberger P, Eltzschig HK: Hypoxia inducible factor (HIF)-1 coordinates induction of Toll-like receptors TLR2 and TLR6 during hypoxia. PloS One. 2: e1364 (2007)

[76] Kung AL, Zabludoff SD, France DS, Freedman SJ, Tanner EA, Vieira A, Cornell-Kennon S, Lee J, Wang B, Wang J, Memmert K, Naegeli HU, Petersen F, Eck MJ, Bair KW, Wood AW, Livingston DM: Small molecule blockade of

transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. Cancer Cell. 6: 33–43 (2004)

[77] Lange C, Abubakar I, Alffenaar JW, Bothamley G, Caminero JA, Carvalho AC, Chang KC, Codecasa L, Correia A, Crudu V, Davies P, Dedicoat M, Drobniewski F, Duarte R, Ehlers C, Erkens C, Goletti D, Günther G, Ibraim E, Kampmann B, Kuksa L, de Lange W, van Leth F, van Lunzen J, Matteelli A, Menzies D, Monedero I, Richter E, Rüsch-Gerdes S, Sandgren A, Scardigli A, Skrahina A, Tortoli E, Volchenkov G, Wagner D, van der Werf MJ, Williams B2, Yew WW, Zellweger JP, Cirillo DM; TBNET: Management of patients with multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement. Eur Respir J. 44: 23–63 (2014)

[78] Larbi A, Cabreiro F, Zelba H, Marthandan S, Combet E, Friguet B, Petropoulos I, Barnett Y, Pawelec G: Reduced oxygen tension results in reduced human T cell proliferation and increased intracellular oxidative damage and susceptibility to apoptosis upon activation. Free Radic Biol Med. 48: 26–34 (2010)

[79] Lee JH, Elly C, Park Y, Liu YC: E3 Ubiquitin ligase VHL regulates hypoxia-inducible factor-1α to maintain regulatory T cell stability and suppressive capacity. Immunity. 42: 1062–1074 (2015)

[80] Leung AN: Pulmonary tuberculosis: the essentials. Radiology. 210: 307–322 (1999)

[81] Lin AE, Beasley FC, Olson J, Keller N, Shalwitz RA, Hannan TJ, Hultgren SJ, Nizet V: Role of hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) in innate defense against uropathogenic Escherichia coli infection. PLoS Pathog. 11: e1004818 (2015)

[82] Lipworth S, Hammond RJH, Baron VO, Hu Y, Coates A, Gillespie SH: Defining dormancy in mycobacterial disease. Tuberculosis. 99: 131–142 (2016)

[83] Long R, O'Connor R, Palayew M, Hershfield E, Manfreda J: Disseminated tuberculosis with and without a military pattern on chest radiography: a clinical-pathologic-radiologic correlation. Int J Tuberc Lung Dis. 1: 52–58 (1997)

[84] Lukashev D, Klebanov B, Kojima H, Grinberg A, Ohta A, Berenfeld L, Wenger RH, Ohta A, Sitkovsky M: Cutting edge: hypoxia-inducible factor 1alpha and its

activation-inducible short isoform I.1 negatively regulate functions of CD4+ and CD8+ T lymphocytes. J Immunol. 177: 4962–4965 (2006)

[85] Ma J, Lu J, Huang H, Teng X, Tian M, Yu Q, Yuan X, Jing Y, Shi C, Li J, Fan X: Inhalation of recombinant adenovirus expressing granulysin protects mice infected with Mycobacterium tuberculosis. Gene Ther. 22: 968–976 (2015)

[86] Mantegazza AR, Magalhaes JG, Amigorena S, Marks MS: Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. Traffic. 14: 135–152 (2013)

[87] Maxwell PH, Eckardt KU: HIF prolyl hydroxylase inhibitors for the treatment of renal anaemia and beyond. Nat Rev Nephrol. 12: 157–168 (2016)

