

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek

**Untersuchung der Rolle von Interleukin 7 und des löslichen  
Interleukin-7-Rezeptors in der T-Zellantwort auf Tuberkulose**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jens Rimpler

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Marc Jacobsen

Zweitgutachterin: PD Dr. rer. nat. Doreen Floß

## **VORBEMERKUNG**

In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulin verwendet. Weibliche und alle weiteren Geschlechteridentitäten werden dabei ausdrücklich mitgemeint, soweit es für die Aussage erforderlich ist.

# AUFLISTUNG EIGENER PUBLIKATIONEN

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Lundtoft C, Afum-Adjei Awuah A, Rimpler J, et al. Aberrant plasma IL-7 and soluble IL-7 receptor levels indicate impaired T-cell response to IL-7 in human tuberculosis. *PLoS Pathog.* 2017;13(6):e1006425. Published 2017 Jun 5. doi:10.1371/journal.ppat.1006425 [1]

# ZUSAMMENFASSUNG

## Untersuchung der Rolle von Interleukin 7 und des löslichen Interleukin-7-Rezeptors in der T-Zellantwort auf Tuberkulose

Die Tuberkulose (Tb) ist eine durch Mykobakterien verursachte Infektionskrankheit. Nach Exposition kommt es je nach Immunkompetenz zu einer akuten oder latenten Erkrankung. In einigen Fällen kann eine Infektion gänzlich vermieden werden. Für eine effiziente Immunantwort bedarf es einem komplexen Zusammenspiel von Makrophagen, T-Zellen und verschiedenen Zytokinen. Aktivierte T-Zellen sezernieren hierbei Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- $\alpha$ ), die wiederum Makrophagen aktivieren und somit eine erfolgreiche Eliminierung der Mykobakterien ermöglichen. Interleukin (IL)-7 ist eines der wichtigsten Zytokine in der Homöostase und Aktivierung von T-Zellen. Bekannt ist, dass es bei Autoimmunerkrankungen und chronischen viralen Infektionen zur eingeschränkten Funktionalität von T-Zellen mit beeinträchtigter T-Zellantwort auf IL-7 einhergehend mit Veränderungen der Plasmakonzentrationen von IL-7 und des löslichen (s) IL-7 Rezeptors Alpha (sIL-7R $\alpha$ ) kommt. Als Funktion des sIL-7R $\alpha$  wird eine Reservoirfunktion mit Steigerung der IL-7-Verfügbarkeit diskutiert. sIL-2R $\alpha$  ist ein Parameter zur Beurteilung der T-Zellaktivierung.

Wir untersuchten daher, ob es auch bei der Tb zu Veränderungen der sIL-2R $\alpha$ - und der sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen kommt. In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss von IL-7 als Kostimulator in der Aktivierung von CD4+ T-Zellen genauer charakterisiert. Hierfür wurden in einer Fall-/Kontrollstudie in Plasmaproben von Tb-Patienten und gesunden Kontaktpersonen die Konzentrationen des sIL-7R $\alpha$  und des sIL-2R $\alpha$  ermittelt. Des Weiteren untersuchten wir T-Zellen gesunder Probanden auf IL-7-abhängige Effekte im Rahmen der T-Zellstimulation. Wir analysierten die Expression von T-Zellaktivierungsmarkern sowie die Sezernierung der Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2.

Die sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen waren bei den an Tb Erkrankten initial erniedrigt und glichen sich während der Therapie wieder den Plasmakonzentrationen der Kontaktpersonen an. Bei den sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen ließ sich vor Therapiebeginn kein Unterschied zwischen Tb-Patienten und Kontaktpersonen feststellen, jedoch fielen die Plasmakonzentrationen der Tb-Patienten unter Therapie ab. Als Kostimulator führte IL-7 in T-Zellkulturen zu einer stärkeren Aktivierung von T-Zellen mit stärkerer Zytokinproduktion und zu Veränderungen der zytokinproduzierenden Subpopulationen.

Wir schlussfolgern daher, dass es im Rahmen der Tb zu einer Beeinflussung des IL-7-/IL-7R-Systems kommt. In Zusammenschau mit weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe scheint eine beeinträchtigte T-Zellantwort gegenüber IL-7 bei Tb-Patienten vorzuliegen. Gleichzeitig könnte IL-7 durch die Beeinflussung der T-Zellaktivierung mit Veränderung des Zytokinprofils ein wichtiges Zytokin in der T-Zell-vermittelten Immunantwort auf die Tb sein. Diese Erkenntnisse liefern neue Ansätze für weitere klinische Untersuchungen und gegebenenfalls Ansatzpunkte für immunmodulatorische Therapieverfahren.

# SUMMARY

## **Investigation of the role of interleukin 7 and soluble interleukin 7 receptor in the T cell response to tuberculosis infection.**

Tuberculosis (Tb) is an infectious disease caused by mycobacteria. After exposure, acute or latent disease occurs depending on immunocompetence. In some cases, an infection can be completely prevented. A complex interplay of macrophages, T cells and various cytokines is required for an efficient immune response. Activated T cells secrete interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). These activate macrophages and thereby enable successful elimination of mycobacteria. Interleukin (IL)-7 is one of the most important cytokines in T cell homeostasis and activation. It is known that autoimmune diseases and chronic viral infections result in impaired functionality of T cells with impaired T cell response to IL-7. This is accompanied by changes in plasma concentrations of IL-7 and soluble (s) IL-7 receptor alpha (sIL-7R $\alpha$ ). As role of sIL-7R $\alpha$ , a reservoir function with increased IL-7 availability is discussed. sIL-2R $\alpha$  is a parameter to measure T cell activation.

We therefore investigated whether changes in sIL-2R $\alpha$  and sIL-7R $\alpha$  plasma concentrations also occur in Tb. In a further step, the influence of IL-7 as a co-stimulator in the activation of CD4<sup>+</sup> T cells was characterized. For this purpose, the concentrations of sIL-7R $\alpha$  and sIL-2R $\alpha$  were determined in a case/control study in plasma samples from Tb patients and healthy contacts. Furthermore, we examined T cells from healthy subjects for IL-7-dependent effects in the context of T cell stimulation. We analyzed the expression of T cell activation markers and the secretion of the cytokines TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-2.

Plasma concentrations of sIL-7R $\alpha$  were initially decreased in subjects with Tb and returned to the plasma concentrations of contacts during therapy. There was no difference in sIL-2R $\alpha$  plasma concentrations between Tb patients and contacts before the start of therapy, but plasma concentrations of Tb patients decreased during therapy. As a co-stimulator, IL-7 in T cell cultures caused an increased activation of T cells with enhanced cytokine production and changes in cytokine-producing subpopulations.

We therefore conclude that there is an involvement of the IL-7/IL-7R system in the context of Tb. In synopsis with further studies of our research group, an impaired T cell response to IL-7 seems to be present in Tb patients. At the same time, IL-7 might be an important cytokine in the T cell-mediated immune response to Tb by affecting T cell activation with alteration of the cytokine profile. These findings provide new approaches for further clinical investigation and, potentially, starting points for immunomodulatory therapies.

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>AF</b>	<i>Alexa Fluor</i>	<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
<b>APC</b>	Allophycocyanin	<b>MFI</b>	Mittlere Fluoreszenzintensität
<b>AUC</b>	<i>Area under the curve</i>	<b>mIL-2R<math>\alpha</math></b>	membrangebundener Interleukin-2-Rezeptors Alpha
<b>BCG</b>	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>	<b>mIL-7R<math>\alpha</math></b>	membrangebundene Interleukin-7-Rezeptor Alpha
<b>Bcl-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>	<b>NEM</b>	N-Ethylmaleininid
<b>BV</b>	<i>Brilliant Violet</i>	<b>ng/ml</b>	Nanogramm pro Milliliter
<b>CBA</b>	<i>Cytometric Bead Array</i>	<b>PBMC</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i>	<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>CMV</b>	Cytomegalie-Virus	<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>CTLA4</b>	Zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4	<b>PE-Cy</b>	Phycoerythrin-Cyanin
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>PerCP</b>	Peridinin-Chlorophyll
<b>DTT</b>	Dithiothreitol	<b>PerCP-Cy</b>	Peridinin-Chlorophyll-Cyanin
<b>EBV</b>	Epstein-Barr-Virus	<b>pg/ml</b>	Pikogramm pro Milliliter
<b>FoxP3</b>	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>	<b>ROC</b>	<i>Receiver-Operating-Characteristics</i>
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor	<b>sIL-2R<math>\alpha</math></b>	Löslicher Interleukin-2-Rezeptor Alpha
<b>h</b>	Stunden	<b>sIL-7R<math>\alpha</math></b>	Löslicher Interleukin-7-Rezeptor Alpha
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz-Virus	<b>STAT</b>	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon Gamma	<b>sulfo-SMCC</b>	Sulfosuccinimidyl 4-(N-Maleimidomethyl)-Cyclohexan-1-Carboxylat
<b>IGRA</b>	<i>T-Zell IFN-<math>\gamma</math> Release Assay</i>	<b>Tb</b>	Tuberkulose
<b>IL-2</b>	Interleukin 2	<b>TCR</b>	T-Zellantigenrezeptor
<b>IL-3</b>	Interleukin 3	<b>Th1</b>	T-Helferzellen vom Typ 1
<b>IL-4</b>	Interleukin 4	<b>Th2</b>	T-Helferzellen vom Typ 2
<b>IL-5</b>	Interleukin 5	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor Alpha
<b>IL-7</b>	Interleukin 7	<b>T<sub>reg</sub></b>	Regulatorische T-Zellen
<b>iNOS</b>	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase	<b>TSLP</b>	Thymusstroma Lymphopoietin
<b>JAK</b>	Januskinase	<b>U/ml</b>	<i>Units per milliliter</i>
<b>LTBI</b>	Latente Tuberkuloseinfektion	<b>yc</b>	<i>common gamma chain</i>
<b>M.</b>	Mycobacterium	<b><math>\mu</math>l</b>	Mikroliter
<b>MACS</b>	Magnetisch assistierte Zellsortierung		

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Beispielhafte Darstellung der Durchflusszytometriedaten des CBA zur Messung der löslichen Zytokinrezeptorkonzentrationen.....	21
Abb. 2: Schematische Darstellung der T-Zellstimulationsversuche. ....	24
Abb. 3: Exemplarische Darstellung des <i>Gatings</i> der membrangebundenen Interleukinrezeptoren. ....	26
Abb. 4: Exemplarische Darstellung des <i>Gatings</i> zur Messung der Zytokinsekretion von T-Zellen.....	27
Abb. 5: sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen bei Tb-Patienten und ihren gesunden Kontaktpersonen zu Beginn der Erkrankung und während der Therapie. ....	28
Abb. 6: Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen.....	29
Abb. 7: Einfluss der sIL-7R $\alpha$ -Ausgangskonzentration auf Konzentrationsänderungen während der Therapie. ....	30
Abb. 8: ROC-Kurve der sIL-7R $\alpha$ Plasmakonzentration. ....	31
Abb. 9: sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen bei Tb-Patienten und ihren gesunden Kontaktpersonen zu Beginn der Erkrankung und während der Therapie. ....	32
Abb. 10: Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen.....	33
Abb. 11: Korrelation der sIL-2R $\alpha$ - und sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen. ....	34
Abb. 12: mL-7R $\alpha$ - und mL-2R $\alpha$ -Expression während der Inkubation mit IL-7. ....	35
Abb. 13: mL-7R $\alpha$ - und mL-2R $\alpha$ -Expression nach Inkubation mit IL-7 und anschließender Stimulation. ....	37
Abb. 14: Expression der Aktivitätsmarker CD40L/CD69 in Abhängigkeit von IL-7. ....	38
Abb. 15: Einfluss der IL-7-Vorinkubation auf die Sezernierung von sIL-2R $\alpha$ durch T-Zellen. ....	39
Abb. 16: TNF- $\alpha$ -Expression nach Vorinkubation mit IL-7 und anschließender Stimulation.....	40
Abb. 17: IFN- $\gamma$ -Expression nach Vorinkubation mit IL-7 und anschließender Stimulation. ....	41
Abb. 18: IL-2-Expression nach Vorinkubation mit IL-7 und anschließender Stimulation.....	42
Abb. 19: Multifunktionale T-Zellen in Abhängigkeit der IL-7-Vorinkubation. ....	43
Abb. 20: Zytokinexpressionsmuster in Abhängigkeit von IL-7. ....	44

# TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1: Materialien für den BD™ Cytometric Bead Array.....</b>	<b>14</b>
<b>Tabelle 2: Materialien für die T-Zellanreicherung .....</b>	<b>15</b>
<b>Tabelle 3: Materialien für die T-Zellkulturen .....</b>	<b>15</b>
<b>Tabelle 4: Antikörper für die Oberflächenfärbungen .....</b>	<b>16</b>
<b>Tabelle 5: Materialien für die Fixierung und Permeabilisierung.....</b>	<b>16</b>
<b>Tabelle 6: Antikörper für die intrazelluläre Zytokinfärbung .....</b>	<b>17</b>
<b>Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Software.....</b>	<b>17</b>
<b>Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Geräte .....</b>	<b>18</b>
<b>Tabelle 9: Patientencharakteristika der ghanaischen Tb-Kohorte.....</b>	<b>19</b>

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	TUBERKULOSE.....	1
1.1.1	<i>Epidemiologie</i> .....	1
1.1.2	<i>Erreger</i> .....	1
1.1.3	<i>Infektion und Therapie</i> .....	2
1.2	IMMUNANTWORT AUF DIE TUBERKULOSE.....	3
1.2.1	<i>Allgemein</i> .....	3
1.2.2	<i>T-Zellen und Zytokine</i> .....	3
1.3	DIE ROLLE VON INTERLEUKIN 7 UND DES INTERLEUKIN-7-REZEPTORS IN DER TUBERKULOSE.....	6
1.3.1	<i>Interleukin 7</i> .....	7
1.3.2	<i>Interleukin 7 in der Diagnosestellung der Tuberkulose</i> .....	9
1.3.3	<i>Membrangebundener Interleukin-7-Rezeptor</i> .....	10
1.3.4	<i>Löslicher Interleukin-7-Rezeptor</i> .....	11
1.4	ZIELE DER ARBEIT.....	12
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>13</b>
2.1	MATERIAL.....	13
2.1.1	<i>Materialien für die Erstellung und Durchführung des BD™ Cytometric Bead Array</i> .....	13
2.1.2	<i>Materialien für die Isolation von T-Zellen aus dem Vollblut mittels Biocoll-Trennlösung und BD IMag™-System</i> .....	14
2.1.3	<i>Substanzen, die für die T-Zellkulturen verwendet wurden</i> .....	15
2.1.4	<i>Antikörper für die Fluoreszenzmarkierung der T-Zellen</i> .....	15
2.2	SOFTWARE.....	17
2.3	GERÄTE.....	17
2.4	PROBANDEN.....	18
2.4.1	<i>Bestimmung der löslichen Zytokinrezeptoren bei Tb-Patienten und gesunden Kontaktpersonen</i> .....	18
2.4.2	<i>Blutproben für T-Zellkulturen</i> .....	19
2.4.3	<i>Ethikvotum</i> .....	19
2.5	METHODEN.....	20
2.5.1	<i>Bestimmung der Plasmakonzentrationen der löslichen Zytokinrezeptoren für Interleukin 2 und Interleukin 7 mit dem Cytometric Bead Array</i> .....	20
2.5.2	<i>Messung der Expression von Oberflächenmolekülen und Zytokinen in T-Zellzellstimulationsversuchen</i> .....	22
2.5.3	<i>Statistische Analysen und Graphen</i> .....	27
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>28</b>

3.1	PLASMAKONZENTRATIONEN DER LÖSLICHEN ZYTKINREZEPTOREN FÜR INTERLEUKIN 2 UND INTERLEUKIN 7 BEI TUBERKULOSEPATIENTEN.....	28
3.1.1	<i>Veränderte Plasmakonzentration des löslichen Interleukin-7-Rezeptors bei Tuberkulosepatienten normalisieren sich während der Therapie .....</i>	28
3.1.2	<i>Die Plasmakonzentration des löslichen Zytokinrezeptors für Interleukin 2 verringert sich bei Tuberkulosepatienten während der Therapie.....</i>	32
3.1.3	<i>Keine Korrelation zwischen der Plasmakonzentration des löslichen Interleukin-2- und löslichen Interleukin-7-Rezeptors bei Tuberkulosepatienten.....</i>	34
3.2	DIE ROLLE VON IL-7 IN DER T-ZELLAKTIVIERUNG.....	34
3.2.1	<i>Internalisierung des mIL-7R<math>\alpha</math> und gesteigerte Expression des mIL-2R<math>\alpha</math> während der Inkubation mit IL-7 .....</i>	35
3.2.2	<i>Stärkere Expression des mIL-2R<math>\alpha</math> und der Aktivierungsmarker nach IL-7-Vorinkubation und anschließender Stimulation .....</i>	36
3.2.3	<i>IL-7 steigert die Produktion von sIL-2R<math>\alpha</math> .....</i>	39
3.2.4	<i>Gesteigerte Zytokinproduktion durch IL-7-Vorinkubation.....</i>	40
3.2.5	<i>IL-7-Vorinkubation führt zu vermehrter Anzahl an T-Zellen, die zwei oder mehr Zytokine produzieren .....</i>	42
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>45</b>
4.1	VERÄNDERUNGEN DES IL-7-/IL-7R-SYSTEMS IN DER TB .....	45
4.2	DIE TB-THERAPIE VERRINGERT DIE PLASMAKONZENTRATION DES AKTIVITÄTSMARKERS SIL-2RA.....	48
4.3	DIE BEDEUTUNG VON IL-7 IN DER T-ZELLAKTIVIERUNG .....	50
4.3.1	<i>Veränderung der Expression von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen durch IL-7 und die TCR-Stimulation.....</i>	50
4.3.2	<i>Eine verstärkte T-Zellaktivierung durch die IL-7-Vorinkubation führt zu einer gesteigerten Zytokinseznierung .....</i>	52
4.4	SCHLUSSFOLGERUNG .....	55
<b>5</b>	<b>LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>56</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Tuberkulose

### 1.1.1 Epidemiologie

Die Tuberkulose (Tb) ist eine Erkrankung, die durch Mykobakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex hervorgerufen wird. Hierzu zählen neben dem *Mycobacterium (M.) tuberculosis* (Mtb), welches in über 95 % der Krankheitsfälle ursächlich ist, das *M. bovis* und das *M. africanum*. Geschätzt sind weltweit 1,7 Milliarden Menschen mit Mtb infiziert, allerdings entwickelt nur ein Bruchteil davon auch eine akute Tb [2, 3]. Bei den restlichen Infizierten persistieren die Erreger, ohne eine akute Tb auszulösen. Dies wird als latente Tuberkulose-Infektion (LTBI) bezeichnet [4]. 2018 erkrankten circa 10 Millionen Menschen weltweit an einer akuten Tb, davon waren 6,3 Millionen Primärinfektionen. Tb war 2018 weltweit die neunthäufigste Todesursache. Die Inzidenz der Erkrankung ist global sehr unterschiedlich. So treten 56 % aller akuten Erkrankungen in den Ländern Indien, Indonesien, China, die Philippinen und Pakistan auf. [3]. In Deutschland war die Zahl der Erkrankungen 2018 mit 6.100 Fällen (Inzidenzrate von 7,3 Fälle / 100.000 Einwohnern) und circa 320 Todesfällen im weltweiten Vergleich dagegen eher gering. In Ghana, wo die Probanden für diese Studie rekrutiert wurden, gab es 2018 44.000 Neuerkrankte, was einer Inzidenzrate von 148 Fällen pro 100.000 Einwohnern entspricht. 2018 starben 16.000 Menschen in Ghana an der Tb [3].

### 1.1.2 Erreger

Mykobakterien sind säurefeste Bakterien mit einer Zellwand, die aus einer fettsäure- und glykolipidhaltigen Wachsschicht besteht. Die unbeweglichen Stäbchen wurden 1882 durch Robert Koch entdeckt. Die Wachsschicht bedingt das langsame Zellwachstum und die langsame Teilungsrate der Mykobakterien. Diese langsame Zellreplikation erklärt den chronischen Charakter und die langfristige Therapie der Erkrankung. Zudem bedingt die Wachsschicht eine hohe Widerstandsfähigkeit, weshalb die Bakterien in Makrophagen überleben können und zusätzlich dort vor der humoralen und zellulären Immunabwehr geschützt sind. Durch eine komplexe Immunreaktion kommt es bei Immunkompetenten meist zur Ausbildung sogenannter Granulome, in deren

Mitte lebende Mykobakterien isoliert werden. Auf diese Weise schützt sich der Körper vor einer akuten Tb [2, 4].

### **1.1.3 Infektion und Therapie**

Da die Tb meist durch eine Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch übertragen wird, ist die Lunge in 90 % aller Fälle der Ort der Erstmanifestation. Allerdings können auch andere Organe wie beispielsweise der Darm Erstmanifestationsort sein. Darüber hinaus können sich die Mykobakterien im Rahmen einer fortschreitenden Erkrankung im gesamten Organismus ausbreiten [4]. Ob ein Mensch, der mit Tb in Kontakt gerät, sich auch tatsächlich infiziert, hängt von vielen unterschiedlichen Faktoren ab. Es wird geschätzt, dass ungefähr 30 % der Menschen, die mit Tb in Kontakt geraten, sich auch mit Tb infizieren. Bei ca. 60-90 % dieser Infizierten schafft es das Immunsystem, die Erkrankung zu unterdrücken. Es entsteht eine LTBI, die aber in Folge einer verschlechterten Immunlage in eine akute Infektion übergehen kann [5].

Die primäre Infektion verläuft häufig asymptomatisch. Klassische Symptome der akuten Tb sind Husten, der in manchen Fällen blutig tingiert ist, und B-Symptomatik in Form von Nachtschweiß, Gewichtsverlust, subfebrilen Temperaturen und allgemeiner Schwäche. Daneben sind die weiteren Symptome sehr heterogen und je nach Manifestationsort unterschiedlich [2].

Die Erstlinien-Therapie der Tb umfasst klassischerweise die Medikamente Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol, die für zwei Monate parallel verabreicht werden. Im Anschluss werden für weitere vier Monate verschiedene Kombinationen der genannten Medikamente, meist Isoniazid und Rifampicin, eingesetzt. Die Therapieempfehlungen in Ghana, wo die Probanden für diese Studie rekrutiert wurden, unterscheiden sich nicht zu denen in Deutschland [2, 3]. Ein Problem der antibiotischen Therapie der Tb sind steigende Zahlen von Antibiotikaresistenzen, die häufig auch parallel mehrere der eingesetzten Wirkstoffe betreffen [3].

## **1.2 Immunantwort auf die Tuberkulose**

### **1.2.1 Allgemein**

Um den Ausbruch einer akuten Infektion zu unterdrücken, bedarf es dem Zusammenspiel verschiedener Mechanismen des Immunsystems. Primär werden die Mykobakterien von Makrophagen phagozytiert, wobei sie aber in der Lage sind, im Phagosom zu überleben und sich sogar zu vermehren [6, 7]. Erst nach Aktivierung der Makrophagen durch die von CD4+ T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1-Zellen) gebildeten Zytokine Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ), wird die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) verstärkt exprimiert, was wiederum die Bildung von Sauerstoffradikalen wie Stickstoffmonoxid steigert und somit die Abtötung der Bakterien ermöglicht [8]. Ohne diese Komponenten kommt es zu einem voranschreitenden Wachstum der Bakterien im Inneren der Makrophagen, wodurch diese in Apoptose gehen und Mykobakterien freigesetzt werden. Durch die beschriebenen Zytokine werden Makrophagen aktiviert und dadurch befähigt die Bakterien abzutöten. Es bilden sich verkäsende Granulome. Diese bestehen von innen nach außen aus einer zentralen entzündungsbedingten Nekrose. Darauf folgend findet man aktivierte Makrophagen, sogenannte Epitheloidzellen, die Mykobakterien phagozytieren und auch Synzytien ausbilden können. Diese mehrkernigen Zellen werden dann Langerhans-Riesenzellen genannt. Um die Makrophagen sammeln sich Lymphozyten und weitere Zellen des Immunsystems. Diese Granulome, auch Tuberkulome genannt, sind pathognomonisch für die Tb [6, 7].

### **1.2.2 T-Zellen und Zytokine**

Aus naiven CD4+ T-Zellen entwickeln sich nach der Aktivierung verschiedene T-Zellsubklassen, die in erster Linie nach ihrem Zytokinexpressionsmuster definiert werden. So produzieren die Th1-Zellen Interleukin 2 (IL-2) und vor allem IFN- $\gamma$ , während T-Helferzellen vom Typ 2 (Th2-Zellen) Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 5 (IL-5) sezernieren. Zytokine wie der Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF), TNF- $\alpha$  und Interleukin 3 (IL-3) werden von beiden T-Zelluntergruppen gleichermaßen sezerniert. Es sind allerdings auch noch weitere CD4+ T-Zellsubtypen beschrieben und definiert. Dazu zählen

beispielsweise T-Helferzellen vom Typ 17 oder regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) [9, 10].

Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt durch die Bindung eines Antigen an den T-Zellantigenrezeptor-(TCR)-CD3-Komplex. Das Antigen ist hierfür im Rahmen der klassischen Aktivierung naiver T-Zellen auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen an einem *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Protein gebunden. Die Signaltransduktion erfolgt dann über Tyrosinkinasen, die eine Signalkaskade aktivieren, wodurch schließlich Transkriptionsfaktoren unterschiedlich exprimiert werden. Je nach Signalstärke, die durch die Affinität des Antigen am TCR moduliert wird, stimulierenden und inhibierenden Kosignalen und dem vorherrschenden Zytokinmilieu, geht eine T-Zelle im Anschluss an eine TCR-Stimulation in Apoptose oder proliferiert und differenziert in die verschiedenen T-Zellunterarten [11, 12]. Die Art der T-Zellantwort ist stark von Kostimulatoren und den entsprechenden Rezeptoren abhängig, die die T-Zellantwort ganz unterschiedlich beeinflussen. Obwohl sehr starke Stimuli auch allein zu einer T-Zellaktivierung führen, ist bei den meisten Antigenen ein zusätzliches Signal über einen Korezeptor notwendig. Ein solcher aktivierender Korezeptor ist CD28, der vor allem in der Aktivierung naiver T-Zellen und für die Ausbildung von  $T_{reg}$  wichtig ist. Inhibierende Korezeptoren der T-Zellaktivierung sind beispielsweise das zytotoxische T-Lymphozytenantigen 4 (CTLA4) und das *Programmed cell death protein 1*. Interessanterweise binden sowohl CD28 wie auch CTLA4 an B7-1 und B7-2, welche auf antigenpräsentierende Zellen exprimiert werden. Ob die T-Zellantwort durch die Korezeptoren verstärkt oder inhibiert wird, ist daher abhängig von der Expression sowohl der Rezeptoren als auch der Liganden [13, 14].

Als Maß für die Aktivierung von T-Zellen werden in der Literatur verschiedene Oberflächenmoleküle verwendet. So können beispielsweise CD69 oder CD40L bestimmt werden. CD69 ist dabei seit Langem als Marker der frühen T-Zellaktivierung bekannt, wohingegen seine genaue Funktion im Rahmen der Aktivierung bis heute nicht gänzlich geklärt ist [15]. CD40L gilt dagegen als essenzielles Molekül in der Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen. Es wird auf CD4+ T-Zellen im aktivierten Zustand exprimiert und bindet CD40 auf den antigenpräsentierende Zellen, die dadurch ebenfalls aktiviert werden [16, 17]. Im nicht aktivierten Zustand sind die Moleküle nur sehr schwach auf der Oberfläche

der T-Zellen nachweisbar. Durch die Aktivierung von T-Zellen kommt es zu einer verstärkten Expression auf der Zelloberfläche, weshalb durch die Bestimmung dieser Zellmarker der Anteil aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen geschätzt werden kann.

Für die Immunantwort auf die Tb ist die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> Th1-Zellen sehr wichtig, da diese zum einen eine wichtige Quelle für makrophagenaktivierende Zytokine bilden [18], zum anderen aber auch über bisher wenig verstandene zytokinunabhängige Mechanismen die Tb-Immunantwort beeinflussen [19].

Eines dieser in der Immunantwort auf die Tb wichtigen Zytokine ist IFN- $\gamma$ , wofür Th1-Zellen die wichtigste Quelle darstellen. Weitere Quellen für IFN- $\gamma$  sind CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen, natürliche Killerzellen, B-Zellen und antigenpräsentierende Zellen [20]. Obwohl auch andere Zellen des Immunsystems IFN- $\gamma$  sezernieren können, kommt es ohne die IFN- $\gamma$ -Produktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu keiner ausreichenden Makrophagenaktivierung [21]. Neben der Aktivierung von Makrophagen ist IFN- $\gamma$  außerdem wichtig für die Differenzierung von Th1-Zellen [22].

Daneben ist TNF- $\alpha$  ein weiteres wichtiges Zytokin in der Immunantwort auf Tb. Ohne den Einfluss von TNF- $\alpha$  wird die iNOS in Makrophagen weniger stark induziert, was im Mausmodell zu einem schnelleren Tod führt [23]. Bei Patienten mit einer TNF- $\alpha$ -Antikörpertherapie kommt es häufiger zu einer Reaktivierung einer LTBI [24], was auch im Mausmodell beobachtet werden kann [25]. Dies könnte auch daran liegen, dass TNF- $\alpha$  wichtig für die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist. So zeigte sich, dass TNF- $\alpha$ -Antikörper die Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen verschlechtern, indem sie die Bildung von makrophagen- und mykobakterienlyisierenden Stoffen wie Perforin und Granulysin unterdrücken. Die Zytolyse ist besonders für die Abwehr von intrazellulären Bakterien wie Mykobakterien, die in Makrophagen überleben wichtig [26].

IL-2 nimmt eine wichtige Rolle in der Differenzierung und Funktionalität von vielen T-Zellsubtypen ein. Es gilt als allgemeiner Wachstumsfaktor für T-Zellen [27] und ohne IL-2 kommt es bei Infektionen zu einer geringeren Proliferation von Th1-Zellen und einer geringeren Induktion der IFN- $\gamma$ -Produktion [28, 29]. Daneben ist IL-2 wichtig für die Differenzierung von T<sub>reg</sub> [29, 30]. Auch fördert IL-2 neben IL-4 die Entwicklung von CD4<sup>+</sup> Th2-Zellen [18]. Darüber hinaus sind auch CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen auf IL-2 angewiesen und entwickeln sich je nach

Plasmaspiegel zu Effektor- oder Gedächtniszellen, wobei IL-2 vor allem auch für die Reaktivierung und Expansion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach erneutem Antigenkontakt wichtig zu sein scheint [31]. In erster Linie stimulierende Effekte hat IL-2 auf B-Zellen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und eosinophile Granulozyten [32-34].

IL-2 bindet an den IL-2-Rezeptor, der sich aus drei Ketten zusammensetzt: der  $\alpha$ -Kette (CD25), der  $\beta$ -Kette und der *common gamma* Kette ( $\gamma_c$  / CD132) [35]. Darüber hinaus gibt es auch eine lösliche Form der  $\alpha$ -Kette, den löslichen IL-2-Rezeptor Alpha (sIL-2R $\alpha$ ). Dieser wird nach Aktivierung sowohl von T-Effektorzellen wie auch von T<sub>reg</sub> sezerniert [36, 37]. Auch aufgrund der Sezernierung durch diese eher antagonistisch fungierenden Zellen ist die genaue Funktion des sIL-2R $\alpha$  nicht abschließend geklärt. *In vitro*-Versuche legen allerdings nahe, dass durch hohe sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen viel IL-2 gebunden wird und dadurch die T-Zellproliferation und -aktivierung gehemmt wird [38]. Bekannt ist daneben, dass die Höhe der Plasmakonzentration des sIL-2R $\alpha$  mit der Krankheitsaktivität bei verschiedenen Infektionen, rheumatischen Erkrankungen wie der Sarkoidose und onkologischen Erkrankungen assoziiert ist [39]. Auch für die aktive Tb wurden erhöhte sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen beschrieben, die sich unter Therapie wieder angleichen [40-43].

Studien zeigten, dass in einer akuten unbehandelten Tuberkulose CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit vermehrter Expression von singulären Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  überwiegen. T-Zellen, die vermehrt IL-2, IFN- $\gamma$ /IL-2, TNF- $\alpha$ /IL-2 oder IL-2/IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  parallel sezernieren, kommen hingegen vermehrt bei Patienten unter Therapie oder Patienten mit LTBI vor und scheinen somit Immunität zu vermitteln [44-46]. Zudem gibt es auch Hinweise darauf, dass bei viralen Erkrankungen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die mehrere Zytokine parallel sezernieren, den T-Zellen funktionell überlegen sind, die nur ein Zytokin produzieren [47-49].

### **1.3 Die Rolle von Interleukin 7 und des Interleukin-7-Rezeptors in der Tuberkulose**

Das System aus IL-7 und IL-7-Rezeptor ist essenziell für die Ausbildung von T-Zellen im Thymus. Auch für die Differenzierung in die verschiedenen Lymphozytenunterarten und die Anzahl an Lymphozyten ist es wichtig. Zusätzlich hat es Einfluss auf die Funktionalität und Zytokinproduktion von Lymphozyten.

### 1.3.1 Interleukin 7

Einen der ersten Hinweise darauf, dass IL-7 eine Rolle in der Tb spielen könnte, lieferten Maeurer et. al in einem Mausmodell, bei dem es durch die Behandlung der Mäuse mit IL-7 zu einem verlängerten Überleben kam [50]. Bei Primaten konnte gezeigt werden, dass höhere IL-7-Konzentrationen im Lungengewebe mit einem verbesserten Gesamtüberleben einhergehen und durch die *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-Impfung höhere IL-7-Konzentrationen in der Lunge induziert werden können [51].

IL-7 wird hauptsächlich von Stromazellen des Thymus und des Knochenmarks produziert [52, 53]. Zu kleineren Mengen wird es allerdings auch im Epithel des Darms, in Keratinozyten, in der Leber und in dendritischen Zellen gebildet [53-56].

IL-7 ist eines der wichtigsten Zytokine in der Homöostase von T-Zellen. Bei der Entwicklung von B-Zellen hingegen ist IL-7 zwar bei Mäusen unerlässlich, bei Menschen jedoch scheint es lediglich eine untergeordnete Bedeutung zu haben. Bereits für die frühe Entwicklung von T-Zellen ist IL-7 essenziell. In Abwesenheit von IL-7 kommt es zu einer gestörten Ausreifung der frühen, unreifen Zellen. Daher gilt es als wichtigster Entwicklungsfaktor für T-Zellen [57-59]. Auch naive T-Zellen und T-Gedächtniszellen sind abhängig von IL-7 und gehen ohne IL-7 schneller in Apoptose [60]. Dies liegt unter anderem daran, dass IL-7 die Expression von antiapoptotischen Proteinen, wie *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) fördert [61]. Zudem ist IL-7 für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ein Proliferationsfaktor [62, 63]. Wichtig für die Funktionalität unseres Immunsystems ist außerdem die Bildung eines Immungedächtnisses, also die Ausdifferenzierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen. Nach einer T-Zellimmunantwort reexprimieren die T-Zellen, die nicht in Apoptose gehen, den IL-7-Rezeptor, wodurch IL-7 als ein zentrales Zytokin die Ausbildung und das Überleben von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen fördert [60, 64]. Auch für die Bildung von T<sub>reg</sub> könnte IL-7 eine Rolle spielen. Allerdings ist hierbei IL-2 das wichtigere Zytokin [30] und Thymusstroma-Lymphopoietin (TSLP), das ebenfalls als Agonist am IL-7-Rezeptor fungiert, scheint die Funktion von IL-7 übernehmen zu können [65]. Daneben hat IL-7 auch eine Funktion in der Ausbildung von lymphatischen Geweben wie Lymphknoten oder *Payer-Plaques* [66].

Regulationsmechanismen der IL-7-Plasmakonzentration sind nur unzureichend charakterisiert. Mausexperimente legen nahe, dass die IL-7-Sezernierung und damit die IL-7-Plasmakonzentrationen physiologisch weitestgehend konstant sind und nur sehr geringe Plasmakonzentrationen erreicht werden. Durch dieses physiologisch begrenzte Angebot an IL-7 stehen naive T-Zellen in Konkurrenz zueinander. IL-7-Aufnahme und -Verbrauch durch lymphatische Zellen haben einen großen Einfluss auf die IL-7-Konzentrationen in den einzelnen Geweben. Diese Verknappung der IL-7 Konzentration führt zu einer Autoregulation in der Proliferation und Differenzierung der lymphatischen Zellen [67]. Durch unterschiedliche Veränderungen in der IL-7-Homöostase, wie zum Beispiel einer Lymphozytopenie im Rahmen einer Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) oder bei mit niedrigen CD4+ T-Zellzahlen einhergehenden Gendefekten, kommt es durch den geringeren Verbrauch zu einer Erhöhung der IL-7-Plasmakonzentrationen. Die Plasmakonzentration sinkt wieder, wenn sich die CD4+-Zahl normalisiert [68-70].

IL-7 verbessert in Tiermodellen die erworbene Immunantwort auf Malignome. Daneben konnten auch nach Impfungen sowie bei chronischen und akuten Infektionen eine Verbesserung der Immunantwort durch IL-7 festgestellt werden. So wurde bei chronischen Virusinfektionen gezeigt, dass durch die alleinige Gabe von IL-7 sowohl die Gesamtzellzahl an CD4+ und CD8+ T-Zellen als auch die Anzahl an antigenspezifischen T-Zellen zunimmt, was zu einer verbesserten Immunantwort durch die Applikation von IL-7 führt [71]. Auch bei bakteriellen Infektionen bis hin zur Sepsis konnten positive Effekte auf das Gesamtüberleben der Patienten durch eine gesteigerte Proliferation und geringere Apoptoseraten der CD4+ und CD8+ T-Zellen festgestellt werden [72]. Bei Mäusen mit einem Malignom steigt nach Zugabe von IL-7 das Gesamtüberleben und die T-Zellinfiltration in den Tumor [73]. Da bekannt ist, dass IL-7 die Bildung von T-Gedächtniszellen fördert, ist es wenig überraschend, dass IL-7 auch als Adjuvans bei Impfungen im Tiermodell getestet wurde. Es bedingt in Mausmodellen eine längere Überlebenszeit und eine verbesserte Funktionalität von CD8+ T-Gedächtniszellen. Hierbei scheint auch der Zeitpunkt der IL-7-Gabe mitentscheidend zu sein. So ist eine Gabe von IL-7 zwischen Tag 7 und 14 nach der Impfung am wirkungsvollsten zu sein [74-76]. Auch bei Menschen wurden bereits Studien mit rekombinantem IL-7 in Hinblick auf die Toxizität und Wirkung

durchgeführt, wobei bei moderaten Nebenwirkungen steigende CD4+ und CD8+ T-Zellzahlen beobachtet werden konnten. Dies gilt für eine Chemotherapie bedingte Lymphozytopenie [77, 78], für die Lymphozytopenie bei HIV-Patienten [79] und auch nach autologer Stammzelltransplantation [80-82].

Allerdings kann IL-7 auch unter primär nicht physiologischen Bedingungen negative Einflüsse auf das Immunsystem haben. So zeigen Studien, dass IL-7 eine Rolle in der Entwicklung einer *Graft Versus Host Disease* (GVHD) spielen könnte [83]. Auch bei Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose [84], der rheumatoiden Arthritis [85] und der chronisch entzündlichen Darmerkrankung konnten erhöhte IL-7-Plasmakonzentrationen beobachtet werden, weshalb IL-7 eine zentrale Rolle in der Pathogenese bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen zugeschrieben wird [86]. Die Blockade der IL-7-Signaltransduktion durch IL-7R $\alpha$ -Antikörper führt folgerichtig zur Abnahme der autoimmunvermittelten Entzündung [87] und wird derzeit auch als therapeutische Option für Autoimmunerkrankungen beim Menschen erprobt [88].

In der T-Zellkultur kommt es bei CD4+ und CD8+ T-Zellen allein durch die Zugabe von IL-7 neben einer stärkeren Expression des membrangebundenen IL-2-Rezeptors Alpha (mIL-2R $\alpha$  / CD25) zu einem konzentrationsabhängigen Wachstumsreiz, der insbesondere auch die Proliferation von Gedächtniszellen induziert [63]. Der membrangebundene IL-7-Rezeptor Alpha (mIL-7R $\alpha$  / CD127) wird nach Zugabe von IL-7 hingegen weniger stark exprimiert [89]. Zudem fungiert IL-7 als Kostimulator bei der T-Zellaktivierung. Daher kommt es im Rahmen der T-Zellaktivierung durch die Zugabe von IL-7 zu einer verstärkten Expression des mIL-2R $\alpha$  und zu einer verstärkten Zellproliferation im Vergleich zur T-Zellaktivierung ohne IL-7 [90]. Auch die Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 und IL-4 werden unter IL-7-Kostimulation stärker exprimiert [91, 92].

### **1.3.2 Interleukin 7 in der Diagnosestellung der Tuberkulose**

Die Diagnose der akuten Lungentuberkulose wird meist mittels Röntgenbild, Tuberkulin-Hauttest, T-Zell IFN- $\gamma$  *Release Assay* (IGRA) und direktem Erregernachweis im Sputum oder Bronchialsekret gestellt, wobei lediglich der direkte Erregernachweis zum Beweis oder Ausschluss einer Tb herangezogen werden kann [93]. Wesentlich schwieriger gestaltet sich die Lage bei der LTBI. Der gängigste Test im Erwachsenenalter ist der IGRA, der aber einige

Schwachstellen aufweist. Zum einen hat er in der LTBI keine überzeugende Sensitivität. Sie liegt bei den gängigen, kommerziell erhältlichen Tests gemittelt bei 78 %. Die Spezifität hingegen ist mit ca. 98 % zwar hoch, dennoch kann es zu falsch positiven Resultaten kommen [93, 94]. Experimentelle Ansätze legen nahe, dass IL-7 die Sensitivität des IGRA steigert, da es die Tb-spezifische IFN- $\gamma$ -Produktion von CD4+ T-Zellen steigert und stabilisiert [95].

### **1.3.3 Membrangebundener Interleukin-7-Rezeptor**

Der mL-7R $\alpha$  wird in erster Linie von CD4+ und CD8+ T-Zellen, aber auch von einigen anderen Immunzellen, wie den frühen B-Zellen und den dendritischen Zellen, exprimiert [96, 97]. Auf der Zelloberfläche assoziiert der mL-7R $\alpha$  mit der  $\gamma_c$  zu einem Heterodimer und initiiert die Signaltransduktion ins Zellinnere.[98] Diese erfolgt über Januskinasen (JAK) und *Signal Transducers and Activators of Transcription*-Proteine (STAT), den so genannten JAK/STAT-Signalweg. Im Falle der durch IL-7-induzierten Signalkaskade sind in erster Linie die Proteine JAK1 und JAK3 sowie STAT5 involviert [99]. Auch für die Signaltransduktion des TSLP-Rezeptors ist das mL-7R $\alpha$ -Protein essenziell [100].

Die Expression des mL-7R $\alpha$  wird auf verschiedene Weise reguliert. Eine der wichtigsten Regulationsmechanismen scheint eine *IL-7-Feedback*-Schleife zu sein: Die Expression des mL-7R $\alpha$  auf der Zelloberfläche nimmt durch ein IL-7-vermitteltes Signal ab, da es zum einen zur Internalisierung und Degradierung des mL-7R $\alpha$  nach Bindung mit IL-7 kommt und zum anderen die Transkription des mL-7R $\alpha$  inhibiert wird [101, 102]. Dies scheint ein elementarer Mechanismus in der T-Zellhomöostase zu sein und führt dazu, dass vom limitierten IL-7-Angebot möglichst viele Zellen profitieren können. Wenn kein IL-7-Stimulus mehr besteht, kommt es nach circa sieben Stunden zur Reexpression des mL-7R $\alpha$  auf der Oberfläche.

Interessanterweise führt auch eine Stimulation des T-Zellrezeptors zu einer supprimierten mL-7R $\alpha$ -Expression. Die Reexpression des mL-7R $\alpha$  nach T-Zellrezeptoraktivierung ist hingegen nicht im selben Maße wie nach IL-7-Stimulation vorhanden [102, 103]. *In vitro* Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass es erst zwischen Tag drei und vier nach T-Zellrezeptoraktivierung zu einer Reexpression des mL-7R $\alpha$  auf der Oberfläche von T-Zellen kommt [104].

Bei verschiedenen Erkrankungen konnten Veränderungen in der Expression des mIL-7R $\alpha$  nachgewiesen werden. Der Verlust der Transduktion des IL-7-Signals führt zur Immundefizienz [105], während eine gesteigerte Signaltransduktion durch *gain-of-function*-Mutationen mit der akuten T-Zell-Leukämie assoziiert werden konnte [106]. Bei HIV hingegen kommt es krankheitsbedingt auf CD4+ und CD8+ T-Zellen zu einer geringeren Expression des mIL-7R $\alpha$  [107, 108]. Bei der Tb sind Veränderungen mIL-7R $\alpha$ -Expression bisher nicht beschrieben.

#### **1.3.4 Löslicher Interleukin-7-Rezeptor**

Beim löslichen IL-7-Rezeptor (sIL-7R $\alpha$  / sCD127) handelt es sich um eine *Splicing* Variante des mIL-7R $\alpha$  ohne das *Exon* 6. Es wird postuliert, dass die mRNA des löslichen Rezeptors ebenfalls umgekehrt proportional zur IL-7-Plasmakonzentration exprimiert wird [109, 110]. Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten allerdings keine inverse Korrelation zwischen IL-7- und sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen feststellen [111]. Der sIL-7R $\alpha$  bindet IL-7 mit einer ähnlich hohen Affinität wie der membrangebundene Rezeptor [112].

Über die genaue Funktion des sIL-7R $\alpha$  wird kontrovers diskutiert. Einige Autoren gehen davon aus, dass er die Aktivität von IL-7 erhöht und erklären daraus höhere sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis [113], Multipler Sklerose [114-116], Lupus erythematoses [117] oder Diabetes mellitus Typ I [118]. Andere Autoren beschreiben sIL-7R $\alpha$  als IL-7-Antagonist, der die IL-7-vermittelte Signaltransduktion inhibiert und dadurch die Expression von Bcl-2 unterdrückt [112].

Bei verschiedenen weiteren Erkrankungen konnten Veränderungen der sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentration gefunden werden. Bei HIV-Infizierten wurden sowohl erniedrigte [109] als auch erhöhte [112] sIL-7R $\alpha$ -Konzentrationen berichtet. Bei Patienten mit einer Sepsis sind hohe sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen mit einer ungünstigen Prognose und einer erhöhten Mortalität korreliert [119]. Bei der Tb gab es nach unserem Kenntnisstand bis zum Zeitpunkt unserer Studie noch keine Daten, die Veränderungen der sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen zeigten.

## **1.4 Ziele der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist auf der einen Seite die Untersuchung der sIL-7R $\alpha$ - und sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen bei Tb-Patienten und ihren Kontaktpersonen, um einen möglichen Einfluss der Tb-Immunpathogenese auf diese für die T-Zellantwort relevanten Zytokine zu charakterisieren. Auf der anderen Seite wird in dieser Arbeit der Einfluss von IL-7 auf die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und die sich daraus ergebende Zytokinsekretion, insbesondere von multifunktionalen T-Zellen, untersucht.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Materialien für die Erstellung und Durchführung des BD™ Cytometric Bead Array

Substanz (Herstellername)	Herstellerinformationen	Verwendung
BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Functional Bead A4	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	Beads für die Konjugation mit IL-7R $\alpha$ -Antikörpern
BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Functional Bead D9	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	Beads für die Konjugation mit IL-2R $\alpha$ -Antikörpern
BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Functional Bead Conjugation Buffer Set <ul style="list-style-type: none"> <li>BD™ Coupling Buffer</li> <li>BD™ Storage Buffer</li> </ul>	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	Puffersystem für die Konjugation von <i>Beads</i> mit Antikörpern
Bio-Spin® P-30 Gel Columns	Bio-Rad, Hercules, USA	System für den Medien austausch der Antikörper
Biotin Mouse anti-Human CD127	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	Klon: HIL-7R-M21 <i>Detection</i> -Antikörper – biotinmarkiert
Einmolekulares Dithiothreitol (DTT)	Biocad, Moskau, Russland	Chemikalien für die Konjugation von <i>Beads</i> mit Antikörpern
Human IL-7R alpha/CD127 Antibody	R&D Systems, Minneapolis, USA	Klon: 40131 <i>Capture</i> -Antikörper für die Konjugation mit <i>Beads A4</i>
Mouse anti human CD25-Biotin	Acris Antibodies GmbH, San Diego, USA (heute: OriGene Technologies, Rockville, USA)	<i>Detection</i> -Antikörper – biotinmarkiert

N-Ethylmaleinimid (NEM) in Dimethylsulfoxid (DMSO) (2 mg/ml)	Bio-Rad, Hercules, USA	Chemikalien für die Konjugation von <i>Beads</i> mit Antikörpern
Purified anti-human CD25 Antibody	BioLegend, San Diego, USA	Klon: M-A251 <i>Capture</i> -Antikörper für die Konjugation mit <i>Beads</i> D9
Recombinant Human CD127 Fc Chimera	R&D Systems, Minneapolis, USA	Für die Herstellung einer Verdünnungsreihe
Recombinant Human CD25 Fc Chimera	R&D Systems, Minneapolis, USA	Für die Herstellung einer Verdünnungsreihe
Streptavidin-PE	BioLegend, San Diego, USA	Phycoerythrin (PE)-markiertes Streptavidin, bindet Biotin
Sulfosuccinimidyl 4-(N-Maleimidomethyl)-Cyclohexan-1-Carboxylat (sulfo-SMCC)	Bio-Rad, Hercules, USA	Chemikalien für die Konjugation von <i>Beads</i> mit Antikörpern

**Tabelle 1: Materialien für den BD™ Cytometric Bead Array**

Auflistung der Materialien, die für die Konjugation und die Durchführung des BD™ Cytometric Bead Arrays (CBA) verwendet wurden.