[88] McMahon S, Charbonneau M, Grandmont S, Richard DE, Dubois CM: Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. J Biol Chem. 281: 24171–24181 (2006)

[89] McNamee EN, Korns Johnson D, Homann D, Clambey ET: Hypoxia and hypoxia-inducible factors as regulators of T cell development, differentiation, and function. Immunol Res. 55: 58–70 (2013)

[90] Mühleisen A, Giaisi M, Köhler R, Krammer PH, Li-Weber M: Tax contributes apoptosis resistance to HTLV-1-infected T cells via suppression of Bid and Bim expression. Cell Death Dis. 5: e1575 (2014)

[91] Murdoch C, Muthana M, Lewis CE: Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. J Immunol. 175: 6257–6263 (2005)

[92] Nagasawa M, Isoda T, Itoh S, Kajiwara M, Mrio T, Shimizu N et al: Analysis of serum granuylsin in patients with hematopoietic stem-cell transplantation: its usefulness as a marker of graft-versus-host reaction. Am J Hematol. 81: 340–348 (2006)

[93] Nakamura H, Makino Y, Okamoto K, Poellinger L, Ohnuma K, Morimoto C, Tanaka H: TCR engagement increases hypoxia-inducible factor-1 alpha protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human peripheral T cells. J Immunol. 174: 7592–7599 (2005)

[94] Narni-Mancinelli E, Vivier E: Delivering three punches to knockout intracellular bacteria. Cell. 157: 1251–1252 (2014)

[95] Nickel D, Busch M, Mayer D, Hagemann B, Knoll V, Stenger S: Hypoxia triggers the expression of human beta defensin 2 and antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis in human macrophages. J Immunol. 188: 4001–4007 (2012)

[96] Nizet V, Johnson RS: Interdependence of hypoxic and innate immune responses. Nat Rev Immunol. 9: 609–617 (2009)

[97] Ng TW, Saavedra-Ávila NA, Kennedy SC, Carreño LJ, Porcelli SA: Current efforts and future prospects in the development of live mycobacteria as vaccines. Expert Rev Vaccines. 14: 1493–1507 (2015)

[98] Nowag A, Hartmann P: Immunität gegen Mycobacterium tuberculosis. Internist 57: 107–116 (2016)

[99] Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA, Thoma-Uszynski S, Sabet S, Cho S, Krensky AM, Röllinghoff M, Nunes Sarno E, Burdick AE, Rea TH, Modlin RL: T cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. Nat Med. 7: 174–179 (2001)

[100] Oehlers SH, Cronan MR, Scott NR, Thomas MI, Okuda KS, Walton EM, Beerman RW, Crosier PS, Tobin DM: Interception of host angiogenic signaling limits mycobacterial growth. Nature. 517: 612–615 (2015)

[101] Ogino T, Onishi H, Suzuki H, Morisaki T, Tanaka M, Katano M: Inclusive estimation of complex antigen presentation functions of monocyte-derived dendritic cells differentiated under normoxia and hypoxia conditions. Cancer Immunol Immunother. 61: 409–424 (2012)

[102] Okumura CY, Hollands A, Tran DN, Olson J, Dahesh S, von Köckritz-Blickwede M, Thienphrapa W, Corle C, Jeung SN, Kotsakis A, Shalwitz RA, Johnson RS, Nizet V: A new pharmacological agent (AKB-4924) stabilizes hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) and increases skin innate defenses against bacterial infection. J Mol Med (Berl). 90: 1079–1089 (2012)

[103] Olender S, Saito M, Apgar J, Gillenwater K, Bautista CT, Lescano AG, Moro P, Caviedes L, Hsieh EJ, Gilman RH: Low prevalence and increased household clustering of Mycobacterium tuberculosis infection in high altitude villages in Peru. Am J Trop Med Hyg. 68: 721–727 (2003)

[104] Ong CW, Elkington PT, Friedland JS: Tuberculosis, pulmonary cavitation, and matrix metalloproteinases. Am J Respir Crit Care Med. 190: 9–18 (2014)

[105] Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, Ginsberg A, Swaminathan S, Spigelman M, Getahun H, Menzies D, Raviglione M: Tuberculosis. Nat Rev Dis Primers., https://www.nature.com/articles/nrdp201676 (15.02.2017)

[106] Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, Johnson RS: HIF transcription factors, inflammation, and immunity. Immunity. 41: 518–528 (2014)

[107] Peña SV, Hanson DA, Carr BA, Coralski TJ, Krensky AM: Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. J Immunol. 158: 2680–2688 (1997)

[108] Peyssonnaux C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, Hurtado-Ziola N, Nizet V, Johnson RS: HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. J Clin Invest. 115: 1806–1815 (2005)

[109] Peyssonnaux C, Cejudo-Martin P, Doedens A, Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V: Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. J Immunol. 178: 7516–7519 (2007)

[110] Peyssonnaux C, Boutin AT, Zinkernagel AS, Datta V, Nizet V, Johnson RS: Critical role of HIF-1alpha in keratinocyte defense against bacterial infection. J Invest Dermatol. 128: 1964–1968 (2008)

[111] Pierobon D, Bosco MC, Blengio F, Raggi F, Eva A, Filippi M, Musso T, Novelli F, Cappello P, Varesio L, Giovarelli M: Chronic hypoxia reprograms human

immature dendritic cells by inducing a proinflammatory phenotype and TREM-1 expression. Eur J Immunol. 43: 949–966 (2013)

[112] Pipkin ME, Lieberman J: Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. Curr Opin Immunol. 19: 301–308 (2007)

[113] Pitabut N, Mahasirimongkol S, Yanai H, Ridruechai C, Sakurada S, Dhepakson P, Kantipong P, Piyaworawong S, Moolphate S, Hansudewechakul C, Yamada N, Keicho N, Okada M, Khusmith S: Decreased plasma granulysin and increased interferon-gamma concentrations in patients with newly diagnosed and relapsed tuberculosis. Microbiol Immunol. 55: 565–73 (2011)

[114] Rama I, Bruene B, Torras J, Koehl R, Cruzado JM, Bestard O, Franquesa M, Lloberas N, Weigert A, Herrero-Fresneda I, Gulias O, Grinyó JM: Hypoxia stimulus: An adaptive immune response during dendritic cell maturation. Kidney Int. 73: 816–825 (2008)

[115] Reece KM, Richardson ED, Cook KM , Campbell TJ, Pisle ST, Holly AJ, Venzon DJ, Liewehr DJ, Chau CH, Price DK, Figg WD: Epidithiodiketopiperazines (ETPs) exhibit in vitro antiangiogenic and in vivo antitumor activity by disrupting the HIF-1α/p300 complex in a preclinical model of prostate cancer. Mol Cancer., https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4113146/pdf/1476-4598-13-91.pdf (15.02.2017)

[116] Rich AE, Follis RH: The effect of low oxygen tension upon the development of experimental tuberculosis. Bull Johns Hopkins Hosp. 71: 345–363 (1942)

[117] RKI: RKI-Ratgeber für Ärzte, Tuberkulose. Epid Bull. 2: 9–16 (2013)

[118] RKI: Welttuberkulosetag 2016 – Gemeinsam gegen Tuberkulose; Eckdaten zur Tuberkulose in Deutschland für das Jahr 2014; Untersuchung von Asylsuchenden und Flüchtlingen auf Tuberkulose; Mikrobiologische Tuberkulosediagnostik bei Asylsuchenden im Rahmen der Erstuntersuchung; Die Motten; 20 Jahre Welttuberkulosetag – (K)ein Grund zum Feiern. Epid Bull. 10/11: 81–91 (2016)