### 2.1.2 Materialien für die Isolation von T-Zellen aus dem Vollblut mittels Biocoll-Trennlösung und BD IMag™-System

Substanz (Herstellername)	Herstellerinformationen	Verwendung
BD IMag™ Human T Lymphocyte Enrichment Set <ul style="list-style-type: none"> <li>BD IMag™ Biotin Human T Lymphocyte Enrichment Cocktail</li> <li>BD IMag™ Streptavidin Particles Plus</li> </ul>	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	Primärer und sekundärer Antikörper zur T-Zellanreicherung
BD IMag™ IMagnet direct magnet	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	Magnet

Histopaque®-1077 („Biocoll“)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer zur Isolation von mononukleären Zellen
MACS ( <i>Magnetic activated cell sorting</i> ) Puffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	Puffer für die Aufnahme der Zellen

**Tabelle 2: Materialien für die T-Zellanreicherung**

Auflistung der Materialien, die für die T-Zellanreicherung mittels Biocoll® Trennlösung und BD IMag™-System verwendet wurden.

### 2.1.3 Substanzen, die für die T-Zellkulturen verwendet wurden

Substanz (Herstellername)	Herstellerinformationen	Verwendung
Gibco™ Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation	Fisher Scientific, Waltham, USA	Stimulus
Gibco™ Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate-buffered saline – PBS</i> )	Fisher Scientific, Waltham, USA	Für Waschschritte etc.
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Antibiotika für die T-Zellkulturen
Recombinant Human IL-7	BioLegend, San Diego, USA	Stimulus
Überstände der Mouse Anti-Human CD3 Hybridoma (OKT3) Zelllinie	Überstand einer Okt-3 Hybridoma Zellenlinie	Stimulus
X-VIVO™ 15	LONZA, Basel, Schweiz	Medium für T-Zellkulturen

**Tabelle 3: Materialien für die T-Zellkulturen**

Lösungen, Medien und Stimuli, die für die T-Zellkulturen und Stimulationsversuche von T-Zellen verwendet wurden.

### 2.1.4 Antikörper für die Fluoreszenzmarkierung der T-Zellen

#### 2.1.4.1 Antikörper, die für Oberflächenfärbungen verwendet wurden

Zielantigen und Fluoreszenz	Herstellerinformationen	Spezifizierung
CD3 – PerCP	BioLegend, San Diego, USA	Klon: OKT3

CD4 – Brilliant Violet 510™	BioLegend, San Diego, USA	Klon: OKT4
CD4 – Alexa Fluor® 488	BioLegend, San Diego, USA	Klon: RPTA-4
CD25 – PE-Cy™7	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	Klon: 2A3
CD40L – APC-eFluor® 780	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Klon: 24-31
CD69 – Brilliant Violet 650™	BioLegend, San Diego, USA	Klon: FN50
CD127 – Alexa Fluor® 488	BioLegend, San Diego, USA	Klon: A019D5
CD127 – Alexa Fluor® 647	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	Klon: HIL-7R-M21
eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 506	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Färbt tote Zellen an

**Tabelle 4: Antikörper für die Oberflächenfärbungen**

Auflistung der fluoreszierenden Antikörper, die für die Oberflächenfärbungen von T-Zellen und zur anschließenden Messung mittels Durchflusszytometrie verwendet wurden. Nicht in jedem Experiment wurden alle Antikörper verwendet.

#### 2.1.4.2 Substanzen und Antikörper, die für die intrazelluläre Zytokinfärbungen verwendet wurden

Substanz (Herstellername)	Herstellerinformationen	Verwendung
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Verhindert die Sezernierung von Zytokinen aus Zellen
Fixation Buffer	BioLegend, San Diego, USA	Fixierung von Zellen für die intrazelluläre Färbung
Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer	BioLegend, San Diego, USA	Permeabilisierung der Zellwand für die intrazelluläre Färbung

**Tabelle 5: Materialien für die Fixierung und Permeabilisierung**

Auflistung der Materialien und Lösungen, die für die Aufbereitung der T-Zellen für die intrazelluläre Zytokinfärbung verwendet wurden.

Zielantigen und Fluoreszenz	Herstellerinformationen	Spezifizierung
CD3 – PerCP-Cy™5.5	BioLegend, San Diego, USA	Klon: SK7
CD4 – Brilliant Violet 510™	BioLegend, San Diego, USA	Klon: OKT4
TNF- $\alpha$ – Alexa Fluor® 700	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	Klon: MAb11
IFN- $\gamma$ – V450	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	Klon: B27
Il-2 – APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	Klon: REA689
eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Färbt tote Zellen an

**Tabelle 6: Antikörper für die intrazelluläre Zytokinfärbung**

Auflistung der fluoreszierenden Antikörper, die für die intrazellulären Zytokinfärbungen von T-Zellen und zur anschließenden Messung mittels Durchflusszytometrie verwendet wurden.

## 2.2 Software

Software	Herstellerinformationen	Spezifizierung
BD FACSDiva™ Software	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	Analyseprogramm für Durchflusszytometriedaten
FCS Express 4 und 6	De Novo Software, Glendale, USA	Analyseprogramm für Durchflusszytometriedaten
GraphPad Prism 6	Graphpad Software, La Jolla, USA	Grafiken, Statistiken
Word 2016	Microsoft, Redmond, USA	Dissertationsschrift
Excel 2016	Microsoft, Redmond, USA	Datenerhebung
Endnote X8 und X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA	Literaturverwaltung

**Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Software**

## 2.3 Geräte

Gerät	Herstellerinformationen	Spezifizierung
BD LSRFortessa™	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	Durchflusszytometer

CO2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Modell: Heracell 150i
Tischzentrifuge	Hettich, Bäch, Schweiz	Modell: Rotina 420R
Mikrozentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Modell: 5415C
IKA Vortex	IKA Werke, Staufen, Deutschland	Modell: IKA Vortex 2
Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Modell: Herasafe

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Geräte

## 2.4 Probanden

### 2.4.1 Bestimmung der löslichen Zytokinrezeptoren bei Tb-Patienten und gesunden Kontaktpersonen

Für diese Studie wurden insgesamt 58 Erwachsene Tb-Patienten und 149 Kontaktpersonen aus gemeinsamen Haushalten mit Tb-Patienten, die keine Symptome einer Tb zeigten, rekrutiert. Die Patienten wurde in Ghana am *Komfo Anokye Teaching Hospital*, am *Kumasi South Hospital* und an der *Kwame Nkrumah University of Science and Technology* in den Jahren 2011 und 2012 rekrutiert. Die Diagnose der Tuberkulose erfolgte durch Röntgen-Thorax-Aufnahmen und den direkten Erregernachweis in angefärbten Sputumausstrichen. Wenn kein Erreger im Sputum nachgewiesen werden konnte, wurde die Diagnose durch eine Tb-Kultur gestellt. Patienten mit bekannter HIV-Diagnose wurden von der Studie ausgeschlossen. Die häuslichen Kontaktpersonen waren klinisch gesund. Von Afum-Adjei Awuah et al. wurde allerdings in dieser Kohorte bei 19 Kontaktpersonen die tuberkulinabhängige IFN- $\gamma$ -Ausschüttung untersucht, die bei 18 Kontaktpersonen positiv ausfiel [120]. Die Tb-Therapie wurde nach den bereits dargelegten ghanaischen Leitlinien unmittelbar nach der ersten Probenentnahme begonnen. Für die Studie wurde von den Patienten zu Beginn, nach zwei Monaten Therapie und nach Abschluss der Therapie nach sechs Monaten heparinisiertes Blut gewonnen. Nur 35 der 58 Tb-Patienten durchliefen die Studie vollständig. Neun Patienten nahmen ausschließlich an der Blutentnahme zu Studienbeginn teil, sieben zu Studienbeginn und unter Therapie und zwei zu Studienbeginn und nach Therapieabschluss. Von fünf Tb-Patienten wurde nur nach zwei Monaten

Therapie und nach Abschluss der Therapie Blut entnommen. Diese Patienten ohne Ausgangswert wurden von der Studie ausgeschlossen, sodass letztlich 53 Tb-Patienten untersucht wurden. Die gesunden Kontaktpersonen wurden in den Haushalten der Tb-Patienten rekrutiert und zeigten keine Symptome einer Tuberkulose. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Charakteristika	Kontaktpersonen	Tb-Patienten
<b>Anzahl (n)</b>	149	53
<b>Alter (Jahre)</b>	34,09 [18-68]	38,62 [18-71]
<b>Geschlecht (n)</b>		
<b>Männlich</b>	65 (44%)	37 (70%)
<b>Weiblich</b>	84 (56%)	16 (30%)
<b>BCG-Impfung (n)</b>		
<b>Ja</b>	89 (60%)	23 (43%)
<b>Nein</b>	49 (33%)	29 (55%)
<b>Keine Information</b>	11 (7%)	1 (2%)

**Tabelle 9: Patientencharakteristika der ghanaischen Tb-Kohorte**

Zusammenfassung der Probandencharakteristika der Tb-Patienten und ihrer häuslichen Kontaktpersonen. Angegeben sind der Median und die Spannweite bzw. die Anzahl (n) und der prozentuale Anteil.

## 2.4.2 Blutproben für T-Zellkulturen

Für T-Zellstimulationsversuche wurde nicht verwendetes Vollblut, sog. *Buffy coats*, der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Düsseldorf verwendet. Die Weitergabe erfolgt anonymisiert, sodass keine Aussagen über Geschlecht, Alter oder Ethnien getroffen werden können.

## 2.4.3 Ethikvotum

Alle Probanden der Studie waren volljährig und haben selbstständig schriftlich in die Studie eingewilligt. Sie waren in der Lage, zu jedem Zeitpunkt aus der Studie auszuscheiden und die Einwilligung in die Verwendung ihrer Blutproben und Daten zu widerrufen. Das Ethikvotum wurde erteilt von dem *Committee on Human Research, Publication and Ethics* an der *School of Medical Sciences* der *Kwame Nkrumah University of Science and Technology* in Kumasi, Ghana (Aktenzeichen: CHRPE/203/10 und CHRPE/AP/221/14)

## 2.5 Methoden

### 2.5.1 Bestimmung der Plasmakonzentrationen der löslichen Zytokinrezeptoren für Interleukin 2 und Interleukin 7 mit dem *Cytometric Bead Array*

#### 2.5.1.1 Herstellung des *Cytometric Bead Arrays*

Der *Cytometric Bead Array* (CBA) für die Messung des sIL-7R $\alpha$  wurde in Anlehnung an das Protokoll von Faucher et al. erstellt und durchgeführt [121]. Für die Entwicklung eines CBAs der gleichzeitig sIL-2R $\alpha$  und sIL-7R $\alpha$  messen kann, wurden die BD™ CBA *Functional Beads* A4 mit sIL-7R $\alpha$ -Antikörpern und die BD™ CBA *Functional Beads* D9 mit sIL-2R $\alpha$ -Antikörpern konjugiert. Die *Functional Beads* sind mit Allophycocyanin (APC) und APC-cyanine (APC-Cy7) farblich markierte 7,5  $\mu$ m große Polystyrol-Beads, auf deren Oberfläche Proteine gebunden werden können.

Die Konjugation der für den CBA verwendeten *Functional Beads* erfolgte nach Herstellerangaben. Hierfür wurden für 500 Messungen 75  $\mu$ l der *Functional Beads* (A4 oder D9) zunächst für eine Minute in ein Ultraschallbad gegeben. Anschließend gaben wir 1,9  $\mu$ l einmolares Dithiothreitol (DTT) zu und inkubierten die Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach erfolgte ein Waschschrift, bei dem die *Beads* zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die *Beads* anschließend in 1 ml BD™ *Coupling Buffer* aufgenommen wurden. Diesen Schritt wiederholten wir insgesamt dreimal. Am Ende wurden die *Beads* in 20  $\mu$ l BD™ *Coupling Buffer* aufgenommen.

Für die Vorbereitung der Antikörper (sIL-7R $\alpha$ - oder sIL-2R $\alpha$ -Antikörper) stellten wir eine Verdünnung der Antikörper von 0,5 mg/ml her. Anschließend wurden 90  $\mu$ l der Antikörperlösung mit 2  $\mu$ l Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC; 2 mg/ml) für eine Stunde inkubiert. Danach gaben wir die Antikörperlösung in ein *Bio-Spin Column* und zentrifugierten sie.

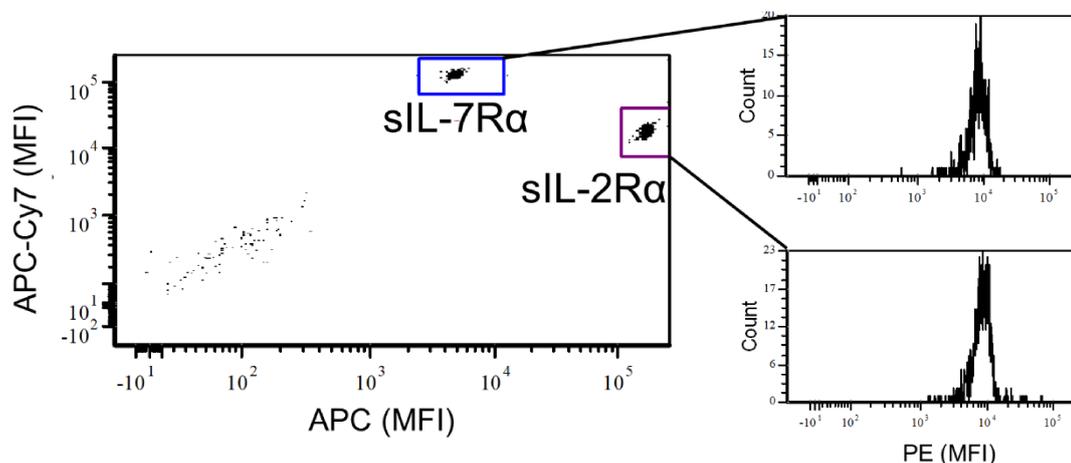
Im Anschluss wurden die entsprechenden Antikörper und *Beads* (s.o.) zusammengegeben und für eine Stunde inkubiert. Dann lösten wir N-Ethylmaleininid (NEM) in Dimethylsulfoxid (DMSO) (2 mg/ml) und fügten 2  $\mu$ l der Lösung zu den konjugierten *Beads* hinzu. Anschließend erfolgte eine erneute

fünfzehnminütige Inkubation. Zuletzt wurde noch ein Pufferaustausch in den BD™ *Storage Buffer* vorgenommen. Hierfür wurden die *Beads* zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die *Beads* anschließend in 1 ml BD™ *Storage Buffer* aufgenommen. Diesen Schritt wiederholten wir dreimal. Am Ende wurden die konjugierten *Beads* in 500 µl BD™ *Storage Buffer* aufgenommen.

### 2.5.1.2 Messung der löslichen Zytokinrezeptoren

Die Blutproben der Tb-Patienten und der gesunden häuslichen Kontaktpersonen wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline* - PBS) 1:1 verdünnt und anschließend mit Hilfe der Biocoll-Trennlösung in Blutplasma und zelluläre Blutbestandteile aufgetrennt, wie später noch ausführlicher beschrieben. Das somit 1:1-verdünnte Plasma wurde entnommen und bei -80°C bis zur Messung eingefroren.

Für die Messung von sIL-2Rα und sIL-7Rα in den Plasmaproben von Tb-Patienten, ihren Kontaktpersonen und in T-Zellkulturüberständen wurden zunächst alle Proben langsam auf Eis aufgetaut. Die mit IL-2Rα- und IL-7Rα-Antikörpern konjugierten *Beads* wurden 1:1 gemischt (jeweils 1 µl für jede zu



**Abb. 1: Beispielhafte Darstellung der Durchflusszytometriedaten des CBA zur Messung der löslichen Zytokinrezeptorkonzentrationen.**

Dargestellt ist die *Gating*-Strategie bei der Auswertung der *Cytometric Bead Array* (CBA)-Proben mit dem Durchflusszytometer zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen des löslichen Interleukin (IL) 2 Rezeptors Alpha (sIL-2Rα) und des löslichen IL-7-Rezeptors Alpha (sIL-7Rα). In der linken Grafik ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Farben Allophycocyanin (APC) und APC-cyanine (APC-Cy7) gegeneinander aufgetragen, mit denen die BD™ CBA *Functional Beads* markiert sind und somit getrennt werden können. Rechts abgebildet ist die Anzahl an Beads (*Count*) mit entsprechender Fluoreszenzintensität in der Farbe Phycoerythrin (PE), das an Streptavidin gebunden ist. Streptavidin bindet die Biotin-Antikörper für sIL-2Rα und sIL-7Rα, wodurch eine quantitative Bestimmung der Plasmakonzentration der löslichen Zytokinrezeptoren möglich ist.

analysierende Probe) und anschließend mit PBS auf 50 µl/Probe aufgefüllt. 50 µl der zu analysierenden Proben wurden jeweils mit 50 µl der gemischten konjugierten *Beads* in ein Well gegeben und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, wodurch sich sIL-2Rα oder sIL-7Rα an die *Beads* banden. Danach wurden die IL-2Rα- und IL-7Rα-Biotin-Antikörper (2,5 µl/Well bzw. 5 µl/Well) hinzugefügt und die Proben über Nacht bei 4°C erneut inkubiert. Diese Antikörper banden dadurch ebenfalls an das bereits an die *Beads* angelagerte sIL-2Rα bzw. sIL-7Rα. Anschließend wurde 10 µl/Well 1:10-verdünntes Phycoerythrin (PE) markiertes Streptavidin zugegeben. Streptavidin bindet Biotin mit einer hohen Affinität. Die Inkubation wurde nach 30 Minuten durch wiederholte Waschschriffe abgebrochen. Anschließend wurden die Proben im Durchflusszytometer gemessen. Je mehr sIL-2Rα oder sIL-7Rα in den Proben enthalten war, desto mehr IL-2Rα- und IL-7Rα-Biotin-Antikörper konnten sich anlagern. An die Biotin-Antikörper bindet wiederum PE-Streptavidin, sodass durch die Höhe der mittleren Fluoreszenzintensität der Farbe PE indirekt auf die Konzentration von sIL-2Rα oder sIL-7Rα geschlossen werden kann (Abb. 1).

Um die Messung absoluter Werte zu ermöglichen, fertigten wir zusätzlich bei jedem Messvorgang eine Verdünnungsreihe mit rekombinantem sIL-2Rα (von 100 ng/ml bis 0,0975 ng/ml) und sIL-7Rα (von 500 ng/ml bis 0,4875 ng/ml) an.

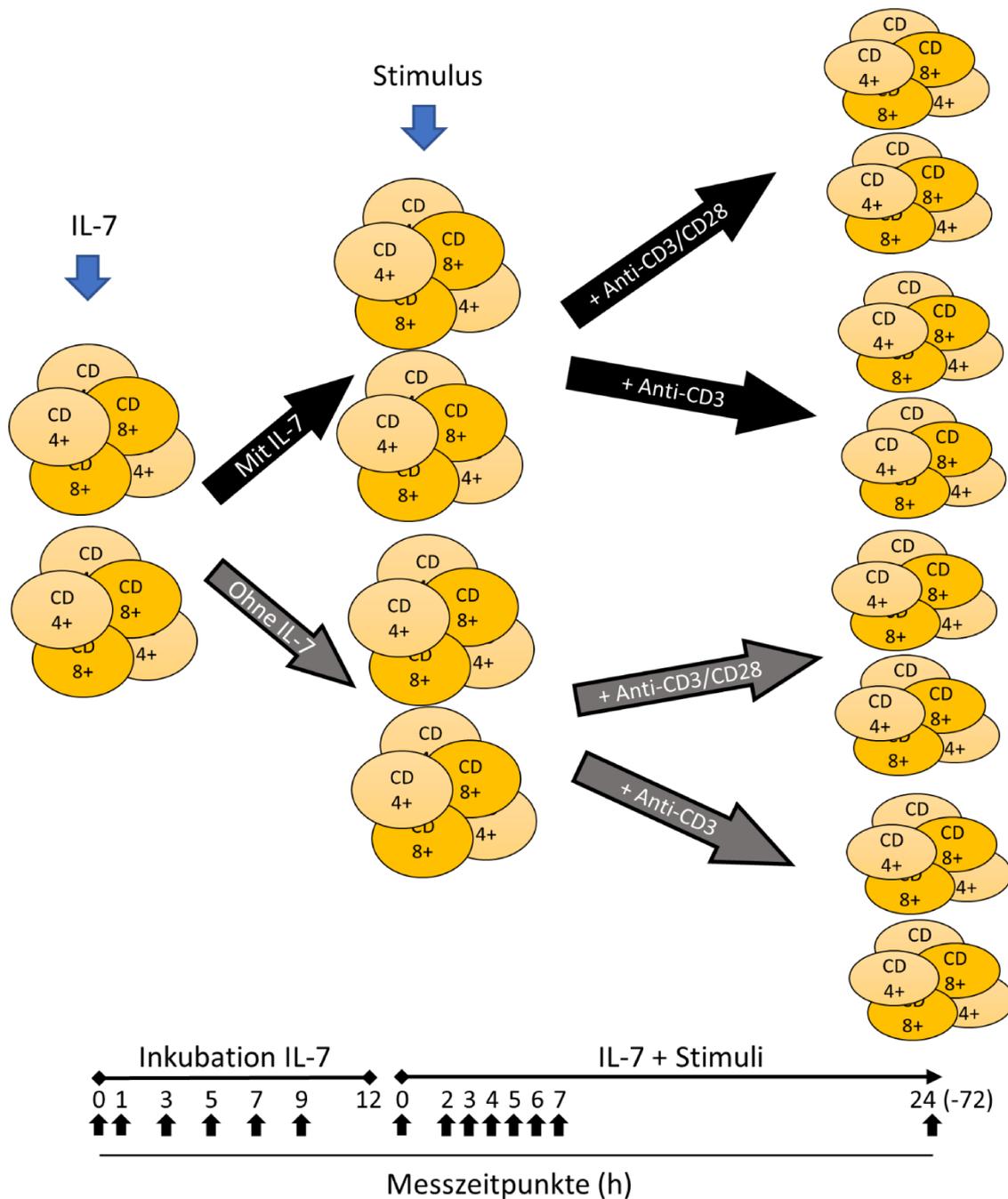
## **2.5.2 Messung der Expression von Oberflächenmolekülen und Zytokinen in T-Zellstimulationsversuchen**

### **2.5.2.1 Aufreinigung von T-Zellen aus dem peripheren Vollblut**

Aus 1:1 mit PBS verdünntem heparinisiertem Vollblut der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Düsseldorf wurden zunächst mit Hilfe der Biocoll-Trennlösung nach Herstellerangaben mononukleäre Zellen (*Peripheral Blood Mononuclear Cell* - PBMC) isoliert. Hierzu wurde das Vollblut vorsichtig auf die Biocoll-Lösung geschichtet und anschließend zentrifugiert. Dadurch trennt sich das Vollblut in einzelne Bestandteile auf. Zuerst befindet sich das Blutplasma, anschließend die PBMC, dann kommt die Biocoll-Schicht und am Boden alle weiteren Zellen, in erster Linie Erythrozyten und Granulozyten. Die PBMC wurden vorsichtig entnommen und mehrmals gewaschen.

Für die T-Zellanreicherung aus den PBMC wurde das *BD IMag™ Human T Lymphocyte Enrichment Set* verwendet. Hierbei wurden die PBMC zunächst in MACS (Magnetic activated cell sorting)-Puffer aufgenommen und anschließend mit den Biotin-Antikörpern (*BD IMag™ Biotin Human T Lymphocyte Enrichment Cocktail*; 25 µl / 1 x 10<sup>7</sup> PBMCs) für 30 Minuten inkubiert. Da es sich um eine negative Selektion handelt, wurden hierbei alle Zellen außer den T-Zellen markiert. Nach einem Waschschrift wurden nun magnetische Streptavidin-besetzte Partikel (*BD IMag™ Streptavidin Particles Plus*; 25 µl / 1 x 10<sup>7</sup> PBMCs) zugegeben und erneut mit den Zellen inkubiert. Dann wurde die Suspension für 10 Minuten an den Magneten gestellt. Dadurch sammelten sich markierte Zellen am Magneten, die T-Zellen verblieben in der Suspension. Diese wurde abgenommen und erneut an den Magneten gestellt. Der Schritt wurde insgesamt zweimal wiederholt. Danach wurden die aufgereinigten T-Zellen in *X-Vivo-Medium* mit 50 U/ml Penicillin-Streptomycin aufgenommen.

## 2.5.2.2 T-Zellkulturen und Messung der stimulierten T-Zellen



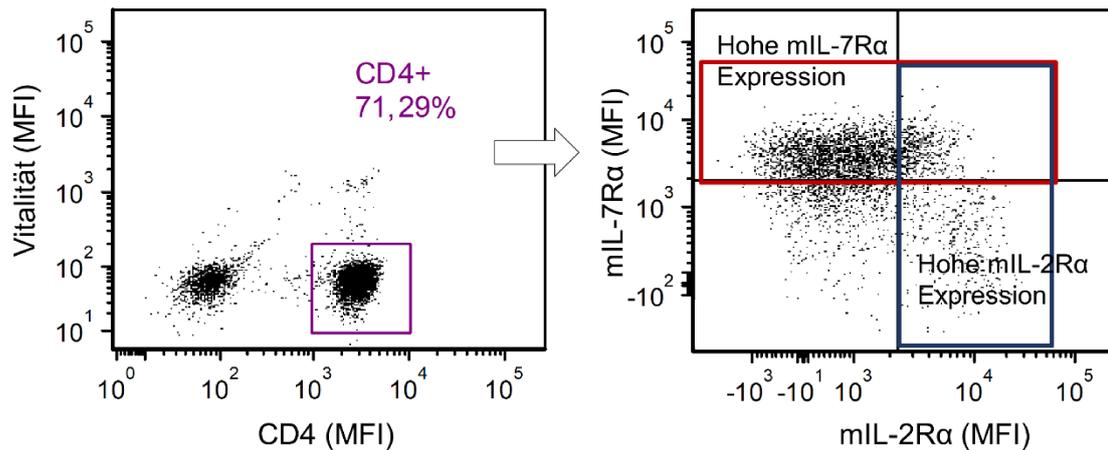
**Abb. 2: Schematische Darstellung der T-Zellstimulationsversuche.**

Aufgereinigte CD4+ und CD8+ T-Zellen wurden mit oder ohne Interleukin 7 (IL-7) inkubiert. Nach zwölf Stunden wurden die Zellen mit dem entsprechenden Stimulus, entweder Überstände der Okt-3-Zelllinie (Anti-CD3) oder Anti-CD3/CD28-bedeckte *Beads* (Anti-CD3/CD28), versetzt und weiter inkubiert. Während der Inkubation wurden serielle Messungen (schwarze Pfeile) der Oberflächenantigene und der Zytokine durchgeführt. Messzeitpunkte in Stunden (h). Nicht jeder Messzeitpunkt wurde bei jedem Experiment verwendet.

Für die T-Zellkulturen wurden für jeden Ansatz  $2 \times 10^5$  aufgereinigte T-Zellen in 200  $\mu$ l *X-Vivo* mit 50 U/ml Penicillin-Streptomycin mit oder ohne IL-7 (10 ng/ml) auf eine *96-Well-Platte* aufgebracht und für 12 Stunden bei 37° C inkubiert (Abb. 2). Alle Messungen erfolgten mindestens in Duplikaten. Für die

Charakterisierung der Expression von mIL-7R $\alpha$  und mIL-2R $\alpha$  unter dem Einfluss von IL-7 im Zeitverlauf wurde die Inkubation zu den entsprechenden Zeitpunkten abgebrochen, die Zellen zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit CD3-PerCP, CD4-Brilliant Violet 510™, CD25-PE-Cy™7 und CD127-Alexa Fluor® 488 gefärbt. Nach zwei Waschschritten erfolgte die Messung mittels Durchflusszytometrie.

Für die Bestimmung der Expression von Oberflächenmarkern und Zytokinen nach T-Zellstimulation wurden nach zwölfstündiger Inkubation mit IL-7 die T-Zellstimuli Anti-CD3/CD28 (*Gibco™ Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation*) (1  $\mu$ l/Well) oder Überstände der *Mouse Anti-Human CD3 Hybridoma* (OKT3) Zelllinie (25  $\mu$ l pro Well) zugefügt und die Inkubation fortgesetzt (Abb. 2). Die OKT-3-Zelllinie produziert Antikörper gegen das menschliche CD3. Für die Messung von Zytokinen wurde in die entsprechenden Wells Brefeldin A gegeben, was die Freisetzung der Zytokine aus der Zelle verhindert und eine intrazelluläre Zytokinmessung ermöglicht. Die Messungen von Oberflächenmarkern und Zytokinen erfolgte im Zeitverlauf. Die Färbung und Messung der Oberflächenproteine erfolgte wie oben beschrieben mit den Antikörpern CD3-PerCP, CD4-Alexa Fluor® 488, CD25-PE-Cy™7, CD40L-APC-eFluor® 780, CD69-Brilliant Violet 650™, CD127-Alexa Fluor® 647 und dem *eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 506*. In Abb. 3 ist die *Gating*-Strategie für CD4+ T-Zellen mit einer hohen Expression des mIL-2R $\alpha$  und mIL-7R $\alpha$  exemplarisch dargestellt.

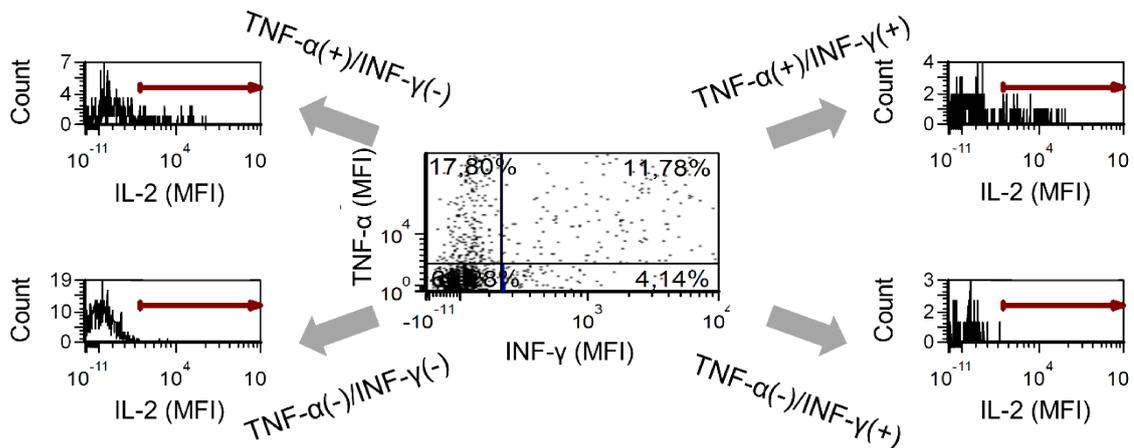


**Abb. 3: Exemplarische Darstellung des Gatings der membrangebundenen Interleukinrezeptoren.**

Dargestellt ist exemplarisch die *Gating*-Strategie zur Messung des Anteils an CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer hohen Expression des membrangebundenen Interleukin (IL) 7 Rezeptors Alpha (mIL-7R $\alpha$ ) bzw. des membrangebundenen IL-2 Rezeptors Alpha (mIL-2R $\alpha$ ). In der linken Abbildung ist der Vitalitätsfarbstoff gegen CD4, dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), aufgetragen. Vitale Zellen weisen eine niedrige MFI des Vitalitätsfarbstoffes auf. Die CD4<sup>+</sup> vitalen T-Zellen wurden dann in der rechten Abbildung auf ihre Expression des mIL-7R $\alpha$  und des mIL-2R $\alpha$  hin untersucht.

Für die Färbung und Messung der intrazellulären Zytokine wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten die Zellen mit dem *Fixation Buffer* fixiert. Hierfür wurden die Wells zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde zu jedem Well 100  $\mu$ l *Fixation Buffer* hinzugefügt und die Zellen resuspendiert. Nach fünfzehnminütiger Inkubation wurden die Wells erneut zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in *Permabilization Wash Buffer* aufgenommen. Hierdurch wird die Zellwand für die Antikörper permeabel. Die Färbung erfolgte mit CD3-PerCP-Cy<sup>TM</sup>5.5, CD4-Brilliant Violet 510<sup>TM</sup>, TNF- $\alpha$ -Alexa Fluor<sup>®</sup> 700, IFN- $\gamma$ -V450, IL-2-APC und dem *eBioscience<sup>TM</sup> Fixable Viability Dye eFluor<sup>TM</sup> 780*. Anschließend erfolgten zwei Waschschritte mit *Permabilization Wash Buffer* und die Messung am Durchflusszytometer. Die *Gating*-Strategie zur Messung der intrazellulären Zytokine und der mehrfachpositiven T-Zellen ist in Abb. 4 dargestellt.

Für die Bestimmung der löslichen Zytokinrezeptoren sIL-7R $\alpha$  und sIL-2R $\alpha$  nach einer T-Zellstimulation wurden Überstände der T-Zellkulturen, die mit oder ohne IL-7 sowie den Stimuli Anti-CD3/CD28 und Okt-3 inkubiert wurden, entnommen und eingefroren. Die Entnahme erfolgte 24, 48 und 72 Stunden nach Stimulation, die Messung mittels CBA, wie bereits beschrieben.



**Abb. 4: Exemplarische Darstellung des Gatings zur Messung der Zytokinsekretion von T-Zellen.**

Dargestellt ist an einem Beispiel die Messung intrazellulärer Zytokine und die Bestimmung des prozentualen Anteils mehrfachpositiver T-Zellen. Vitale CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in der mittleren Abbildung in Abhängigkeit ihrer Expression des Tumornekrosefaktors Alpha (TNF-α) und von Interferon Gamma (IFN-γ) aufgetragen. Abgebildet ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Die T-Zellen wurden je nach Expressionsmuster der Zytokine, wie oben dargestellt, in vier Gruppen eingeteilt. In jeder Gruppe wurde der Anteil an Interleukin 2 (IL-2) sezernierenden T-Zellen bestimmt. Dies ist in den vier kleineren Grafiken auf beiden Seiten abgebildet. Auch hier ist die MFI aufgetragen. Der rote Pfeil markiert den als positiv gewerteten Bereich.

### 2.5.3 Statistische Analysen und Graphen

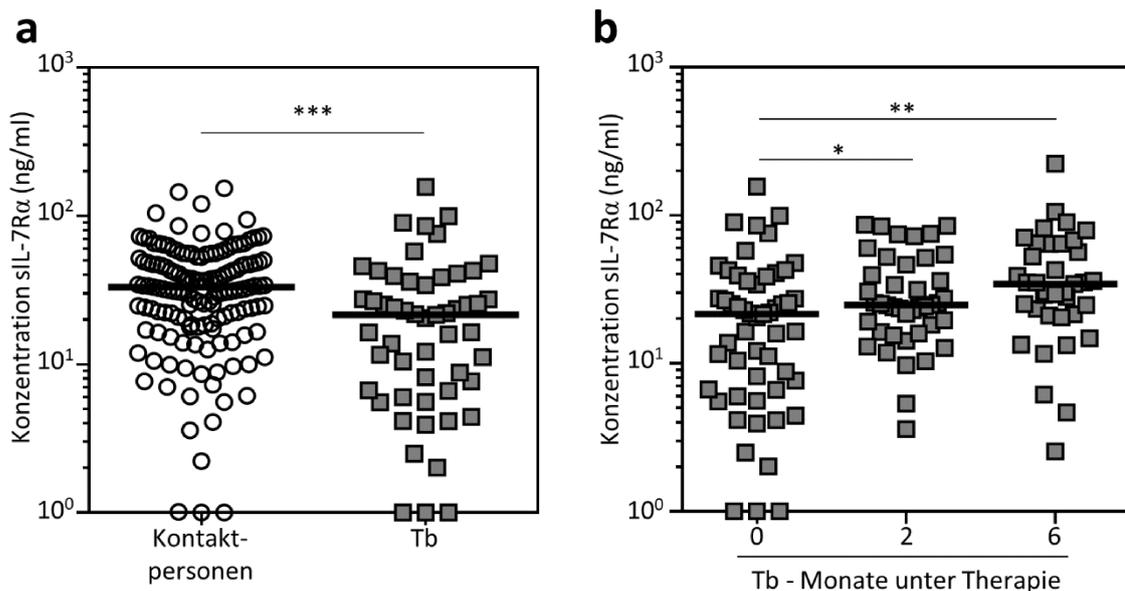
Die Daten des Durchflusszytometers wurden mittels BD FACSDiva™ (BD Bioscience) sowie FCS Express 4 und 6 (De Novo Software) visualisiert und ausgewertet. Statistische Analysen und Graphen wurden mit GraphPad Prism 6 und 9 (Graphpad Software) durchgeführt bzw. erstellt. Dabei wurde für die statistische Überprüfung der sIL-7Rα- und sIL-2Rα-Plasmakonzentrationen bei Tb-Patienten bzw. Kontaktpersonen, der *Mann-Whitney-U-Test* durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich zwei unabhängige Gruppen voneinander unterscheiden. Wiederholte Messungen wurden mit dem *Wilcoxon-Signed-Rank-Test* ausgewertet. Die Testung auf Korrelation erfolgte mittels Rangkorrelation nach Spearman. Die Auswertung der Zeitverläufe der T-Zellstimulationsversuche erfolgte bei Normalverteilung der Werte mittels gepaartem T-Test.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Plasmakonzentrationen der löslichen Zytokinrezeptoren für Interleukin 2 und Interleukin 7 bei Tuberkulosepatienten

##### 3.1.1 Veränderte Plasmakonzentration des löslichen Interleukin-7-Rezeptors bei Tuberkulosepatienten normalisieren sich während der Therapie

Bei verschiedenen Autoimmun- und Infektionskrankheiten wurden bereits Unterschiede in der sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentration von Erkrankten im Vergleich zu Gesunden berichtet [109, 112-119]. Wir untersuchten daher auch bei Patienten mit akuter Tb (n=53) die sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen und verglichen diese mit den Konzentrationen ihrer gesunden häuslichen Kontaktpersonen (n=149). Unsere Untersuchungen zeigten, dass Tb-Patienten vor Beginn der antituberkulösen Therapie signifikant niedrigere

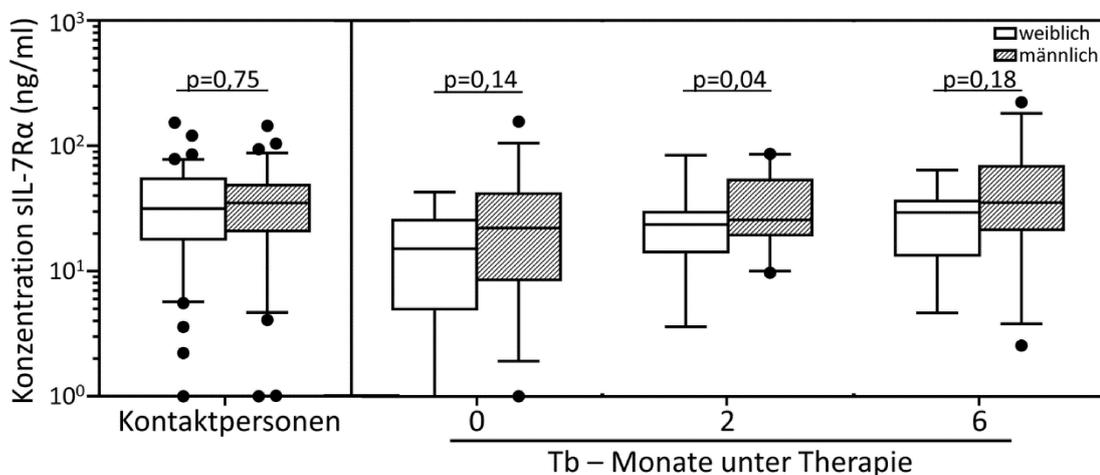


**Abb. 5: sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen bei Tb-Patienten und ihren gesunden Kontaktpersonen zu Beginn der Erkrankung und während der Therapie.**

(a) Konzentration des löslichen Interleukin-7-Rezeptors Alpha (sIL-7R $\alpha$ ) in Plasmaproben von Tuberkulose (Tb)-Patienten (n=53) und ihren gesunden häuslichen Kontaktpersonen (n=149). (b) sIL-7R $\alpha$ -Konzentration bei Tb-Infizierten vor Beginn der Therapie (0 Monate) (n=53) sowie nach zweimonatiger (n=42) und sechsmonatiger (n=37) Therapie. Abgebildet sind die sIL-7R $\alpha$  Plasmakonzentrationen als Mittelwert aus zwei Messungen von jedem Probanden als Symbol (Kreis, Quadrat) und der Median aller Messungen als durchgezogene Linie. Der *Mann-Whitney-U-Test* wurde zum Vergleich der einzelnen Gruppen verwendet. Die gepaarten Daten im Zeitverlauf wurden mit dem *Wilcoxon-Signed-Rank-Test* analysiert. Die p-Werte sind wie folgt angegeben: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. Die Daten sind Teil einer Veröffentlichung [1].

Plasmakonzentrationen als ihre Kontaktpersonen aufwiesen ( $p < 0,001$ ) (Abb. 5 (a)) [1].

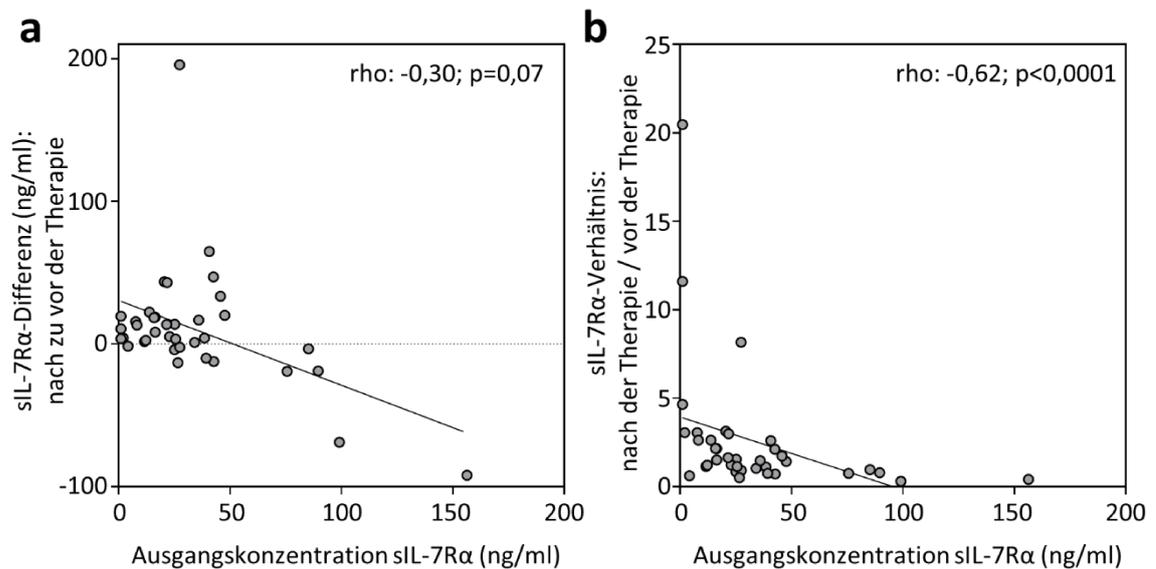
In einem weiteren Schritt untersuchten wir dann die sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen im Verlauf der Tb-Therapie. Es zeigte sich, dass es bereits nach zwei Monaten Therapie zu einem signifikanten Anstieg der Plasmakonzentrationen kam ( $p = 0,04$ ). Nach sechs Monaten Tb-Therapie waren die Plasmakonzentrationen noch weiter angestiegen ( $p = 0,01$ ) (Abb. 5 (b)) und es gab keine signifikanten Unterschiede mehr zu den gesunden Kontaktpersonen (nicht dargestellt) [1].



**Abb. 6: Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen.**

Plasmakonzentrationen des löslichen Interleukin 7 Rezeptors Alpha (sIL-7R $\alpha$ ) von Tuberkulose (Tb)-Patienten vor (0 Monate,  $n = 53$ ), während (2 Monate,  $n = 42$ ) und nach (6 Monate,  $n = 37$ ) der Therapie sowie von gesunden Kontaktpersonen ( $n = 149$ ). Abgebildet sind der Median sowie die 25ste und 75ste Perzentile (Box), die fünfte und 95ste Perzentile (Whiskers) und die Ausreißer (schwarze Punkte), jeweils für weibliche (weiße Kästen) und männliche (schraffierte Kästen) Probanden getrennt. Es erfolgte der *Mann-Whitney-U-Test* zum Vergleich der Geschlechterunterschiede. Die entsprechenden p-Werte sind in der Grafik angegeben. Die Daten sind Teil einer Veröffentlichung [1].

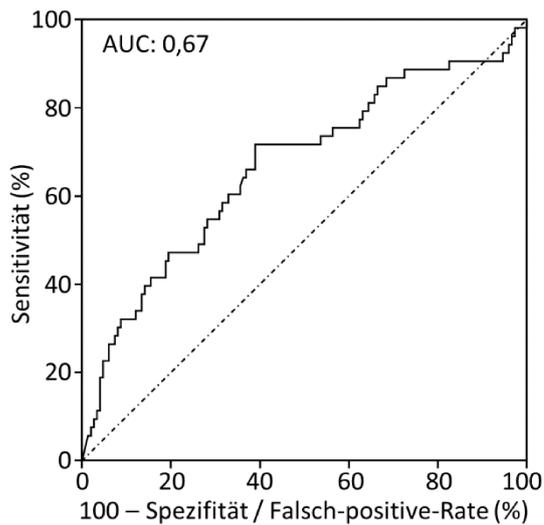
Da sich die Studiengruppen in der Geschlechterverteilung unterschieden (s. Tabelle 9), führten wir zudem noch einen Vergleich der sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen in Abhängigkeit des Geschlechts durch. Hier ergab sich jedoch lediglich nach zwei Monaten Tb-Therapie eine leicht signifikant niedrigere Plasmakonzentration bei weiblichen Tb-Patienten ( $p = 0,04$ ). Insgesamt hatten Frauen tendenziell eine niedrigere sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentration als Männer (Abb. 6). Da Frauen in unserer Patientenkohorte unterrepräsentiert waren, kann ausgeschlossen werden, dass das Geschlecht ursächlich für die von uns beobachteten Unterschiede in der sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentration war [1].



**Abb. 7: Einfluss der sIL-7R $\alpha$ -Ausgangskonzentration auf Konzentrationsänderungen während der Therapie.**

(a) Absolute Differenz der löslichen Interleukin-7-Rezeptor Alpha (sIL-7R $\alpha$ ) Plasmakonzentrationen nach und vor der Tuberkulosebehandlung im Vergleich zur sIL-7R $\alpha$  Ausgangskonzentration. (b) Verhältnis der sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen nach der Therapie zu den Ausgangskonzentrationen im Vergleich zu der jeweiligen Ausgangskonzentration (n = 37). Angegeben sind jeweils der Korrelationskoeffizient (rho) und der p-Wert für die Rangkorrelation nach Spearman. Zur Orientierung sind lineare Regressionslinien mit abgebildet. Die Daten sind Teil einer Veröffentlichung [1].

Um die Frage zu beantworten, ob das Ausmaß des Anstiegs der sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentration abhängig von der sIL-7R $\alpha$ -Ausgangskonzentration vor Therapiebeginn ist, setzten wir die absoluten und relativen Veränderungen in Relation zu der Ausgangskonzentration. Betrachtet man die absoluten Veränderungen (Monat 6 - Monat 0), so zeigt sich lediglich eine mäßige negative Korrelation (rho=-0,30; p=0,07) zwischen dem Ausgangswert und der Veränderung im Verlauf, die keine Signifikanz erreicht (Abb 7 (a)). Betrachtet man allerdings die relative Veränderung (Monat 6 / Monat 0) im Vergleich zu den Ausgangswerten, so zeigte sich eine deutliche negative Korrelation (rho=-0,62; p<0,0001) (Abb. 7 (b)). Insbesondere die Patienten mit einer niedrigen sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentration vor Therapiebeginn verzeichneten also einen Konzentrationsanstieg während der Therapie [1].



**Abb. 8: ROC-Kurve der sIL-7Rα Plasmakonzentration.**

Die *Receiver-Operating-Charakteristik* (ROC)-Kurve zeigt die Fähigkeit der löslichen Interleukin-7-Rezeptor Alpha (sIL-7Rα) Plasmakonzentration (durchgezogene Linie) zwischen Patienten mit Tuberkulose und gesunden Kontaktpersonen zu unterscheiden (Sensitivität und Spezifität). Die Diagonale (gestrichelte Linie) gibt den Bereich an, in dem keine Unterscheidung möglich ist. Angegeben ist die *Area under the curve* (AUC). Die Daten sind Teil einer Veröffentlichung [1].