[119] Sahiratmadja E, Alisjahbana B, Buccheri S, Di Liberto D, de Boer T, Adnan I, van Crevel R, Klein MR, van Meijgaarden KE, Nelwan RH, van de Vosse E, Dieli F, Ottenhoff TH: Plasma granulysin levels and cellular interferon-gamma

production correlate with curative host responses in tuberculosis, while plasma interferon-gamma levels correlate with tuberculosis disease activity in adults. Tuberculosis (Edinb). 87: 312–321 (2007)

[120] Sakai S, Kauffman KD, Schenkel JM, McBerry CC, Mayer-Barber KD, Masopust D, Barber DL: Control of Mycobacterium tuberculosis infection by a subset of lung parenchyma homing CD4 T cells. J Immunol. 192: 2965–2969 (2014)

[121] Samstein M, Schreiber HA, Leiner IM, Sušac B, Glickman MS, Pamer EG: Essential yet limited role for CCR2+ inflammatory monocytes during Mycobacterium tuberculosis-specific T cell priming. eLife 2: e01086 (2013)

[122] Schaffer K, Taylor CT: The impact of hypoxia on bacterial infection. FEBS J. 282: 2260–2266 (2015)

[123] Schilder AM: Wegener's Granulomatosis vasculitis and granuloma. Autoimmun Rev. 9: 483–748 (2010).

[124] Schioppa T, Uranchimeg B, Saccani A, Biswas SK, Doni A, Rapisarda A, Bernasconi S, Saccani S, Nebuloni M, Vago L, Mantovani A, Melillo G, Sica A: Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. J Exp Med. 198: 1391–1402 (2003)

[125] Scholz CC, Taylor CT: Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity. Curr Opin Pharmacol. 13: 646–653 (2013)

[126] Semenza GL: Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. Oncogene. 29: 625–634 (2010)

[127] Sever JL, Youmans GP: The relation of oxygen tension to virulence of tubercle bacilli and to acquired resistance in tuberculosis. J Infect Dis. 101: 193–202 (1957)

[128] Shen X, Wan C, Ramaswamy G, Mavalli M, Wang Y, Duvall CL, Deng LF, Guldberg RE, Eberhart A, Clemens TL, Gilbert SR: Prolyl hydroxylase inhibitors increase neoangiogenesis and callus formation following femur fracture in mice. J Orthop Res. 27: 1298–1305 (2009)

[129] Slemc L, Kunej T: Transcription factor HIF1A: downstream targets, associated pathways, polymorphic hypoxia response element (HRE) sites, and initiative for standardization of reporting in scientific literature. Tumour Biol. 37: 14851–14861 (2016)

[130] Smith I: Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev. 16: 463–496 (2003)

[131] Spada FM, Grant EP, Peters PJ, Sugita M, Melián A, Leslie DS, Lee HK, van Donselaar E, Hanson DA, Krensky AM, Majdic O, Porcelli SA, Morita CT, Brenner MB: Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. J Exp Med. 191: 937–948 (2000)

[132] Spirig R, Djafarzadeh S, Regueira T, Shaw SG, von Garnier C, Takala J, Jakob SM, Rieben R, Lepper PM: Effects of TLR agonists on the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1alpha and dendritic cell maturation under normoxic conditions. PloS One. 5: e0010983 (2010)

[133] Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melián A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science. 282: 121–125 (1998)

[134] Stenger S: Cytolytic T cells in the immune response to mycobacterium tuberculosis. Scand J Infect Dis. 33: 483–487 (2001)

[135] Sun J, Zhang Y, Yang M, Zhang Y, Xie Q, Li Z, Dong Z, Yang Y, Deng B, Feng A, Hu W, Mao H, Qu X: Hypoxia induces T-cell apoptosis by inhibiting chemokine C receptor 7 expression: the role of adenosine receptor A2. Cell Mol Immunol. 7: 77–82 (2010)