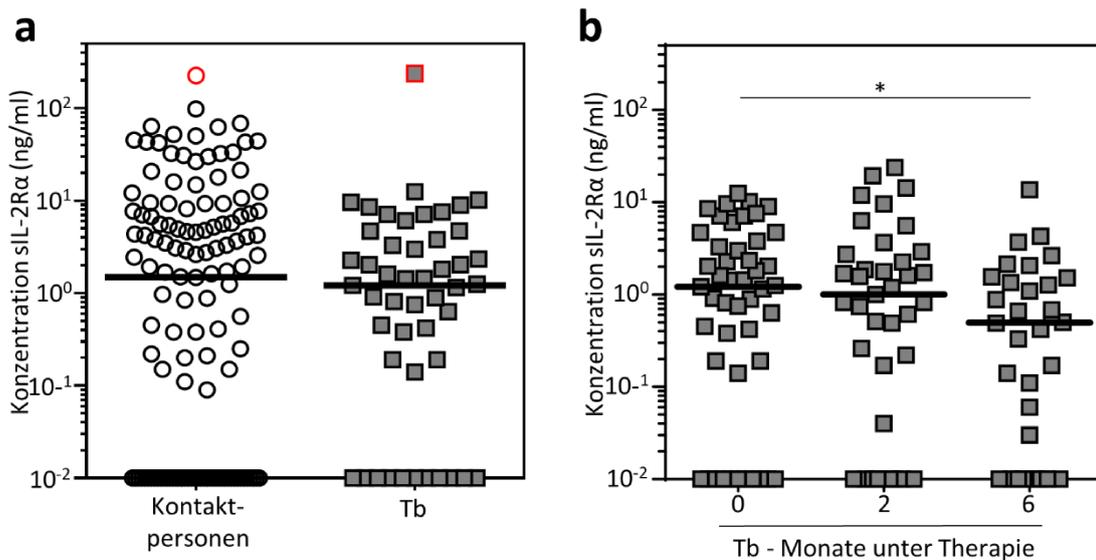
Darüber hinaus untersuchten wir auch, ob sIL-7Rα als diagnostischer Laborparameter in der Diagnosestellung bzw. als Verlaufsp Parameter von Tb-Patienten verwendet werden kann. Allerdings ergab der Vergleich von Tb-Patienten mit ihren häuslichen Kontaktpersonen mit der *Receiver Operating Characteristic* (ROC)-Analyse (Abb. 8), dass die sIL-7Rα-Plasmakonzentration nur eingeschränkt zwischen Tb-Patienten und Gesunden unterscheiden kann (*Area under the Curve* (AUC)=0,67) [1].

Die Daten der sIL-7Rα-Plasmakonzentrationen bei Tb-

Patienten und Kontaktpersonen sind Teil einer Veröffentlichung [1].

### 3.1.2 Die Plasmakonzentration des löslichen Zytokinrezeptors für Interleukin 2 verringert sich bei Tuberkulosepatienten während der Therapie

Parallel zu der Untersuchung der sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen untersuchten wir auch die Konzentrationen des sIL-2R $\alpha$  in einem gemeinsamen CBA. Erhöhte sIL-2R $\alpha$ -Konzentrationen wurden sowohl bei Patienten mit Tumorerkrankungen als auch bei infektiösen und autoimmun-vermittelten Erkrankungen beschrieben [39-43]. In unseren Untersuchungen zeigte sich allerdings kein Unterschied zwischen den Plasmakonzentration von Tb-Patienten und gesunden Kontaktpersonen. Allerdings lagen 11,3 % (Kontaktpersonen) bzw. 11,4 % (Tb-Patienten) der Messwerte der sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen oberhalb des Detektionsbereichs des CBA und konnten somit nicht exakt bestimmt werden (Abb. 9 (a)).

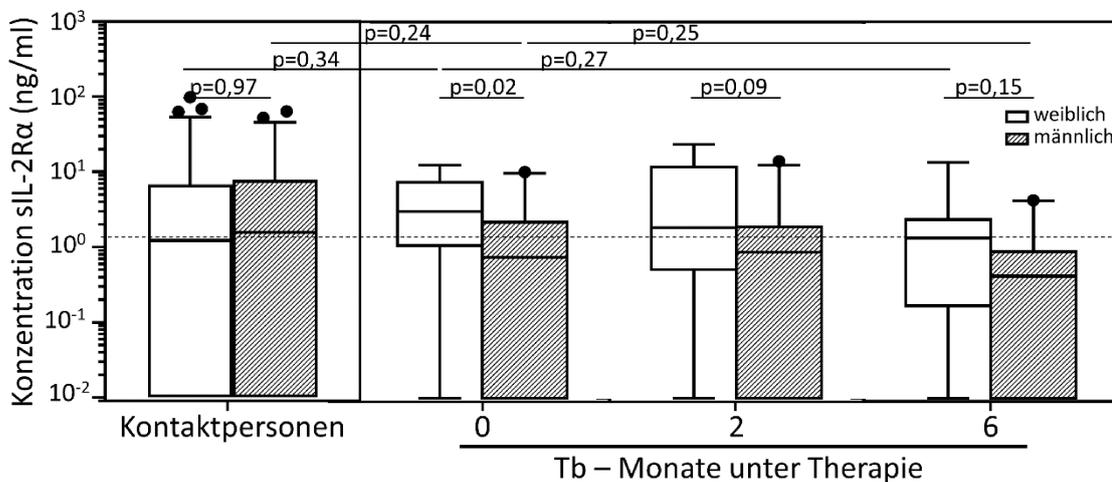


**Abb. 9: sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen bei Tb-Patienten und ihren gesunden Kontaktpersonen zu Beginn der Erkrankung und während der Therapie.**

(a) Konzentration des löslichen Interleukin-2-Rezeptors Alpha (sIL-2R $\alpha$ ) in Plasmaproben von Tuberkulose (Tb)-Patienten (n=53; davon 47 im Detektionsbereich) und ihren gesunden häuslichen Kontaktpersonen (n=149; 132). Die rot umrandeten Symbole stehen für Messwerte oberhalb des Detektionsbereichs des Assays (11,3% bzw. 11,4%). (b) sIL-2R-Konzentration bei Tb-Infizierten vor Beginn der Therapie (0 Monate) (n=53; 47) sowie nach zweimonatiger (n=42; 37) und sechsmonatiger (n=37; 32) Therapie. Abgebildet sind die sIL-2R $\alpha$  Plasmakonzentrationen als Mittelwert aus zwei Messungen von jedem Probanden als Symbol (Kreis, Quadrat) und der Median aller Messungen als durchgezogene Linie. Der *Mann-Whitney U-Test* wurde zum Vergleich der einzelnen Gruppen verwendet. Die gepaarten Daten im Zeitverlauf wurden mit dem *Wilcoxon-Signed-Rank-Test* analysiert. Die p-Werte sind wie folgt angegeben: \*p<0.05.

Bei der Untersuchung der sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentration der Tb-Patienten im Therapieverlauf zeigt sich ein Abfall der sIL-2R $\alpha$ -Konzentration im Verlauf. Diese Tendenz erreichte zum Abschluss der Therapie nach sechs Monaten eine statistische Signifikanz ( $p=0,03$ ) (Abb. 9 (b)).

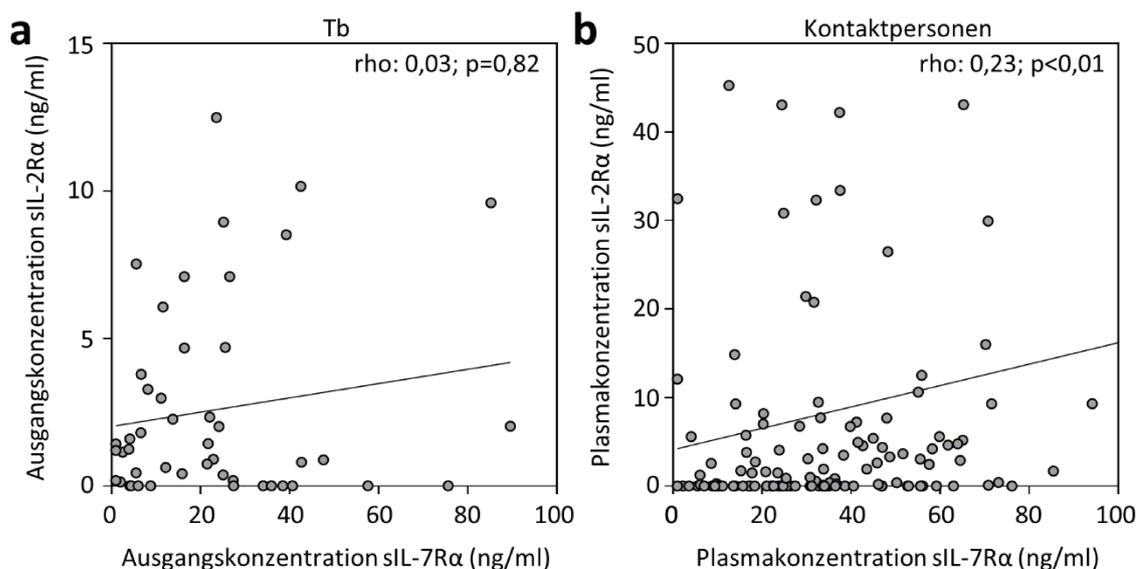
Betrachtet man die geschlechtsspezifischen Unterschiede bei den sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen, so zeigte sich bei den Tb-Patienten eine statistische Signifikanz für höhere Plasmakonzentrationen bei weiblichen Patienten im Vergleich zu männlichen Patienten vor der Therapie ( $p=0,02$ ). Darüber hinaus war auch nach zwei Monaten Therapie noch ein Trend zu höheren sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen im Vergleich zu männlichen Patienten zu erkennen ( $p=0,09$ ). Nach Abschluss der Therapie konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede der sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen mehr festgestellt werden ( $p=0,15$ ). Bei den Kontaktpersonen hingegen waren die sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen zwischen Männern und Frauen nahezu identisch. In der Subgruppenanalyse der Geschlechter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontaktpersonen und Tb-Patienten bzw. während der Therapie der Tb-Patienten (Abb. 10).



**Abb. 10: Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen.** Plasmakonzentrationen des löslichen Interleukin-2-Rezeptors Alpha (sIL-2R $\alpha$ ) von Tuberkulose (Tb)-Patienten vor (0 Monate,  $n = 47$ ), während (2 Monate,  $n = 37$ ) und nach (6 Monate,  $n = 32$ ) der Therapie sowie von gesunden Kontaktpersonen ( $n = 132$ ). Abgebildet sind der Median sowie die 25ste und 75ste Perzentile (*Box*), die fünfte und 95ste Perzentile (*Whiskers*) und die Ausreißer (schwarze Punkte), jeweils für weibliche (weiße Kästen) und männliche (schraffierte Kästen) Probanden getrennt. Es erfolgte der *Mann-Whitney-U-Test* zum Vergleich der einzelnen Gruppen und der Geschlechterunterschiede. Die gepaarten Daten im Zeitverlauf wurden mit dem *Wilcoxon-Signed-Rank-Test* analysiert. Die entsprechenden p-Werte sind in der Grafik angegeben.

### 3.1.3 Keine Korrelation zwischen der Plasmakonzentration des löslichen Interleukin-2- und löslichen Interleukin-7-Rezeptors bei Tuberkulosepatienten

Um zu überprüfen, ob eine Korrelation zwischen den erhobenen sIL-7R $\alpha$ - und sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen bei Tb-Patienten und ihren Kontaktpersonen vorliegt, wurden die Konzentrationen für Tb-Patienten und Kontaktpersonen jeweils in einem Punktdiagramm aufgetragen (Abb. 11).



**Abb. 11: Korrelation der sIL-2R $\alpha$ - und sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen.**

(a) Plasmakonzentrationen des löslichen Interleukin (IL)-2-Rezeptors Alpha (sIL-2 $\alpha$ ) im Vergleich zu Plasmakonzentrationen des löslichen IL-7-Rezeptors Alpha (sIL-7R $\alpha$ ) vor Therapieeinleitung bei Tuberkulose (Tb)-Patienten (n=47). (b) Plasmakonzentrationen des sIL-2 $\alpha$  im Vergleich zu Plasmakonzentrationen des sIL-7R $\alpha$  bei gesunden Kontaktpersonen (n=132). Angegeben sind jeweils der Korrelationskoeffizient (rho) und der p-Wert für die Rangkorrelation nach Spearman. Zur Orientierung sind lineare Regressionslinien mit abgebildet.

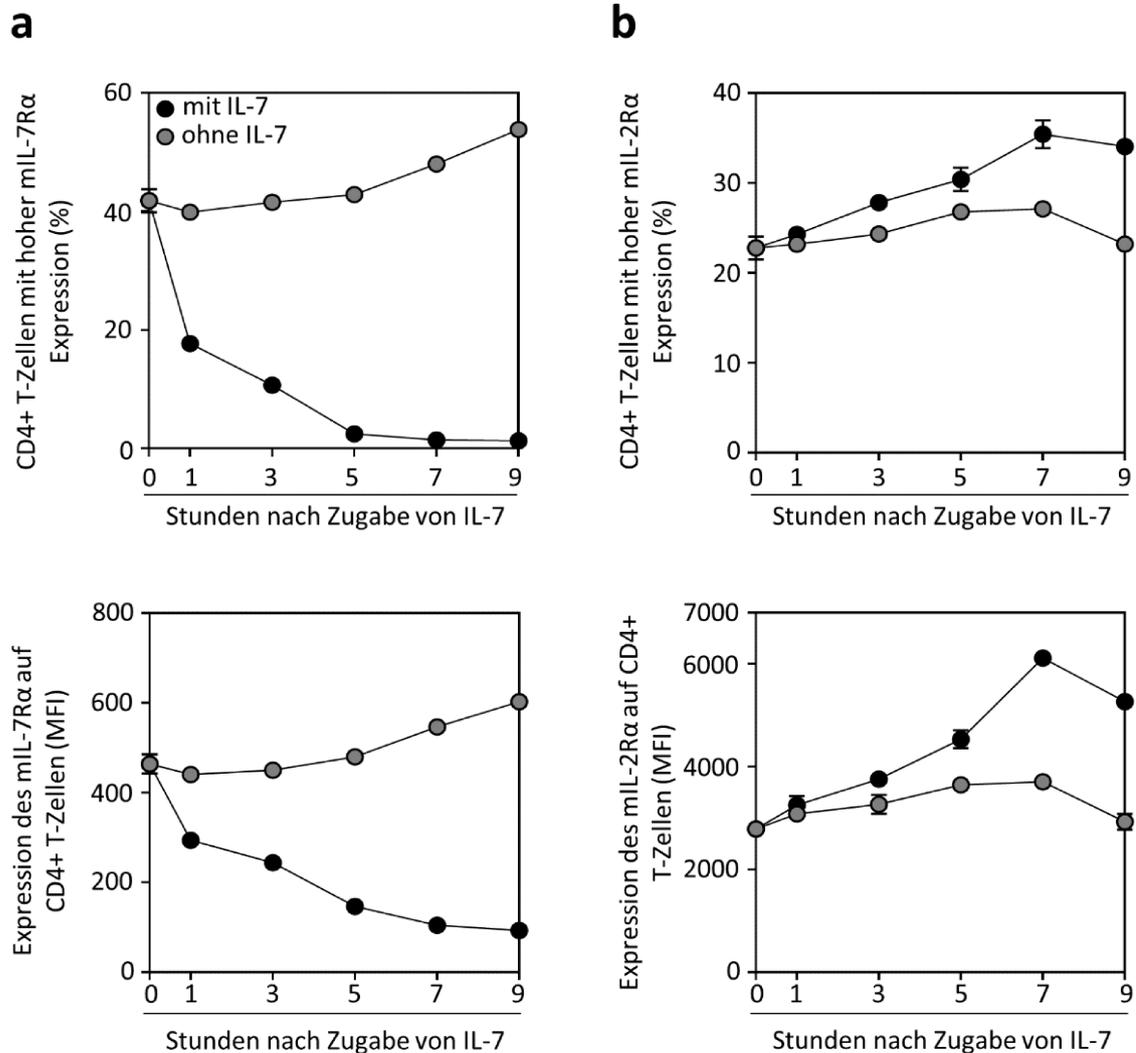
Betrachtet man die sIL-2R $\alpha$ - und die sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen der Tb-Patienten, so kann eine Korrelation der Konzentrationen ausgeschlossen werden (rho=-0,03; p=0,82). Bei den Kontaktpersonen hingegen zeigt sich eine leichtgradige, statistisch signifikante Korrelation der Plasmakonzentrationen von sIL-2R $\alpha$  und sIL-7R $\alpha$  (rho=-0,23; p<0,01).

## 3.2 Die Rolle von IL-7 in der T-Zellaktivierung

Dass IL-7 in der Pathogenese der Tb eine Rolle spielen könnte, wird schon länger vermutet. In Tiermodellen verbessert eine IL-7-Substitution die Immunantwort auf die Tb [50]. Für diese Immunantwort spielen Zytokine eine entscheidende Rolle [18-21, 23-29]. Besonders multifunktionale T-Zellen scheinen einen Einfluss auf die Immunität zu haben [47-49]. Wir untersuchten daher welchen Einfluss IL-7

auf die T-Zellaktivierung, auf die Expression von Zytokinen und auf die Ausbildung multifunktionaler T-Zellen hat.

### 3.2.1 Internalisierung des mIL-7R $\alpha$ und gesteigerte Expression des mIL-2R $\alpha$ während der Inkubation mit IL-7



**Abb. 12: mIL-7R $\alpha$ - und mIL-2R $\alpha$ -Expression während der Inkubation mit IL-7.**

Die Diagramme zeigen die Expression des membrangebundenen Interleukin (IL)-7-Rezeptors Alpha (mIL-7R $\alpha$ ) und des membrangebundenen IL-2-Rezeptors (mIL-2R $\alpha$ ) auf CD4+ T-Zellen eines exemplarischen Zeitverlaufs (n=3) während der Inkubation mit IL-7 (schwarze Kreise) oder ohne IL-7 (graue Kreise). Abgebildet sind zu jedem Zeitpunkt die Mittelwerte aus zwei Messungen und die Standardabweichungen. (a) Prozentualer Anteil der CD4+ T-Zellen mit hoher Expression des mIL-7R $\alpha$  (obere Abbildung) und Expression des mIL-7R $\alpha$  auf CD4+ T-Zellen, dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) (untere Abbildung). (b) Prozentualer Anteil der CD4+ T-Zellen mit hoher Expression des mIL-2R $\alpha$  (obere Abbildung) und Expression des mIL-2R $\alpha$  auf CD4+ T-Zellen, dargestellt als MFI (untere Abbildung).

Zur Bestimmung des Effektes von IL-7 auf die T-Zellaktivierung untersuchten wir aufgereinigte T-Zellen aus Blutproben von gesunden Probanden (n=3). Zunächst inkubierten wir die T-Zellen mit IL-7 und führten serielle Messungen der

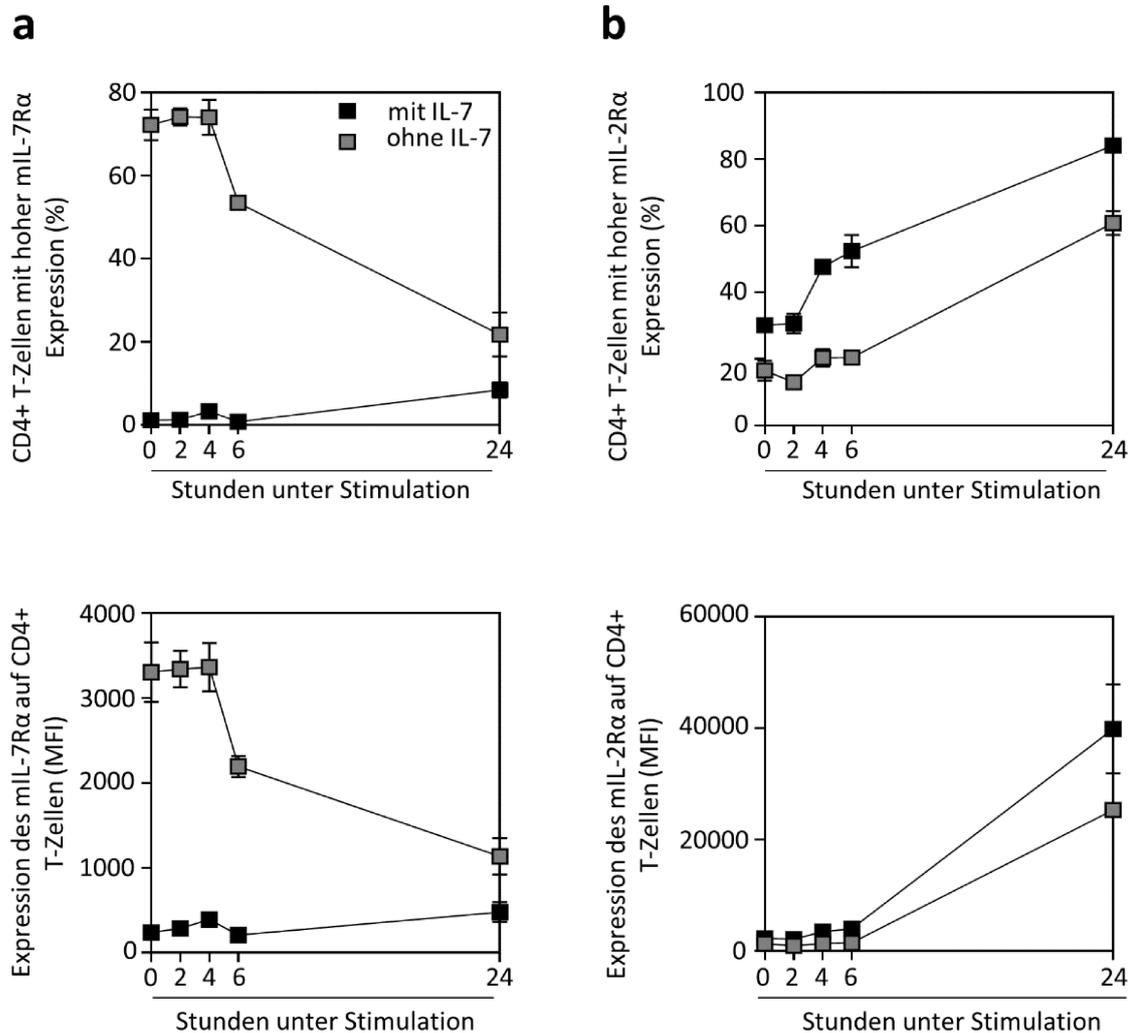
Oberflächenantigene durch. Es zeigte sich, dass die Expression des mL-7R $\alpha$  auf der Oberfläche von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die Inkubation mit IL-7 bereits nach einer Stunde etwa halbiert war. Bekanntermaßen beruht dieser Effekt auf einer Internalisierung des mL-7R $\alpha$  und auf der Inhibition der Transkription des Rezeptors [101]. Im weiteren zeitlichen Verlauf verringerte sich die Expression weiter und blieb dann konstant niedrig (Abb. 12 (a)).

Die Expression des mL-2R $\alpha$  wurde durch die Inkubation mit IL-7 hingegen gesteigert, wobei dieser Effekt tendenziell zeitlich später einzusetzen schien als die mL-7R $\alpha$ -Internalisierung. Dies zeigte sich sowohl bei der Betrachtung der prozentualen Anteile von Zellen mit hoher mL-7R $\alpha$  Expression als auch bei der Ermittlung der mittleren Fluoreszenzintensität (Abb. 12 (b)).

### **3.2.2 Stärkere Expression des mL-2R $\alpha$ und der Aktivierungsmarker nach IL-7-Vorinkubation und anschließender Stimulation**

Um den Effekt von IL-7 auf die T-Zellstimulation zu untersuchen, stimulierten wir die aufgereinigten und mit IL-7 vorinkubierten T-Zellen mit anti-CD3/CD28 kodierten *Dynabeads*. Dieser Stimulus imitiert eine starke T-Zellaktivierung mit Kostimulation über CD28. Durch die Zugabe des Stimulus kam es zu einer Aktivierung der T-Zellen und dadurch zu einer Abnahme der Expression des mL-7R $\alpha$  auf den nicht mit IL-7 vorinkubierten Zellen. Auf den mit IL-7 vorinkubierten Zellen war der mL-7R $\alpha$  bereits sehr niedrig exprimiert. Im zeitlichen Verlauf der Stimulation blieb bei diesen Zellen die Expression auf einem niedrigen Niveau und stieg tendenziell mit der Zeit etwas an (Abb. 13 (a)).

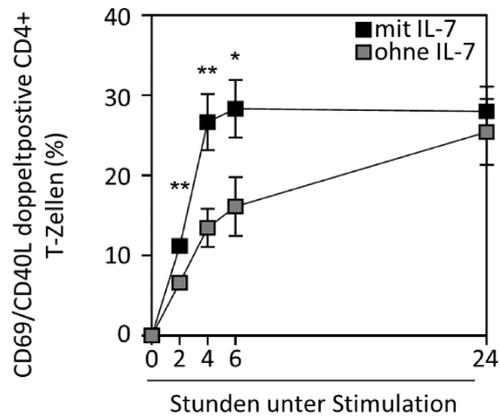
Der mL-2R $\alpha$  kann als Maß für die Aktivierung von T-Zellen verwendet werden. Er war auf den mit IL-7 vorinkubierten Zellen bereits vor der Stimulation stärker exprimiert und die Expression nahm während des zeitlichen Verlaufs der Stimulation weiter zu. Auch bei den nicht mit IL-7 vorinkubierten Zellen kam es erwartungsgemäß zu einem Anstieg der mL-2R $\alpha$ -Expression. Allerdings war dieser weniger stark ausgeprägt als bei den mit IL-7 behandelten Zellen (Abb. 13 (b)).