[136] Tambuwala MM, Cummins EP, Lenihan CR, Kiss J, Stauch M, Scholz CC, Fraisl P, Lasitschka F, Mollenhauer M, Saunders SP, Maxwell PH, Carmeliet P, Fallon PG, Schneider M, Taylor CT: Loss of prolyl hydroxylase-1 protects against colitis through reduced epithelial cell apoptosis and increased barrier function. Gastroenterology. 139: 2093–2101 (2010)

[137] Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, Frezza C, Bernard NJ, Kelly B, Foley NH, Zheng L, Gardet A, Tong Z, Jany SS, Corr SC, Haneklaus M, Caffrey BE, Pierce K, Walmsley S, Beasley FC, Cummins E, Nizet V, Whyte M, Taylor CT, Lin H, Masters SL, Gottlieb E, Kelly VP, Clish C, Auron PE, Xavier RJ, O'Neill LA: Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1β through HIF-1α. Nature. 496: 238–242 (2013)

[138] Thomssen H, Kahan M, Londei M: IL-3 in combination with IL-4, induces the expression of functional CD1 molecules on monocytes. Cytokine. 8: 476–481 (1996)

[139] Torrado E, Cooper AM: IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. Cytokine Growth Factor Rev. 21: 455–462 (2010)

[140] Van Rhijn I, Moody DB: CD1 and mycobacterial lipids activate human T cells. Immunol Rev. 264: 138–153 (2015)

[141] Via LE, Lin PL, Ray SM, Carrillo J, Allen SS, Eum SY, Taylor K, Klein E, Manjunatha U, Gonzales J, Lee EG, Park SK, Raleigh KA, Cho SN, McMurray DN, Flynn JL, Barry III CE: Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates. Infect Immun. 76: 2333–2340 (2008)

[142] Walch M, Rampini SK, Stoeckli I, Latinovic-Golic S, Dumrese C, Sundstrom H, Vogetseder A, Marino J, Glauser DL, van den Broek M, Sander P, Groscurth P, Ziegler U: Involvement of CD252 (CD134L) and IL-2 in the expression of cytotoxic proteins in bacterial- or viral-activated human T cells. J Immunol. 182: 7569–7579 (2009)

[143] Walch M, Dotiwala F, Mulik S, Thiery J, Kirchhausen T, Clayberger C, Krensky AM, Martinvalet D, Lieberman J: Cytotoxic cells kill intracellular bacteria through granulysin-mediated delivery of granzymes. Cell. 157: 1309–1323 (2014)

[144] Walmsley SR, Cowburn AS, Clatworthy MR, Morrell NW, Roper EC, Singleton V, Maxwell P, Whyte MK, Chilvers ER: Neutrophils from patients with heterozygous germline mutations in the von Hippel Lindau protein (pVHL)

display delayed apoptosis and enhanced bacterial phagocytosis. Blood 108: 3176–3178 (2006)

[145] Wang GL, Semenza GL: Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. Blood. 82: 3610–3615 (1993)

[146] Werth N, Beerlage C, Rosenberger C, Yazdi AS, Edelmann M, Amr A, Bernhardt W, von Eiff C, Becker K, Schäfer A, Peschel A, Kempf VAJ: Activation of hypoxia inducible factor 1 is a general phenomenon in infections with human pathogens. PloS One. 5: e11576 (2010)

[147] WHO: Global tuberculosis report 2015. WHO/HTM/TB/2015.22 (2015)

[148] WHO: Tuberculosis Fact Sheet No. 104, Oktober 2016 (aufgerufen am 02. November 2016)

[149] Whittam AJ, Maan ZN, Duscher D, Wong VW, Barrera JA, Januszyk M, Gurtner GC: Challenges and opportunities in drug delivery for wound healing. Adv Wound Care (New Rochelle). 5: 79–88 (2016)

[150] Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Nuñez GJ, Kincaid E, Tamura T, Takatsu K, Ernst JD: Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. J Immunol. 179: 2509–2519 (2007)

[151] Yang M, Ma C, Liu S, Sun J, Shao Q, Gao W, Zhang Y, Li Z, Xie Q, Dong Z, Qu X: Hypoxia skews dendritic cells to a T helper type 2-stimulating phenotype and promotes tumour cell migration by dendritic cell-derived osteopontin. Immunology. 128: e237–249 (2009)

[152] Ye J: Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. Int J Obes (Lond). 33: 54–66 (2009)

[153] Zenk SF, Vollmer M, Schercher E, Kallert S, Kubis J, Stenger S: Hypoxia promotes Mycobacterium tuberculosis−specific up−regulation of granulysin in human T cells. Med Microbiol Immunol. 205: 219-229 (2016)

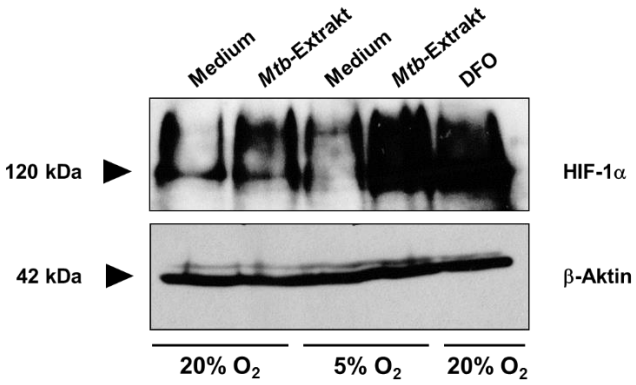
[154] Zhou J, Schmid T, Brüne B: Tumor necrosis factor-alpha causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1alpha through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway.Mol Biol Cell 14: 2216–2225 (2003)

[155] Zinkernagel AS, Peyssonnaux C, Johnson RS, Nizet V: Pharmacologic augmentation of hypoxia-inducible factor-1alpha with mimosine boosts the bactericidal capacity of phagocytes. J Infect Dis. 197: 214–217 (2008)

[156] Zumla A, Nahid P, Cole ST: Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. Nat Rev Drug Discov. 12: 388–404 (2013)

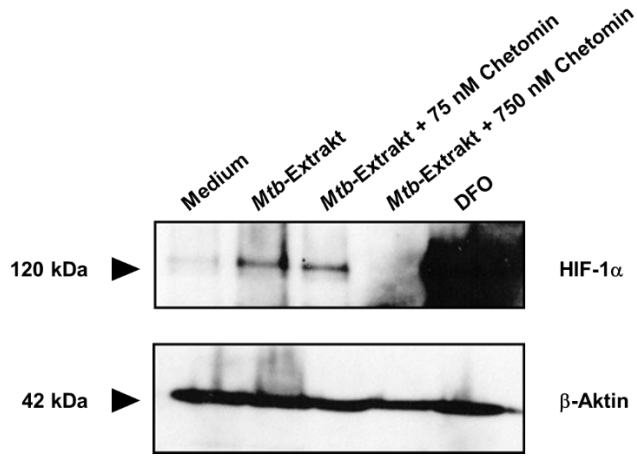
[157] Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF: Tuberculosis. N Engl J Med. 368: 745–755 (2013)