**Abb. 13: mL-7R $\alpha$ - und mL-2R $\alpha$ -Expression nach Inkubation mit IL-7 und anschließender Stimulation.**

Die Diagramme zeigen die Expression des membrangebundenen Interleukin (IL)-7-Rezeptors Alpha (mL-7R $\alpha$ ) und des membrangebundenen IL-2-Rezeptors Alpha (mL-2R $\alpha$ ) auf CD4+ T-Zellen in einem exemplarischen Zeitverlauf eines Probanden (n=3) nach zwölfstündiger Vorinkubation mit IL-7 (schwarze Kästen) oder ohne IL-7 (graue Kästen) und anschließender Stimulation mit anti-CD3/CD28. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Messungen und die Standardabweichungen. (a) Prozentualer Anteil der CD4+ T-Zellen mit hoher Expression des mL-7R $\alpha$  (obere Abbildung) und Expression des mL-7R $\alpha$  auf CD4+ T-Zellen, dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) (untere Abbildung). (b) Prozentualer Anteil der CD4+ T-Zellen mit hoher Expression des mL-2R $\alpha$  (obere Abbildung) und Expression des mL-2R $\alpha$  auf CD4+ T-Zellen, dargestellt als MFI (untere Abbildung).

Neben dem mIL-7R $\alpha$  und dem mIL-2R $\alpha$  untersuchten wir zusätzlich die Expression von CD40L und CD69 auf der Oberfläche der T-Zellen nach Zugabe des Stimulus. Bei beiden Oberflächenmolekülen handelt es sich um etablierte



**Abb. 14: Expression der Aktivitätsmarker CD40L/CD69 in Abhängigkeit von IL-7.**

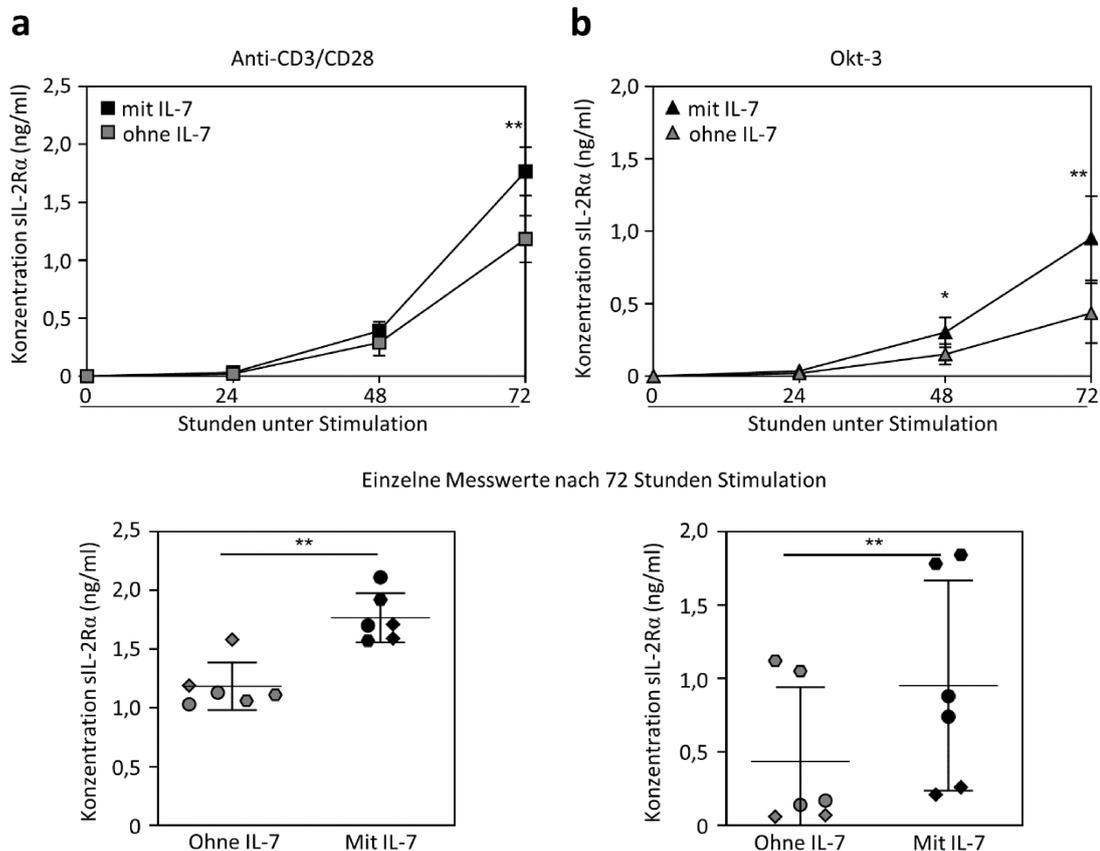
Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil CD69 und CD40L doppelpositiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Zeitverlauf nach zwölfstündiger Vorinkubation mit Interleukin (IL)-7 (schwarze Kästen) oder ohne IL-7 (graue Kästen) und anschließender Stimulation mit anti-CD3/CD28. Der Graph zeigt gemittelte Werte von drei Probanden mit Standardabweichungen. Werte der gepaarten T-Tests der einzelnen Zeitpunkte sind angegeben als \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$ .

Marker für die T-Zellaktivierung [15-17]. Sie werden bei naiven Zellen kaum exprimiert, können nach einer TCR-Stimulation aber vermehrt nachgewiesen werden. Durch den Anteil der Zellen, die CD40L/CD69 koexprimieren, kann somit der Anteil an aktivierten Zellen geschätzt werden. In unseren Versuchen kam es durch die alleinige Kultivierung der T-Zellen mit IL-7 zu keinem veränderten Expressionsmuster (nicht dargestellt). Dagegen zeigten die Zellen, die mit IL-7 vorinkubiert und anschließend mit einem TCR-Stimulus stimuliert wurden, einen höheren Anteil an CD40L/CD69 doppelpositiven T-Zellen im Vergleich zu den Zellen, die nicht mit IL-7 vorinkubiert wurden (Abb. 14). Durch die

Zugabe von IL-7 kommt es somit zu einer stärkeren Aktivierung der T-Zellen, gemessen an der CD40L/CD69-Expression.

### 3.2.3 IL-7 steigert die Produktion von sIL-2R $\alpha$

Bekanntermaßen wird der sIL-2R $\alpha$  durch eine T-Zellaktivierung vermehrt sezerniert [36, 37]. Wir untersuchten daher, ob IL-7 einen Einfluss auf die Abgabe des sIL-2R $\alpha$  hat. Es zeigte sich, dass es durch die Vorinkubation mit IL-7 es zu einer vermehrten Sezernierung von sIL-2R $\alpha$  in den Zellüberstand kam. Dies war sowohl mit dem anti-CD3/CD28 (Abb. 15 (a)) als auch mit dem anti-CD3 (Abb. 15 (b)) Stimulus nachweisbar. Betrachtet man die in Abbildung 15 unten dargestellten einzelnen Messwerte der Probanden nach 72 Stunden Stimulation, zeigt sich für jeden einzelnen Probanden höhere sIL-2R $\alpha$ -Konzentrationen durch die IL7-Vorinkubation. Daneben untersuchten wir im gleichen Ansatz auch die



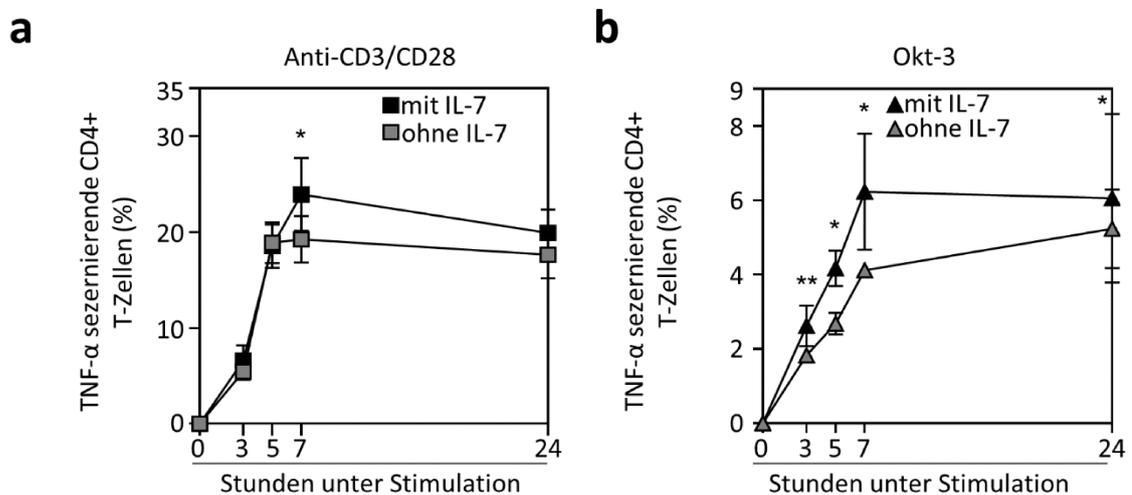
**Abb. 15: Einfluss der IL-7-Vorinkubation auf die Sezernierung von sIL-2R $\alpha$  durch T-Zellen.**

Dargestellt ist die Konzentration des löslichen Interleukin (IL)-2-Rezeptors Alpha (sIL-2R $\alpha$ ) in Überständen von T-Zellkulturen nach zwölfstündiger Vorinkubation mit IL-7 (schwarze Symbole) oder ohne IL-7 (graue Symbole) und anschließender Stimulation mit anti-CD3/CD28 (a) oder Okt-3 (b) über 72 Stunden. Oben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung (n=3) zu verschiedenen Zeitpunkten der Stimulation abgebildet. Unten sind die Messungen der einzelnen Probanden nach 72 Stunden Stimulation aufgetragen. Die einzelnen Symbole (Kreise, Dreiecke, Kasten) stehen für je einen Probanden, jeweils gemessen als Duplikat. Auch hier ist der Mittelwert aller Messungen und die Standardabweichung (Linien) aufgetragen. Messungen des löslichen IL-7-Rezeptors Alpha lagen zu allen Messzeitpunkten unter der Nachweisgrenze des Assays. Werte der gepaarten T-Tests der einzelnen Zeitpunkte sind angegeben als \*p<0,05 und \*\*p<0,01.

sIL-7R $\alpha$ -Konzentration. Der sIL-7R $\alpha$  ließ sich allerdings in keiner unserer untersuchten T-Zellkulturen nachweisen (nicht dargestellt).

### 3.2.4 Gesteigerte Zytokinproduktion durch IL-7-Vorinkubation

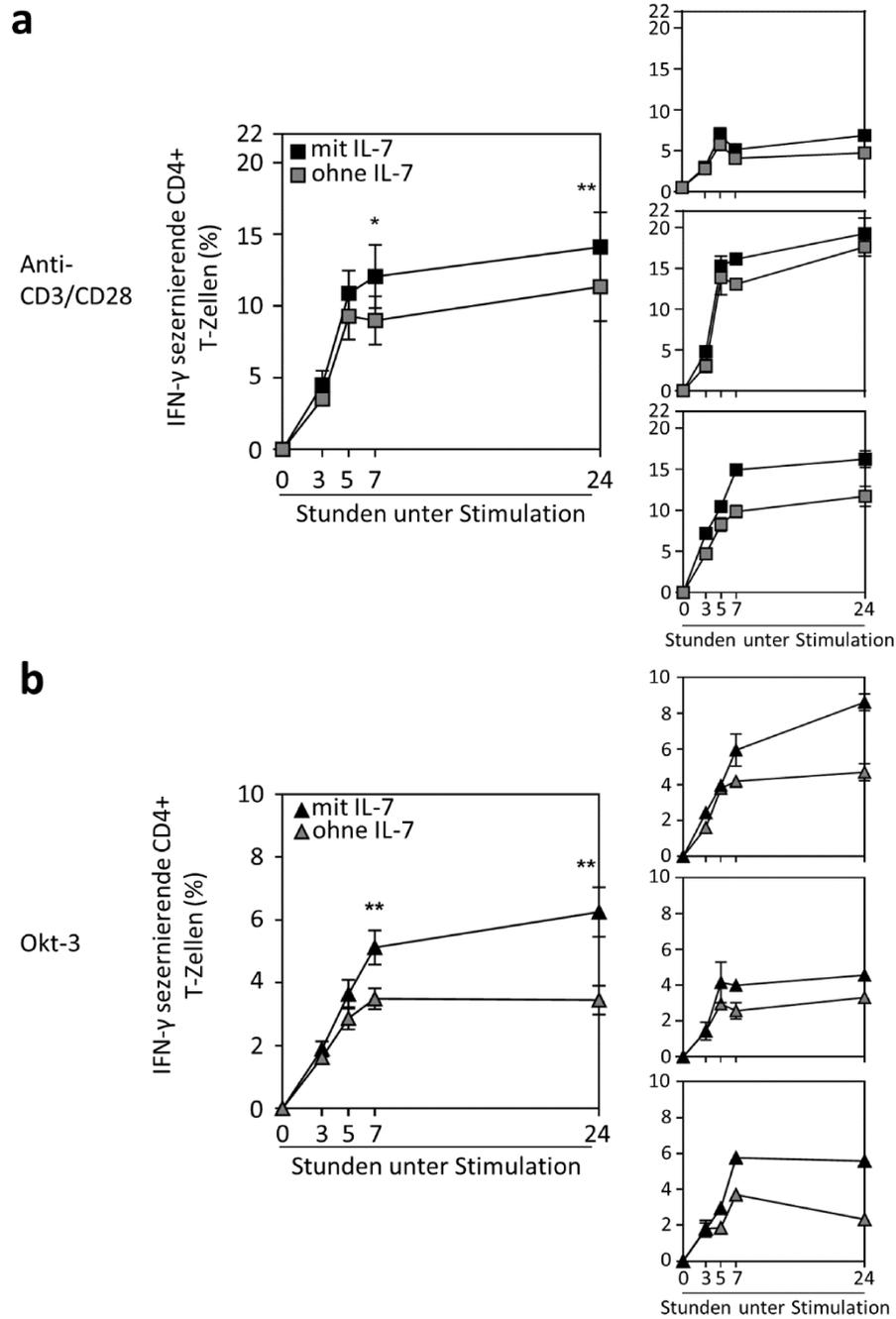
TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2 sind in der Immunantwort auf die Tb wichtige Zytokine [18-21, 23-29]. Wir untersuchten daher die Produktion dieser Botenstoffe in Abhängigkeit von IL-7 während einer starken T-Zellstimulation ausgelöst durch anti-CD3/CD28-markierte *Beads* und einer Stimulation durch Antikörper gegen CD3 aus Überständen der Okt-3-Zelllinie. Aufgereinigte CD4+ T-Zellen von drei gesunden Probanden wurden für zwölf Stunden mit IL-7 inkubiert und im Anschluss stimuliert.



**Abb. 16: TNF- $\alpha$ -Expression nach Vorinkubation mit IL-7 und anschließender Stimulation.** Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil an Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- $\alpha$ )-sezernierenden CD4+ T-Zellen, die nach zwölfstündiger Vorinkubation mit Interleukin (IL)-7 (schwarze Symbole) oder ohne IL-7 (graue Symbole) mit (a) anti-CD3/CD28 Antikörpern (Quadrate) oder (b) Okt-3 (Dreiecke) stimuliert wurden. Die Graphen zeigen gemittelte Werte von drei Probanden mit Standardabweichungen. Werte der gepaarten T-Tests der einzelnen Zeitpunkte sind angegeben als \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$ .

Betrachtet man die Expression von TNF- $\alpha$  im Zeitverlauf, zeigt sich, dass vor allem bei der schwächeren Stimulation mit Okt-3 ein Einfluss von IL-7 zu beobachten war und es zu einer stärkeren Sezernierung des Zytokins kam, wenn die Zellen zunächst mit IL-7 inkubiert wurden (Abb. 16 (b)). Bei der Stimulation der T-Zellen mit anti-CD3/CD28 war hingegen lediglich nach sieben Stunden Stimulation ein signifikanter Unterschied festzustellen und zu den anderen

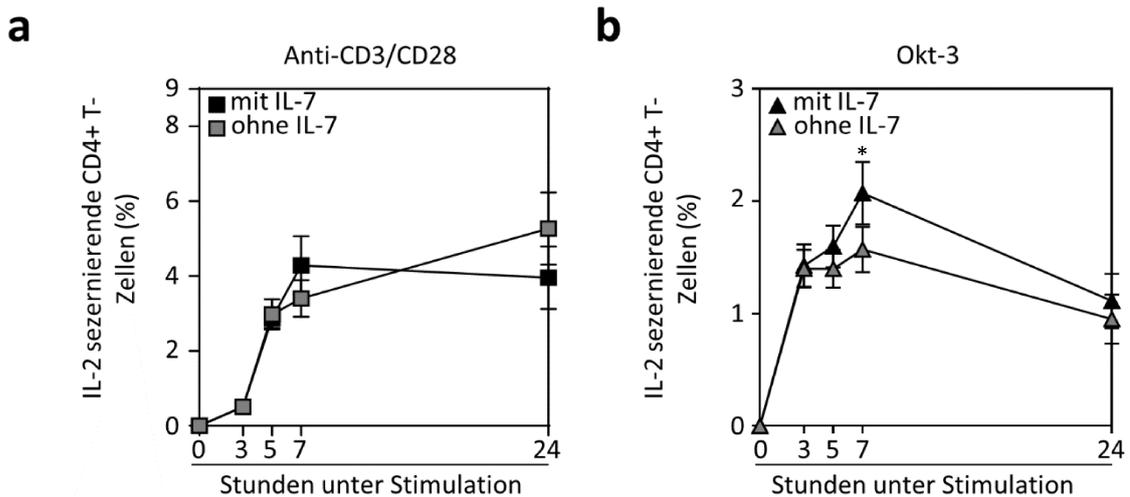
Zeitpunkten allenfalls ein Trend zu einer stärkeren Expression von TNF- $\alpha$  durch die IL-7-Vorinkubation erkennbar (Abb. 16 (a)).



**Abb. 17: IFN- $\gamma$ -Expression nach Vorinkubation mit IL-7 und anschließender Stimulation.**

Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil an Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ )-sezernierenden CD4+ T-Zellen, die nach zwölfstündiger Vorinkubation mit Interleukin (IL)-7 (schwarze Symbole) oder ohne IL-7 (graue Symbole) mit anti-CD3/CD28-Antikörpern (Kasten; obere Graphen) oder Okt-3 (Dreiecke; untere Graphen) stimuliert wurden. Die großen Graphen links zeigen gemittelte Werte von drei Probanden mit Standardabweichungen, die kleinen Graphen rechts die Mittelwerte aus zwei Messungen der einzelnen Probanden mit Standardabweichungen. Werte der gepaarten T-Tests der einzelnen Zeitpunkte sind angegeben als \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$ .

Einen größeren Einfluss als auf die TNF- $\alpha$ -Sekretion hatte IL-7 in unseren Versuchen bei der IFN- $\gamma$ -Expression der T-Zellen. Wie auch bei der TNF- $\alpha$ -Sekretion war der Effekt von IL-7 auf die IFN- $\gamma$ -Sekretion stärker, wenn man die Stimulation mit Okt-3 betrachtete (Abb. 17 (b)). Allerdings war auch bei der Stimulation mit anti-CD3/CD28 eine vermehrte IFN- $\gamma$ -Produktion der mit IL-7 vorinkubierten Zellen zu beobachten (Abb. 17 (a)).



**Abb. 18: IL-2-Expression nach Vorinkubation mit IL-7 und anschließender Stimulation.**

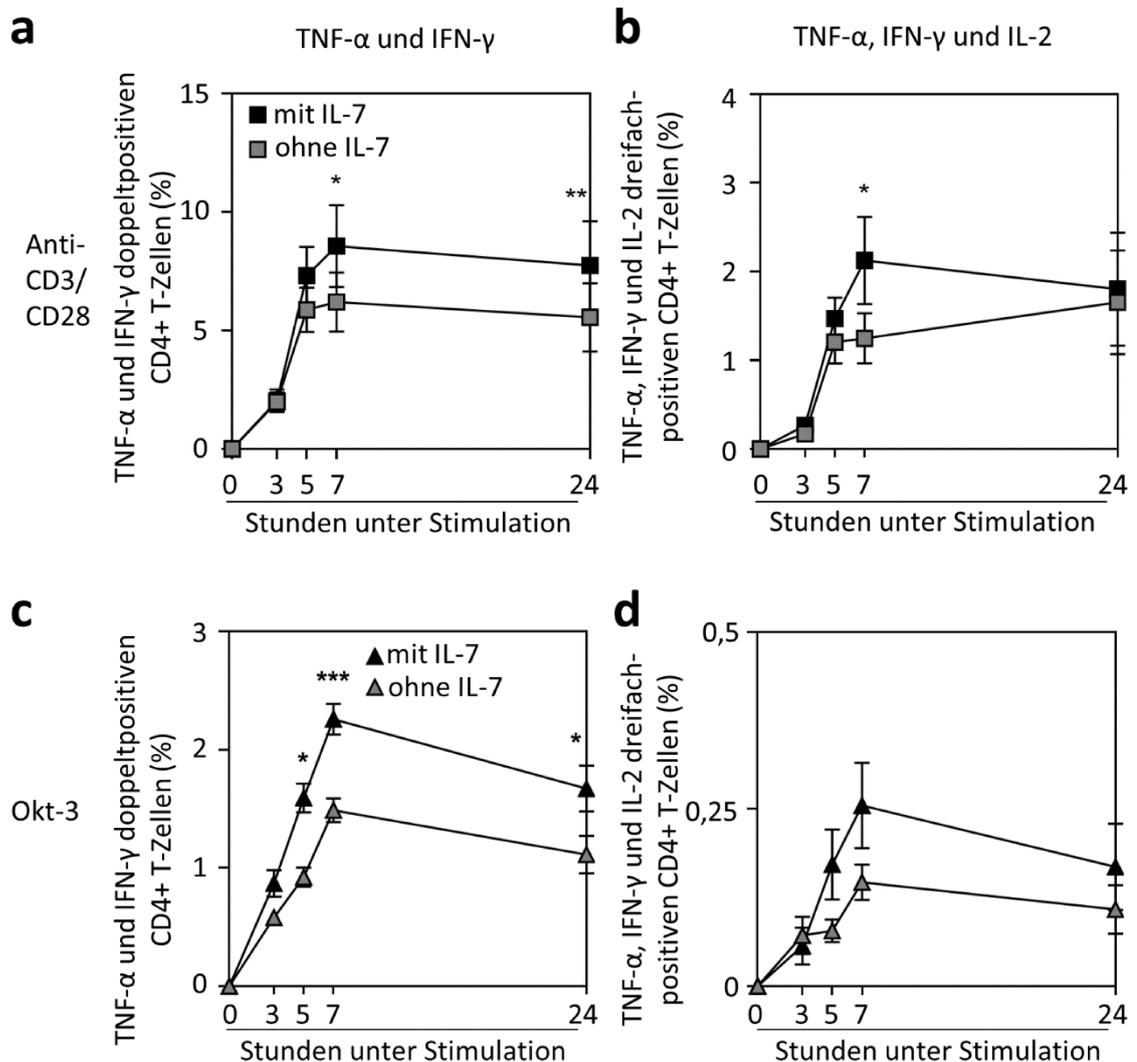
Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil an Interleukin (IL)-2-sezernierenden CD4+ T-Zellen, die nach zwölfstündiger Vorinkubation mit IL-7 (schwarze Symbole) oder ohne IL-7 (graue Symbole) mit (a) anti-CD3/CD28-Antikörpern (Kasten) oder (b) Okt-3 (Dreiecke) stimuliert wurden. Die Graphen zeigen gemittelte Werte von drei Probanden mit Standardabweichungen. Werte der gepaarten T-Tests der einzelnen Zeitpunkte sind angegeben als \* $p < 0,05$ .

Daneben untersuchten wir auch die Sezernierung von IL-2. Anders als in der Literatur beschrieben, zeigte sich hier kein eindeutiger Einfluss der IL-7-Vorinkubation auf die spätere IL-2-Expression. Ein Unterschied zwischen IL-7 vorinkubierten Zellen und Zellen in einem IL-7-freien Medium ließ sich mit einem starken Stimulus nicht nachweisen (Abb. 18 (a)). Und auch mit einem schwächeren Stimulus (Abb. 18 (b)) war der Effekt von IL-7 nur schwach ausgeprägt und erlangte nur zu einem Zeitpunkt nach sieben Stunden Stimulation statistische Signifikanz.

### 3.2.5 IL-7-Vorinkubation führt zu vermehrter Anzahl an T-Zellen, die zwei oder mehr Zytokine produzieren

Da multifunktionale T-Zellen, die mehrere Zytokine parallel sezernieren, mit einer besseren Immunantwort auf Tb assoziiert werden [47-49], untersuchten wir inwieweit die IL-7-Vorinkubation Einfluss auf den Anteil dieser doppelt- oder

dreifachpositiven Zellen hat (Abb. 19). Tatsächlich zeigte sich, dass durch die IL-7-Vorinkubation der Anteil der T-Zellen, die TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  parallel sezernierten, sowohl durch anti-CD3/CD28-Stimulation (Abb. 19 (a)) als auch durch die Stimulation mit Okt-3 (Abb. 19 (c)) zunahm.