# 7 Anhang



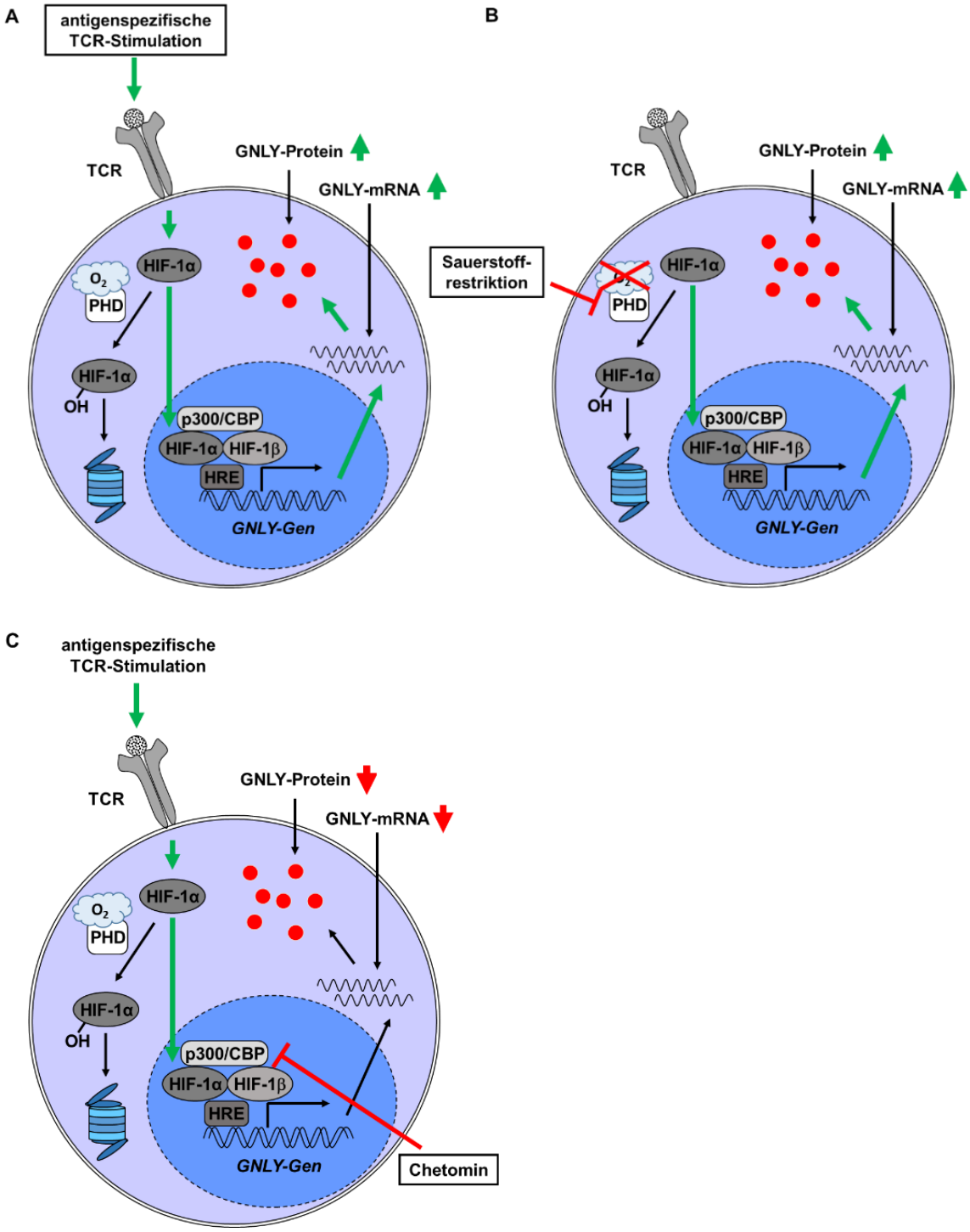

**Supplement 1: Steigerung der HIF-1α-Expression in *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinien durch spezifische Antigene und unter mikroaerophilen Sauerstoffbedingungen ($pO_2$ = 5%).**

8 x $10^6$ Zellen einer *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinie und 2 x $10^6$ autologe $CD1^+$APCs wurden für 48 ± 2 h bei 37 °C mit Medium bzw. *Mtb*-Extrakt in einer Endkonzentration von 10 µg/mL unter normoxischen ($pO_2$ = 20%) bzw. mikroaerophilen ($pO_2$ = 5%) Sauerstoffbedingungen inkubiert. Die nicht-adhärenten T-Zellen wurden anschließend geerntet, mittels CER I Lysepuffer lysiert und die Proteinkonzentrationen photometrisch bestimmt. Nach Denaturierung der Lysate mit SDS (Natriumdodecylsulfat) bei 95°C über 10 min erfolgte eine Auftrennung der Proteine (ca. 30 µg/Probe) mittels eines 12% SDS-Polyacrylamid-Gels. Zur Detektion von HIF-1α bzw. β-Aktin wurde ein monoklonaler Maus-anti-HIF-1α-Antikörper bzw. Kaninchen-anti-β-Aktin-Antikörper verwendet. Als Positivkontrolle diente der Eisenchelator Deferoxamin (DFO) in einer Endkonzentration von 50 µM, der als Prolylhydroxylaseinhibitor den HIF-1α-Abbau verhindert und somit zu seiner Stabilisierung beiträgt. (Abkürzungen: DFO = Deferoxamin, HIF-1α = Hypoxie-induzierter Faktor-1α, kDa = Kilodalton, $O_2$ = Sauerstoff, *Mtb* = *Mycobacterium tuberculosis*). Quelle: Dr. Sebastian Zenk (MyTB-Labor).




**Supplement 2: Inhibition der HIF-1α-Expression durch Chetomin.**

8 x $10^6$ Zellen einer *Mtb*-spezifischen Kurzzeit-T-Zelllinie und 2 x $10^6$ autologe $CD1^+$APCs wurden für 48 ± 2 h bei 37 °C mit Medium bzw. *Mtb*-Extrakt in einer Endkonzentration von 10 µg/mL stimuliert. Zur Inhibition der Antigen-vermittelten HIF-1α-Expression wurden 75 nM bzw. 750 nM Chetomin appliziert. Die nicht-adhärenten T-Zellen wurden anschließend geerntet, mittels CER I Lysepuffer lysiert und die Proteinkonzentrationen photometrisch bestimmt. Nach Denaturierung der Lysate mit SDS (95°C, 10 min) erfolgte eine Auftrennung der Proteine (ca. 30 µg/Probe) mittels eines 12% SDS-Polyacrylamid-Gels. Zur Detektion von HIF-1α bzw. β-Aktin wurde ein monoklonaler Maus-anti-HIF-1α-Antikörper bzw. Kaninchen-anti-β-Aktin-Antikörper verwendet. Als Positivkontrolle diente der Eisenchelator Deferoxamin (DFO) in einer Endkonzentration von 50 µM. (Abkürzungen: DFO = Deferoxamin, HIF-1α = Hypoxie-induzierter Faktor-1α, kDa = Kilodalton, nM = nanomolar, *Mtb* = *Mycobacterium tuberculosis*). Quelle: Dr. Sebastian Zenk (MyTB-Labor).




**Supplement 3: Zusammenhang zwischen Granulysin und HIF-1α.**

**A** Antigenspezifische Hochregulation von Granulysin: Über spezifische TCR-Stimulation kommt es zur Steigerung der HIF-1α-Expression, die in einer vermehrten Granulysinexpression auf mRNA- und Proteinebene resultiert. **B** Sauerstoffrestriktionsabhängige Hochregulation von Granulysin: Durch Sauerstoffrestriktion kommt es zur Stabilisierung des HIF-1α-Proteins, das in den Kern translociert wird und die Granulysinexpression auf mRNA- und Proteinebene steigert. **C** Inhibition der Granulysinexpression durch Chetomin: Chetomin hemmt die Interaktion von HIF-1α mit dem Transkriptionskoaktivator p300 und inhibiert so den Effekt der TCR-abhängigen HIF-1α-Steigerung auf die Granulysinexpression. (Abkürzungen: CBP = CREB [= cAMP response element-binding protein]-Bindeprotein, GNLY = Granulysin, HIF = Hypoxie-induizierter Faktor, HRE = Hypoxie-responsives Element, $O_2$ = Sauerstoff, OH = Hydroxylgruppe, PHD = Prolylhydroxylase, TCR = T-Zell-Rezeptor).

# 8 Danksagung

Die Inhalte dieser Seite wurden aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

# 9 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.