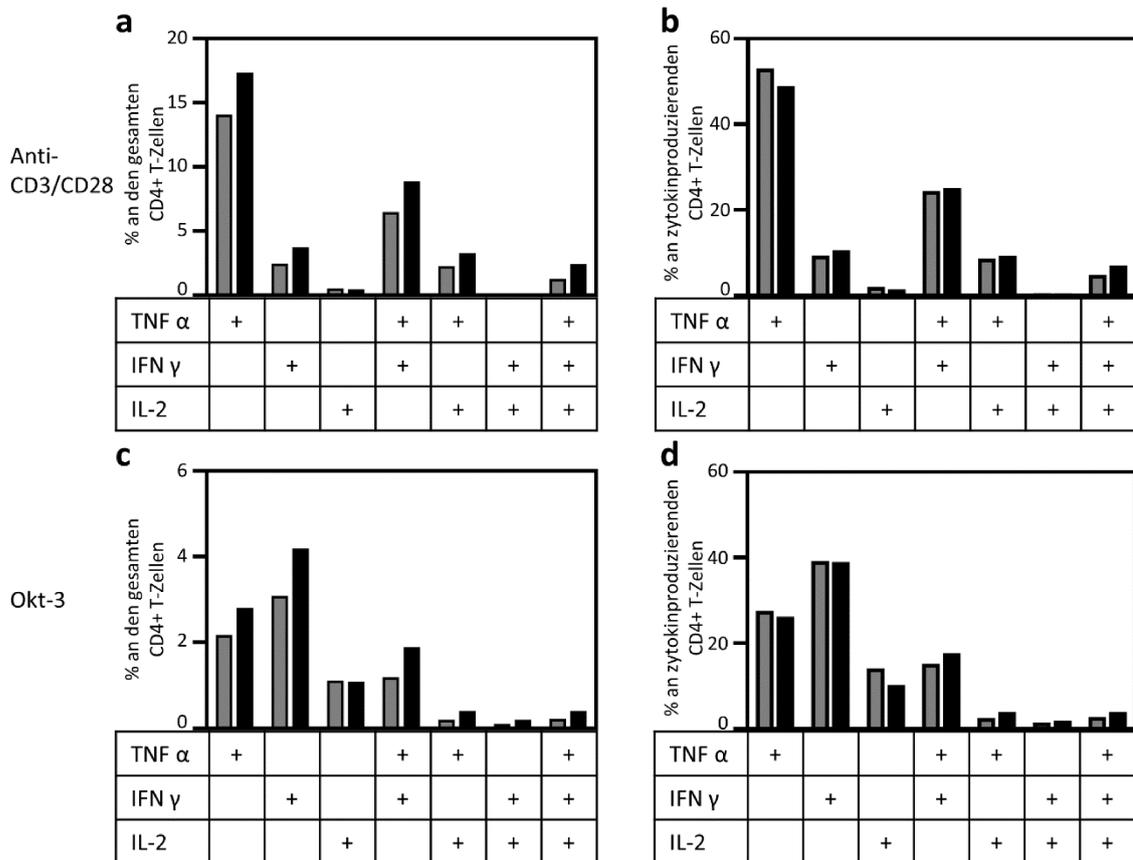
**Abb. 19: Multifunktionale T-Zellen in Abhängigkeit der IL-7-Vorinkubation.**

(a-d) Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil an CD4+ T-Zellen, die Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) (a, c) oder TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und Interleukin 2 (IL-2) (b, d) parallel sezernieren. Die Stimulation erfolgte nach zwölfstündiger Vorinkubation mit Interleukin 7 (IL-7) (schwarze Symbole) oder ohne IL-7 (graue Symbole) mit anti-CD3/CD28-Antikörpern (Kasten; obere Reihe; a, b) oder Okt-3 (Dreiecke; untere Reihe; c, d). Die Graphen zeigen gemittelte Werte von drei Probanden mit Standardabweichungen. Werte der gepaarten T-Tests der einzelnen Zeitpunkte sind angegeben als \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$ .

Auch der Anteil von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 dreifachpositiven T-Zellen wurde durch eine IL-7-Vorinkubation geringgradig gesteigert (Abb. 19 (b) und (d)), wobei der Unterschied im Zeitverlauf nur durch den starken Stimulus und nur zu einem Zeitpunkt statistische Signifikanz erreichte. Bei dem schwächeren Stimulus Okt-3 zeigte sich ein Trend ( $p = 0,064$ , nach fünf Stunden Stimulation) zu

einem höheren Anteil an dreifachpositiven Zellen, wobei der Anteil der mehrfachpositiven Zellen insgesamt sehr gering war.

In einem weiteren Schritt der Auswertung skizzierten wir das genaue Zytokinexpressionsmuster als prozentualen Anteil der für eine Zytokinkombination positiven T-Zellen an allen CD4+ T-Zellen (Abb. 20 (a) und (c)) und an allen zytokinproduzierenden CD4+ T-Zellen (Abb. 20 (b) und (d)).



**Abb. 20: Zytokinexpressionsmuster in Abhängigkeit von IL-7.**

Abgebildet ist das Expressionsmuster der CD4+ T-Zellen für die untersuchten Zytokine Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- $\alpha$ ), Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin (IL)-2 nach zwölfstündiger Vorinkubation mit IL-7 (schwarze Balken) oder ohne IL-7 (graue Balken) und anschließender siebenstündiger Stimulation mit anti-CD3/CD28-Antikörpern (a, b) oder Okt-3 (c, d) für einen beispielhaften Probanden. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der einzelnen T-Zellsubklassen an allen CD4+ T-Zellen (a, c) und an allen zytokinproduzierenden CD4+ T-Zellen (b, d)

Hier zeigte sich erneut, dass es bei der Stimulation der T-Zellen mit einem CD3/CD28-Stimulus oder Okt-3 in den meisten T-Zellzytokinsubklassen zu einer Zunahme der zytokinproduzierenden Zellen durch IL-7 kam. Wenn man aber den prozentualen Anteil der für die verschiedenen Kombinationen positiven T-Zellen an allen zytokinproduzierenden T-Zellen betrachtete, waren die Unterschiede zwischen IL-7-vorinkubierten Zellen und nicht vorinkubierten Zellen geringer.

Dies legt nahe, dass keine der verschiedenen zytokinproduzierenden Subpopulationen besonders stark auf IL-7 reagiert.

## **4 DISKUSSION**

### **4.1 Veränderungen des IL-7-/IL-7R-Systems in der Tb**

Bei unseren Untersuchungen des Blutplasmas von Tb-Patienten und ihren häuslichen Kontaktpersonen waren die sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen bei den Tb-Erkrankten vermindert und glichen sich während der Therapie wieder an die Plasmakonzentrationen der gesunden Kontaktpersonen an. Dabei zeigte sich, dass bei den Patienten, die zu Beginn der Erkrankung eine sehr niedrige sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentration aufwiesen, der anschließende Anstieg besonders stark ausfiel. Dies weist darauf hin, dass die Homöostase des sIL-7R $\alpha$  durch die Tb in unterschiedlichem Maße gestört wird und dadurch die Plasmakonzentrationen abfallen. Durch die Tb-Therapie scheint die Homöostase wiederhergestellt zu werden, sodass die Plasmakonzentrationen nach Abschluss der Therapie wieder den Konzentrationen der gesunden Kontaktpersonen gleichen. Diese Ergebnisse machen eine Regulierung oder Beeinflussung des IL-7-/IL-7R-Systems durch die Tb sehr wahrscheinlich.

Veränderungen der sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen sind bisher für mehrere Erkrankungen beschrieben und verschiedene Möglichkeiten einer Regulierung werden diskutiert. Rose et al. zeigten, dass der sIL-7R $\alpha$  als alternative Splicing-Variante des mL-7R $\alpha$  entsteht und somit aktiv sezerniert wird und nicht, wie ebenfalls denkbar, von der Oberfläche der Lymphozyten in das Plasma übergeht [109]. Die Transkription der mRNA des sIL-7R $\alpha$  wird interessanterweise genau wie die mRNA des membranständigen Rezeptors in peripheren T-Lymphozyten durch die Bindung von IL-7 an den mL-7R $\alpha$  inhibiert. In der Arbeit von Rose et al. wurden für Patienten mit einer chronischen HIV-Infektion deutlich erniedrigte sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen festgestellt [109]. Die IL-7-Plasmakonzentrationen hingegen scheinen typischerweise erhöht zu sein [108]. Als eine mögliche Erklärung für erniedrigte sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen bei HIV-Infektionen wurden daher erhöhte IL-7-Plasmakonzentrationen, die die Synthese des sIL-7R $\alpha$  inhibieren, diskutiert [109]. Da gezeigt werden konnte, dass die Produktion von IL-7 weitestgehend konstant ist und die

Plasmakonzentration von IL-7 eher durch den Verbrauch reguliert wird [67], ist eine mögliche Erklärung für die erhöhten IL-7-Plasmakonzentrationen bei HIV-Patienten eine verminderte Internalisierung von IL-7 durch eine geringere T-Zellzahl im Rahmen der häufig auftretenden Lymphozytopenie. Die hohen IL-7-Plasmakonzentrationen könnten durch eine vermehrte Internalisierung und eine verminderte Transkription zusätzlich die ebenfalls bei HIV-Infektionen beobachtete verminderte Expression des mIL-7R $\alpha$  erklären [108].

In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe in der gleichen Tb-Kohorte konnten wir zeigen, dass auch bei den Tb-Patienten die IL-7-Plasmakonzentration vor der Therapie im Vergleich zu ihren gesunden Kontaktpersonen erhöht waren und sich im Rahmen der Therapie wieder normalisierten. Dagegen war die Expression des mIL-7R $\alpha$  in der Tb-Kohorte im Vergleich zu den häuslichen Kontaktpersonen erniedrigt [1]. Eine Lymphozytopenie erscheint als Ursache für höhere IL-7-Plasmakonzentrationen in der Tb allerdings unwahrscheinlich, da in der Regel bei der Tb im Gegensatz zu HIV keine derart ausgeprägten Lymphozytopenien beobachtet werden [122]. Wahrscheinlicher ist, dass die erhöhten IL-7-Plasmakonzentrationen durch die erwähnte verminderte mIL-7R $\alpha$ -Expression bedingt werden [1]. Eine erniedrigte mIL-7R $\alpha$ -Expression auf T-Zellen ist auch mit chronisch viralen Infektionen, wie Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV), Cytomegalie-Virus (CMV) oder HIV, assoziiert [107, 108, 123]. Ursächlich hierfür könnte die permanente Stimulation der T-Zellen über den TCR sein, die zu einer langanhaltenden Internalisierung des mIL-7R $\alpha$  führt [103]. Dadurch wird weniger IL-7 konsumiert, was zu höheren IL-7-Plasmakonzentrationen führt. Die erhöhte IL-7-Konzentration wiederum hemmt, wie bereits beschrieben, die mIL-7R $\alpha$ - und sIL-7R $\alpha$ -Transkription und könnte deshalb in einer Art *Circulus vitiosus* die niedrige mIL-7R $\alpha$ -Expression und niedrige sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen bei chronischen Infektionen verstärken [103, 124, 125]. Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass sich in den Versuchen unserer Arbeitsgruppe in dem vorliegenden Tb-Kollektiv weder bei den Tb-Patienten noch bei den Kontaktpersonen eine Korrelation zwischen IL-7 und sIL-7R $\alpha$  feststellen ließ [1]. Somit scheint es unwahrscheinlich, dass für die veränderten sIL-7R $\alpha$ -Plasmaspiegel und mIL-7R $\alpha$ -Expressionen allein die veränderten IL-7-Konzentrationen verantwortlich sind. Weitere Einflüsse auf das IL-7-/IL-7R-

System sind anzunehmen und müssen in weiteren Untersuchungen adressiert werden.

Die genaue Funktion des sIL-7R $\alpha$  ist bisher nicht eindeutig geklärt. Crawley et al. zeigten, dass durch den sIL-7R $\alpha$  die IL-7-vermittelte T-Zellaktivierung inhibiert wird [112]. Dies erscheint nachvollziehbar, wenn man bedenkt, dass die Affinität des sIL-7R $\alpha$  vergleichbar mit der Affinität des mL-7R $\alpha$  ist und die Rezeptoren somit in Konkurrenz treten [112]. Lundstrom et al. demonstrierten allerdings, dass durch den sIL-7R $\alpha$  zwar zunächst die Bindung von IL-7 an den mL-7R $\alpha$  auf T-Zellen reduziert wird und dadurch die Aufnahme von IL-7 vermindert ist, im weiteren Verlauf aber das IL-7-vermittelte Überleben von T-Zellen durch sIL-7R $\alpha$  gesteigert wird [114]. Dies legt eine eher modulierende Funktion von sIL-7R $\alpha$  nahe. In Situationen mit hoher IL-7-Plasmakonzentration bindet viel IL-7 an den sIL-7R $\alpha$  und die Koaktivierung von T-Zellen sowie die Aufnahme von IL-7 in die T-Zelle wird zunächst reduziert. Dadurch kann auch eine übermäßige Stimulation von T-Zellen verhindert werden und der Mechanismus dient der Homöostase. In Situation mit verminderter IL-7-Plasmakonzentration wird hingegen vermehrt IL-7 durch den sIL-7R $\alpha$  freigesetzt, sodass das für die Proliferation und das Überleben von T-Zellen wichtige IL-7 weiterhin zur Verfügung steht. Dieses dauerhafte Angebot von IL-7 könnte insgesamt die T-Zellantwort auf Infektionen verbessern. Ein weiterer Mechanismus, der in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnte, ist die Verknappung eines kurzfristigen Überangebots an IL-7 durch die Bindung von IL-7 an sIL-7R $\alpha$  und somit die Vorbeugung der T-Zellerschöpfung.

Bei Autoimmunerkrankungen hingegen werden im Gegensatz zu Infektionserkrankungen eher erhöhte sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen festgestellt [114, 117, 118], sodass die übermäßige Sezernierung von sIL-7R $\alpha$  in einem Zusammenhang mit Autoimmunität zu stehen scheint. Ursächlich ist möglicherweise, dass das kontinuierliche Angebot an IL-7 eine Proliferation und Aktivierung autoreaktiver T-Zellen fördert [114]. Die bei chronischen Infektionen wie der Tb zu beobachtenden, erniedrigten sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen könnten hingegen Ursache oder Folge einer beeinträchtigten T-Zellantwort sein. Diese Frage gilt es in weiteren Arbeiten zu klären, um mögliche therapeutische Interventionen in Bezug auf die sIL-7R $\alpha$ /IL-7 Homöostase zu finden.

Daneben untersuchten wir auch, inwieweit die sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentration als diagnostisches Instrument in der Diagnosestellung der akuten Tb eingesetzt werden kann. Mit einer AUC von 0,67 in der ROC-Kurvenanalyse zeigt sIL-7R $\alpha$  allerdings nur eine mäßige Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen gesunden Kontaktpersonen und Tb-Erkrankten. Allerdings könnte die sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentration aufgrund ihrer Dynamik während der Therapie zum Therapie-*Monitoring* und zur Überwachung des Therapieerfolgs eingesetzt werden. Dies muss allerdings in einer dafür konzipierten Studie überprüft werden. Insbesondere muss geprüft werden, ob sIL-7R in der Lage ist, ein Therapieversagen anzuzeigen oder gar vorherzusagen.

## **4.2 Die Tb-Therapie verringert die Plasmakonzentration des Aktivitätsmarkers sIL-2R $\alpha$**

Der sIL-2R $\alpha$  ist für verschiedene Autoimmun- und Infektionserkrankungen ein klinisch validierter Entzündungsmarker, der zur Diagnosestellung und Therapiekontrolle eingesetzt wird. Er korreliert mit der T-Zellaktivierung [39]. Andere Autoren zeigten bereits, dass bei einer akuten Tb erhöhte sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen nachgewiesen werden können [40, 41]. Wir vermuteten daher, dass auch in unserer Tb-Kohorte die sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentration im Vergleich zu den häuslichen Kontaktpersonen erhöht ist. Anders als erwartet ließ sich jedoch kein Unterschied zwischen den sIL-2R $\alpha$ -Konzentrationen bei den mit Tb Infizierten und ihren häuslichen Kontaktpersonen erkennen. Mögliche Ursachen für diese unerwarteten Ergebnisse sind vielfältig. Shitrit et al. fanden bei Probanden mit einer latenten Tb erhöhte sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen. Die Höhe der Plasmakonzentration korrelierte hierbei mit der Reaktion der Probanden auf den Tuberkulin-Hauttest [42]. Die Kontaktpersonen in unserer Studie waren klinisch gesund. Allerdings wurden 19 der häuslichen Kontaktpersonen auf eine tuberkulinabhängige IFN- $\gamma$ -Ausschüttung untersucht, wovon 18 tatsächlich reagierten [120]. Somit scheint bei einem Großteil der Kontaktpersonen tatsächlich eine Tb-Immunantwort vorzuliegen, was mit einer vermehrten T-Zellaktivierung und damit höheren sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen einhergehen könnte. Auf der anderen Seite waren in einer Arbeit von Rajalingam et al. die sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen einer gesunden unabhängigen Kontrollgruppe vergleichbar mit den Konzentrationen

von gesunden häuslichen Kontaktpersonen. Die Tb-Patienten hatten in dieser Studie vergleichbare sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen, während die Kontrollgruppen jeweils niedrigere Plasmakonzentrationen als unsere Kontaktpersonen aufwiesen [126]. Auch andere Arbeiten bestätigen die Höhe der Plasmakonzentrationen von Infizierten und Kontrollgruppen [43]. Von verschiedenen Autoren wurde beschrieben, dass die sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen auch von verschiedenen Krankheitsstadien der Tb beeinflusst wird. Takahashi et al. beschreiben, dass bei Patienten mit einer Lungen-Tb die sIL-2R $\alpha$ -Konzentrationen bei ausgeprägten parenchymalen Läsionen oder pleuralem Befall höher sind als bei Patienten mit kleinen oder mittelgroßen Läsionen [127]. Diese klinischen Daten stehen uns für unsere Patienten allerdings nicht zur Verfügung, sodass hier keine weitere Subklassifizierung der Krankheitsaktivität vorgenommen werden kann.

Analog zu den vorherigen Ergebnissen anderer konnten auch wir einen Abfall der sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentration während der Tb-Therapie zeigen. Wie bereits durch Chan et al. beschrieben, verringern sich die sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen auch in unserer Studie erst in den späten Phasen der antituberkulösen Therapie [40].

Neben dem Infektionsstatus, Autoimmunerkrankungen und onkologischen Erkrankungen gibt es auch bei Gesunden verschiedene Einflussfaktoren auf die sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen. Dazu zählen unter anderem die Ethnie, das Alter oder der Raucherstatus [128, 129]. Für das Geschlecht konnte in bisherigen Arbeiten kein Einfluss auf die sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen festgestellt werden [129, 130]. Auch in unserer Arbeit unterscheiden sich die Plasmakonzentrationen der Kontrollgruppe nicht nach Geschlecht. Dahingegen scheint allerdings bei den Tb-Patienten ein vom Geschlecht abhängiger Unterschied vorzuliegen: weibliche Patienten zeigten eine höhere sIL-2R $\alpha$ -Plasmakonzentration. Da dies bisher in dieser Form allerdings weder für die Tb noch für andere Krankheitsbilder beschrieben wurde, sollte dieses Ergebnis in einem größeren Patientenkollektiv überprüft werden.

Limitierend muss bei den Ergebnissen des sIL-2R $\alpha$ -CBA erwähnt werden, dass sowohl in der Gruppe der Patienten mit akuter Tb wie auch in der Gruppe der häuslichen Kontaktpersonen ca. ein Zehntel der Messwerte oberhalb des

Detektionsbereiches des Assays lagen. Da der Anteil in beiden Kohorten nahezu identisch ist, ist eine ausgeprägte Beeinflussung der Ergebnisse zwar unwahrscheinlich, allerdings werden in der Kohorte der Tb-Patienten dadurch die Probandenzahlen sehr klein, was die Aussagekraft der Ergebnisse einschränkt.

### **4.3 Die Bedeutung von IL-7 in der T-Zellaktivierung**

IL-7 spielt in der Aktivierung von T-Zellen eine wichtige Rolle. Es steigert die Proliferation, verlängert das Gesamtüberleben, ist für die Bildung für T-Gedächtniszellen notwendig und verbessert die antigenvermittelte Aktivierung von T-Zellen [71-76]. Wie in dieser Arbeit dargelegt, kommt es bei der Tb zu ausgeprägten Veränderungen des IL-7-/IL-7R $\alpha$  Systems. Darüber hinaus zeigten weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe eine Beeinträchtigung der IL-7-vermittelten Effekte auf die Aktivierung von T-Zellen [1]. Unser Ziel war es daher, den Einfluss von IL-7 auf die Aktivierung von CD4+ T-Zellen genauer zu beschreiben.

#### **4.3.1 Veränderung der Expression von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen durch IL-7 und die TCR-Stimulation**

Wie bereits durch andere Autoren beschrieben, kommt es auch in unseren Experimenten durch die Zugabe von IL-7 in eine T-Zellkultur zu einer verminderten Expression des mL-7R $\alpha$  [101-103, 131, 132]. Dieser Effekt tritt sehr schnell ein. Bereits nach der ersten Stunde der Inkubation mit IL-7 hat sich die Expression des mL-7R $\alpha$  auf der Zelloberfläche halbiert. Die Dynamik ist ein Hinweis darauf, dass diese frühe Reaktion der T-Zellen auf die Zugabe von IL-7 auf einer Internalisierung beruht, wie durch Henriques et al. beschrieben [101]. Des Weiteren trägt die ebenfalls beobachtete Reduktion der Transkription zur verminderten Expression des mL-7R $\alpha$  bei [102]. Dieser Mechanismus der raschen Reduktion wird in der Literatur als wichtiges Element in der T-Zellhomöostase gewertet. Das für das Überleben und die Proliferation von T-Zellen essenzielle, aber limitierte IL-7 kann so von möglichst vielen T-Zellen gemeinsam genutzt werden [101-103, 131, 132].

Im Gegensatz dazu tritt die durch einen TCR-Stimulus induzierte Abnahme der Expression des mL-7R $\alpha$  erst nach ca. sechs Stunden auf. Dies legt nahe, dass hier ein anderer Mechanismus zugrunde liegt. Alves et al. beschreiben, dass

durch eine TCR-Stimulation die Genexpression des mIL-7R $\alpha$  um das 50-fache reduziert wird, während die Genexpression durch IL-7 nur um das 10-fache vermindert ist [103]. Darüber hinaus berichtet die Arbeitsgruppe, dass die IL-7-induzierte Verminderung des mIL-7R $\alpha$  reversibel ist und die Sensitivität gegenüber IL-7 nicht beeinflusst. Die verringerte Expression durch einen TCR-Stimulus hingegen hielt über den Beobachtungszeitraum hinaus an, wodurch die IL-7-Signaltransduktion aufgehoben wird [103]. Unsere Arbeitsgruppe konnte hingegen zeigen, dass der mIL-7R $\alpha$  zwischen Tag drei und vier nach T-Zellrezeptoraktivierung auf der Oberfläche von T-Zellen reexprimiert wird [104].

Im Gegensatz zu der sehr schnellen Internalisierung des mIL-7R $\alpha$  kommt es erst zeitlich versetzt zu einer gesteigerten IL-7-abhängigen Expression des mIL-2R $\alpha$ . Eine gesteigerte Expression von mIL-2R $\alpha$  durch die Kultivierung von T-Zellen mit IL-7 wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben [90, 133, 134], allerdings nach unserem Wissen nicht in einem zeitlichen Verlauf dargestellt. Es zeigte sich, dass das Maximum der mIL-2R $\alpha$ -Expression ca. sieben Stunden nach Beginn der Kultivierung von T-Zellen mit IL-7 eintritt. Durch eine anschließende Stimulation der T-Zellen mit einem TCR-Stimulus kam es bei den mit IL-7 vorinkubierten T-Zellen zu einem wesentlich höheren Anteil an CD4 $^{+}$ /mIL-2R $\alpha^{+}$  T-Zellen im Vergleich zu den T-Zellkulturen ohne IL-7-Kostimulation. Diese T-Zelluntergruppe enthält unter anderem auch das regulatorische T-Zellkompartiment [135]. Da wir in unserer Arbeit das T $_{reg}$ -definierende Protein *Forkhead-Box-Protein P3* (FoxP3) nicht bestimmt haben, können wir die Anzahl an regulatorischen, reifen T-Zellen nicht quantifizieren. Inwieweit IL-7 tatsächlich eine Rolle in der Ausbildung von T $_{reg}$  spielt, ist umstritten. Zwar konnten andere Autoren zeigen, dass eine Inkubation von T-Zellen mit IL-7 zur Ausreifung einer geringen Population von CD4 $^{+}$ /mIL-2R $\alpha^{+}$ /FoxP3 $^{+}$  Zellen führen kann [136], jedoch kommt es auch bei mIL-7R $\alpha$ -*Knockout*-Mäusen zur Ausbildung von T $_{reg}$ , solange die IL-2-Signalkaskade nicht beeinträchtigt ist [30]. Inwieweit diese murinen Versuche auf den Menschen übertragbar sind, ist nicht geklärt. Es weist allerdings darauf hin, dass IL-7 für die Entwicklung von T $_{reg}$  nicht essenziell ist. Die hohe Expression von mIL-2R $\alpha$  legt eine gesteigerte Sensibilität der T-Zellen für IL-2-vermittelte Signale nahe. Interessanterweise sezernieren die aktivierten T-Zellen zusätzlich vermehrt IL-2, sodass ein autokriner *Feedback-loop* entsteht,

der in dieser frühen Phase der T-Zellaktivierung der Expansion und weiteren Kostimulation der Antigenreaktion dient.

#### **4.3.2 Eine verstärkte T-Zellaktivierung durch die IL-7-Vorinkubation führt zu einer gesteigerten Zytokinseznernierung**

IL-7 führt bekanntermaßen zu einer gesteigerten T-Zellaktivierung [90]. Wir nahmen daher an, dass IL-7 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von multifunktionalen T-Zellen spielen könnte, die mehrere Zytokine parallel sezernieren. Diese multifunktionalen Zellen werden in der Tb und anderen infektiösen Erkrankungen mit einer verbesserten Immunantwort assoziiert [44-46, 48, 49, 137, 138].

Wie in früheren Studien beschrieben, kam es auch in unseren Versuchen durch die Vorinkubation der T-Zellen mit IL-7 zu einer verstärkten T-Zellstimulation [90]. Dies zeigt sich in einem vermehrten Anteil an CD40L/CD69 doppelpositiven Zellen in den T-Zellkulturen, die mit IL-7 vorinkubiert wurden. CD69 und CD40L sind häufig verwendete Parameter, um den Anteil aktivierter T-Zellen zu bestimmen [15-17].

Auch der sIL-2R $\alpha$  wird mit der T-Zellaktivierung assoziiert und höhere Plasmakonzentrationen können bei verschiedenen Infektionen und Autoimmunerkrankungen beobachtet werden [39-43]. In unseren Versuchen konnten wir eine gesteigerte Sekretion des sIL-2R $\alpha$  in T-Zellkulturen, die mit IL7 stimuliert wurden, nachweisen. Dies spricht ebenfalls für eine gesteigerte T-Zellaktivierung durch IL-7 und wurde nach unserem Wissen in dieser Form noch nicht beschrieben. Daneben untersuchten wir auch die Konzentration des sIL-7R $\alpha$  in T-Zellkulturen. Dieser konnte zu keinem Zeitpunkt und mit keinem Stimulus nachgewiesen werden. Das spricht dafür, dass der sIL-7R $\alpha$  nicht durch eine T-Zellaktivierung in das Blutplasma übergeht und nicht mit der im Rahmen der T-Zellaktivierung und der IL-7-Kostimulation beobachteten erniedrigten Expression des mIL-7R $\alpha$  in Zusammenhang steht. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der sIL-7R $\alpha$  nicht durch *Shedding*, sondern durch eine im Vergleich zum mIL-7R $\alpha$  alternative Transkription und aktive Sekretion ins Blutplasma gelangt, wie durch Rose et al. beschrieben [109].

Eine verstärkte Aktivierung der T-Zellen zeigt sich auch, wenn man die Sezernierung von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 betrachtet. Es ist seit langem bekannt, dass durch eine IL-7-Kostimulation vermehrt Zytokine durch Th1-Zellen sezerniert werden. Morrissey et al. zeigten bereits 1989, dass durch die Zugabe von IL-7 während der *ex vivo*-T-Zellstimulation eine vermehrte IL-2-Sezernierung induziert wird [90]. Auch eine gesteigerte IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Expression wurde beschrieben [91]. Diese gesteigerte Expression der Zytokine konnten wir in unseren Versuchen weitestgehend imitieren. Sowohl für TNF- $\alpha$  als auch für IFN- $\gamma$  zeigte sich eine gesteigerte Sezernierung durch die IL-7-Vorinkubation. Der relative Unterschied in der Anzahl der zytokinsezernierenden Zellen war besonders deutlich, wenn der schwächere TCR/CD3-Stimulus Okt-3 verwendet wurde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine IL-7-Kostimulation besonders dann von Bedeutung ist, wenn keine Kostimulation über CD28 stattfindet oder wenn ein schwacher Antigenstimulus vorliegt. Dies erscheint naheliegend, wenn man die Rolle von IL-7 im Rahmen von Autoimmunerkrankungen bedenkt, bei denen körpereigene und dadurch schwächere Antigene als T-Zellstimulus fungieren [113-118]. Ob die IL-7-Kostimulation besonders im Rahmen einer schwächeren Stimulation von Bedeutung ist und ob dies bei Tb-Patienten von Bedeutung ist, wurde bisher nicht ausreichend adressiert und sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

In unseren Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass sich durch die Kostimulation der T-Zellen mit IL-7 der Anteil der IL-2/IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  dreifachpositiven Zellen und der Anteil der IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  doppelpositiven Zellen an allen CD4+ T-Zellen erhöht. Casey et al. zeigten, dass bei Probanden mit einer Tb-Infektion vor Beginn der Behandlung in erster Linie IFN- $\gamma$  einfachpositive T-Zellen vorliegen [44]. Während der Therapie kommt es dann zu einer Zunahme der IFN- $\gamma$ /IL-2 doppelpositiven T-Zellen, sodass diese bei den Patienten in der Therapiegruppe überwiegen. Auch die Probanden mit nachgewiesener LTBI wiesen einen höheren Anteil an IFN- $\gamma$ /IL-2 doppelpositiven T-Zellen im Vergleich zu den akut an Tb Erkrankten auf. [44]. Diese Ergebnisse konnten Caccamo et al. bestätigen [139]. Auch sie fanden bei Probanden mit LTBI einen höheren Anteil an IFN- $\gamma$ /IL-2 doppelpositiven T-Zellen im Vergleich zu den akut an Tb Erkrankten. Allerdings zeigten sie auch, dass wesentlich mehr Patienten mit einer akuten Tb-Infektion IFN- $\gamma$ /IL-2/TNF- $\alpha$  dreifachpositive T-Zellen entwickeln als

Probanden mit einer LTBI. Der Anteil der dreifachpositiven T-Zellen war in ihrer Arbeit während der Tb-Therapie regredient [139]. Dahingegen zeigten Harari et al. das genaue Gegenteil: Bei Tb-Infizierten waren in ihrer Arbeit deutlich weniger dreifachpositive T-Zellen nachweisbar als bei LTBI-Probanden. Dieser Anteil erhöhte sich während der Therapie [45]. Ein hoher Anteil an dreifachpositiven Zellen im Rahmen der akuten Tb-Infektion erscheint unwahrscheinlich, wenn man bedenkt, dass bei HIV-Infektionen diese dreifachpositiven T-Zellen von verschiedenen Autoren mit einer guten Immunantwort und ausbleibendem Progress assoziiert werden [48, 49]. Darüber hinaus werden durch neuere, effektive Impfstoffe gegen Tb oder auch Leishmanien genau diese polyfunktionale T-Zellen gebildet [46, 137, 138]. Darrah et al. zeigten des Weiteren, dass diese dreifachpositiven T-Zellen in der Lage sind, große Mengen an IFN- $\gamma$  zu produzieren [137]. Diese Evolution der T-Zellen von einfach positiven zu multifunktionalen T-Zellen scheint also ein wichtiger Mechanismus in der Reaktion auf verschiedene intrazelluläre und virale Erreger zu sein. Da in unserer Arbeit zumindest der absolute Anteil an multifunktionalen T-Zellen durch die Kostimulation mit IL-7 zunahm, ergeben sich zumindest Hinweise darauf, dass IL-7 die Bildung dieser multifunktionalen Zellen unterstützt. Wir postulieren daher, dass IL-7 in der Immunantwort auf die Tb eine wichtige Rolle spielen könnte. Allerdings deutet die normalisierte Auswertung des Anteils der einfach-, doppelt- oder dreifach zytokinproduzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Bezug auf alle zytokinproduzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht auf einen ausgeprägten Einfluss von IL-7 auf die zytokinproduzierenden T-Zellsubpopulationen hin. Somit scheint die angenommene Umverteilung von einfachpositiven T-Zellen zu mehrfachpositiven T-Zellen in unseren Versuchen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Vielmehr scheinen insgesamt mehr zytokinproduzierende T-Zellen vorzuliegen. Für eine abschließende Beurteilung sind daher weitere Untersuchungen notwendig.

Die ebenfalls mit einer guten Immunantwort assoziierten IFN- $\gamma$ /IL-2 doppelpositiven T-Zellen konnten wir in unseren Stimulationsversuchen nicht nachweisen. Daneben muss einschränkend hinzugefügt werden, dass insbesondere der Anteil der IFN- $\gamma$ /IL-2/TNF- $\alpha$  dreifachpositive T-Zellen im Verhältnis zu allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen sehr gering ist. Um zu überprüfen, ob IL-7 auch in der Lage ist, den Anteil an IFN- $\gamma$ /IL-2 doppelpositiven T-Zellen zu steigern und

eine Umverteilung von einfach- zu mehrfachpositiven T-Zellen induzieren kann, sollten daher in weiterführenden Arbeiten Restimulationsversuche mit verschiedenen Stimuli durchgeführt werden. Dies ist insbesondere deshalb interessant, da die IFN- $\gamma$ /IL-2 doppelpositiven und die IFN- $\gamma$ /IL-2/TNF- $\alpha$  dreifachpositive T-Zellen den T-Gedächtniszellen zugeordnet werden, die sich erst nach einem ersten Antigenkontakt bilden [138].

IL-7 führt also bei gesunden Probanden zu einer gesteigerten T-Zellaktivierung mit der Bildung von multifunktionalen T-Zellen. Bei Tb-Patienten hingegen legen weiterführende, bereits beschriebene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe nahe, dass bei der Tb die Sensibilität der T-Zellen gegenüber IL-7 beeinträchtigt ist. Dies zeigte sich dadurch, dass die IL-7-induzierte STAT5-Phosphorylierung bei Tb-Patienten im Vergleich zu den Kontaktpersonen reduziert ist und folglich auch die üblicherweise verstärkte Aktivierung und gesteigerte Sezernierung von IFN- $\gamma$  im Rahmen einer IL-7-Kostimulation bei Patienten mit Tb ausbleibt [1]. Somit scheint die beeinträchtigte IL-7-Signaltransduktion zu einer schlechteren Effektor-T-Zellreaktion zu führen und die Bildung multifunktionaler T-Gedächtniszellen zu beeinträchtigen.

#### **4.4 Schlussfolgerung**

Die in dieser Arbeit beschriebenen erniedrigten sIL-7R $\alpha$ -Plasmakonzentrationen bei Tb-Patienten legen in Zusammenschau mit den in weiterführenden Arbeiten festgestellten, erhöhten IL-7-Plasmakonzentrationen und der verminderten mL-7R $\alpha$ -Expression eine Beeinflussung des IL-7-/IL-7R-Systems im Rahmen einer Tb-Infektion nahe. Wir charakterisierten in dieser Arbeit darüber hinaus den verstärkenden Effekt von IL-7 auf die T-Zellaktivierung und die daraus resultierende vermehrte Zytokinsezernierung bei Gesunden. Insbesondere konnten wir zeigen, dass IL-7 die Bildung multifunktionaler T-Zellen unterstützen kann. Diese Zellen werden bei der Tb und anderen Infektionserkrankungen mit einer guten Immunantwort assoziiert. Zusammenfassend scheint in der Tb eine beeinträchtigte Reaktion der T-Zellen auf IL-7 mitverantwortlich für eine schlechtere Immunreaktion der Erkrankten zu sein. Diese Erkenntnisse liefern neue Ansätze für weitere klinische Untersuchungen und gegebenenfalls Ansatzpunkte für immunmodulatorische Therapieverfahren.

## 5 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

1. Lundtoft, C., et al., *Aberrant plasma IL-7 and soluble IL-7 receptor levels indicate impaired T-cell response to IL-7 in human tuberculosis*. PLoS Pathog, 2017. **13**(6): p. e1006425.
2. Herold, G., *Innere Medizin*. 2015. 411-412.
3. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2019*. 2019 November 17, 2019 Mai 5, 2020]; Available from: [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/).
4. Kaufmann, S.H.E., *How can immunology contribute to the control of tuberculosis?* Nature Reviews Immunology, 2001. **1**: p. 20.
5. Manabe, Y.C. and W.R. Bishai, *Latent Mycobacterium tuberculosis—persistence, patience, and winning by waiting*. Nature Medicine, 2000. **6**: p. 1327.
6. Walzl, G., et al., *Immunological biomarkers of tuberculosis*. Nature Reviews Immunology, 2011. **11**: p. 343.
7. Herbert Hof, R.D., *Medizinische Mikrobiologie 4. Auflage*. Duale Reihe. 2009.
8. Saito, S. and M. Nakano, *Nitric oxide production by peritoneal macrophages of Mycobacterium bovis BCG-infected or non-infected mice: regulatory role of T lymphocytes and cytokines*. J Leukoc Biol, 1996. **59**(6): p. 908-15.
9. R A Seder, a. and W.E. Paul, *Acquisition of Lymphokine-Producing Phenotype by CD4+ T Cells*. Annual Review of Immunology, 1994. **12**(1): p. 635-673.
10. Caza, T. and S. Landas, *Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 521957.
11. Brownlie, R.J. and R. Zamoyska, *T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(4): p. 257-69.
12. Acuto, O., V. Di Bartolo, and F. Michel, *Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(9): p. 699-712.
13. Chen, L. and D.B. Flies, *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(4): p. 227-42.
14. Rudd, C.E., A. Taylor, and H. Schneider, *CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 12-26.
15. Hara, T., et al., *Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens*. J Exp Med, 1986. **164**(6): p. 1988-2005.
16. Noelle, R.J., *CD40 and its ligand in host defense*. Immunity, 1996. **4**(5): p. 415-419.
17. Schoenberger, S.P., et al., *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40–CD40L interactions*. Nature, 1998. **393**(6684): p. 480-483.
18. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations*. Annual review of immunology, 2010. **28**: p. 445-489.
19. Gallegos, A.M., et al., *A Gamma Interferon Independent Mechanism of CD4 T Cell Mediated Control of M. tuberculosis Infection in vivo*. PLoS Pathogens, 2011. **7**(5): p. e1002052.
20. Castro, F., et al., *Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 847.
21. Green, A.M., R. DiFazio, and J.L. Flynn, *IFN-γ from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during Mycobacterium tuberculosis infection*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2013. **190**(1): p. 270-277.
22. Lighvani, A.A., et al., *T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15137-42.

23. Flynn, J.L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice*. *Immunity*, 1995. **2**(6): p. 561-72.
24. Wolfe, F., et al., *Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy*. *Arthritis & Rheumatism*, 2004. **50**(2): p. 372-379.
25. Mohan, V.P., et al., *Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology*. *Infect Immun*, 2001. **69**(3): p. 1847-55.
26. Bruns, H., et al., *Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis in humans*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2009. **119**(5): p. 1167-1177.
27. Smith, K., *Interleukin-2: inception, impact, and implications*. *Science*, 1988. **240**(4856): p. 1169-1176.
28. Cousens, L.P., J.S. Orange, and C.A. Biron, *Endogenous IL-2 contributes to T cell expansion and IFN-gamma production during lymphocytic choriomeningitis virus infection*. *J Immunol*, 1995. **155**(12): p. 5690-9.
29. Knoechel, B., et al., *Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2005. **202**(10): p. 1375-1386.
30. Bayer, A.L., et al., *A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells*. *J Immunol*, 2008. **181**(1): p. 225-34.
31. Williams, M.A., A.J. Tyznik, and M.J. Bevan, *Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells*. *Nature*, 2006. **441**: p. 890.
32. Amu, S., I. Gjertsson, and M. Brisslert, *Functional characterization of murine CD25 expressing B cells*. *Scand J Immunol*, 2010. **71**(4): p. 275-82.
33. Clausen, J., et al., *Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells*. *Immunobiology*, 2003. **207**(2): p. 85-93.
34. Simon, H.U., et al., *Interleukin-2 primes eosinophil degranulation in hypereosinophilia and Wells' syndrome*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(4): p. 834-9.
35. Letourneau, S., et al., *IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets*. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. **123**(4): p. 758-62.
36. Caruso, C., et al., *Biological significance of soluble IL-2 receptor*. *Mediators Inflamm*, 1993. **2**(1): p. 3-21.
37. Pedersen, A.E. and J.P. Lauritsen, *CD25 shedding by human natural occurring CD4+CD25+ regulatory T cells does not inhibit the action of IL-2*. *Scand J Immunol*, 2009. **70**(1): p. 40-3.
38. Lindqvist, C.A., et al., *T regulatory cells control T-cell proliferation partly by the release of soluble CD25 in patients with B-cell malignancies*. *Immunology*, 2010. **131**(3): p. 371-6.
39. Rubin, L.A. and D.L. Nelson, *The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application*. *Ann Intern Med*, 1990. **113**(8): p. 619-27.
40. Chan, C.H., et al., *Elevated interleukin-2 receptor level in patients with active pulmonary tuberculosis and the changes following anti-tuberculosis chemotherapy*. *Eur Respir J*, 1995. **8**(1): p. 70-3.
41. Avilés Inglés, M.J., et al., *Serum soluble interleukin-2 receptor: a useful indicator of the clinical course in pulmonary tuberculosis*. *Tuber Lung Dis*, 1995. **76**(2): p. 130-5.
42. Shitrit, D., et al., *Role of soluble interleukin-2 receptor levels in patients with latent tuberculosis*. *Lung*, 2006. **184**(1): p. 21-4.
43. Kart, L., et al., *Correlation of serum tumor necrosis factor-alpha, interleukin-4 and soluble interleukin-2 receptor levels with radiologic and clinical manifestations in active pulmonary tuberculosis*. *Mediators Inflamm*, 2003. **12**(1): p. 9-14.

44. Casey, R., et al., *Enumeration of Functional T-Cell Subsets by Fluorescence-Immunospot Defines Signatures of Pathogen Burden in Tuberculosis*. PLoS ONE, 2010. **5**(12): p. e15619.
45. Harari, A., et al., *Dominant TNF- $\alpha$  Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease*. Nature Medicine, 2011. **17**: p. 372.
46. Beveridge, N.E.R., et al., *Immunisation with BCG and recombinant MVA85A induces long-lasting, polyfunctional Mycobacterium tuberculosis-specific CD4(+) memory T lymphocyte populations*. European journal of immunology, 2007. **37**(11): p. 3089-3100.
47. Kannanganat, S., et al., *Multiple-Cytokine-Producing Antiviral CD4 T Cells Are Functionally Superior to Single-Cytokine-Producing Cells*. Journal of Virology, 2007. **81**(16): p. 8468-8476.
48. Betts, M.R., et al., *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4781-9.
49. Duvall, M.G., et al., *Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection*. Eur J Immunol, 2008. **38**(2): p. 350-63.
50. Maeurer, M.J., et al., *Interleukin-7 or Interleukin-15 Enhances Survival of Mycobacterium tuberculosis-Infected Mice*. Infection and Immunity, 2000. **68**(5): p. 2962-2970.
51. Rane, L., et al., *Increased (6 exon) interleukin-7 production after M. tuberculosis infection and soluble interleukin-7 receptor expression in lung tissue*. Vol. 12. 2011. 513-22.
52. Sakata, T., et al., *Constitutive Expression of Interleukin-7 mRNA and Production of IL-7 by a Cloned Murine Thymic Stromal Cell Line*. Journal of Leukocyte Biology, 1990. **48**(3): p. 205-212.
53. Gutierrez-Ramos, J.C., C. Olsson, and R. Palacios, *Interleukin (IL1 to IL7) gene expression in fetal liver and bone marrow stromal clones: cytokine-mediated positive and negative regulation*. Exp Hematol, 1992. **20**(8): p. 986-90.
54. Madrigal-Estebas, L., et al., *Human small intestinal epithelial cells secrete interleukin-7 and differentially express two different interleukin-7 mRNA Transcripts: implications for extrathymic T-cell differentiation*. Hum Immunol, 1997. **58**(2): p. 83-90.
55. Heufler, C., et al., *Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes*. The Journal of Experimental Medicine, 1993. **178**(3): p. 1109-1114.
56. de Saint-Vis, B., et al., *The Cytokine Profile Expressed by Human Dendritic Cells Is Dependent on Cell Subtype and Mode of Activation*. The Journal of Immunology, 1998. **160**(4): p. 1666-1676.
57. Namen, A.E., et al., *Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7*. Nature, 1988. **333**: p. 571.
58. Bhatia, S.K., et al., *The effect of in vivo IL-7 deprivation on T cell maturation*. The Journal of Experimental Medicine, 1995. **181**(4): p. 1399-1409.
59. Parrish, Y.K., et al., *IL-7 Dependence in human B lymphopoiesis increases during progression of ontogeny from cord blood to bone marrow*. J Immunol, 2009. **182**(7): p. 4255-66.
60. Schluns, K.S., et al., *Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo*. Nature Immunology, 2000. **1**: p. 426.
61. Maraskovsky, E., et al., *Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1<sup>-/-</sup> mice*. Cell, 1997. **89**(7): p. 1011-9.
62. Joshi, P.C. and Y.S. Choi, *Human interleukin 7 is a B cell growth factor for activated B cells*. European Journal of Immunology, 1991. **21**(3): p. 681-686.
63. Welch, P.A., et al., *Human IL-7: a novel T cell growth factor*. The Journal of Immunology, 1989. **143**(11): p. 3562-3567.
64. van Leeuwen, E.M.M., J. Sprent, and C.D. Surh, *Generation and Maintenance of Memory CD4(+) T Cells*. Current opinion in immunology, 2009. **21**(2): p. 167-172.

65. Mazzucchelli, R., et al., *Development of regulatory T cells requires IL-7/Ralpha stimulation by IL-7 or TSLP*. Blood, 2008. **112**(8): p. 3283-92.
66. Meier, D., et al., *Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells*. Immunity, 2007. **26**(5): p. 643-54.
67. Martin, C.E., et al., *Interleukin-7 Availability Is Maintained by a Hematopoietic Cytokine Sink Comprising Innate Lymphoid Cells and T Cells*. Immunity, 2017. **47**(1): p. 171-182.e4.
68. Fry, T.J., et al., *A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis*. Blood, 2001. **97**(10): p. 2983-2990.
69. Guimond, M., et al., *Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells*. Nature Immunology, 2009. **10**: p. 149.
70. Bolotin, E., et al., *Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count*. Bone Marrow Transplant, 1999. **23**(8): p. 783-8.
71. Pellegrini, M., et al., *IL-7 engages multiple mechanisms to overcome chronic viral infection and limit organ pathology*. Cell, 2011. **144**(4): p. 601-13.
72. Unsinger, J., et al., *IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3768-79.
73. Pellegrini, M., et al., *Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies*. Nature Medicine, 2009. **15**: p. 528.
74. Melchionda, F., et al., *Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1177-87.
75. Colombetti, S., F. Levy, and L. Chapatte, *IL-7 adjuvant treatment enhances long-term tumor-antigen-specific CD8+ T-cell responses after immunization with recombinant lentivector*. Blood, 2009. **113**(26): p. 6629-37.
76. Nanjappa, S.G., et al., *Effects of IL-7 on memory CD8 T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(3): p. 1027-39.
77. Sportes, C., et al., *Phase I study of recombinant human interleukin-7 administration in subjects with refractory malignancy*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(2): p. 727-35.
78. Rosenberg, S.A., et al., *IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells*. J Immunother, 2006. **29**(3): p. 313-9.
79. Sereti, I., et al., *IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection*. Blood, 2009. **113**(25): p. 6304-14.
80. Storek, J., et al., *Interleukin-7 improves CD4 T-cell reconstitution after autologous CD34 cell transplantation in monkeys*. Blood, 2003. **101**(10): p. 4209-18.
81. Fry, T.J., et al., *Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts*. Blood, 2001. **97**(6): p. 1525-33.
82. Bolotin, E., et al., *Enhancement of thymopoiesis after bone marrow transplant by in vivo interleukin-7*. Blood, 1996. **88**(5): p. 1887-94.
83. Dean, R.M., et al., *Association of serum interleukin-7 levels with the development of acute graft-versus-host disease*. J Clin Oncol, 2008. **26**(35): p. 5735-41.
84. Lundmark, F., et al., *Variation in interleukin 7 receptor  $\alpha$  chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis*. Nature Genetics, 2007. **39**: p. 1108.
85. Hartgring, S.A.Y., et al., *Interleukin-7 induced immunopathology in arthritis*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2006. **65**(suppl 3): p. iii69-iii74.
86. Totsuka, T., et al., *IL-7 Is essential for the development and the persistence of chronic colitis*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 4737-48.

87. Hartgring, S.A., et al., *Blockade of the interleukin-7 receptor inhibits collagen-induced arthritis and is associated with reduction of T cell activity and proinflammatory mediators*. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(9): p. 2716-25.
88. Herold, K.C., et al., *Immunomodulatory activity of humanized anti-IL-7R monoclonal antibody RN168 in subjects with type 1 diabetes*. *JCI Insight*, 2019. **4**(24).
89. Colle, J.H., et al., *CD127 expression and regulation are altered in the memory CD8 T cells of HIV-infected patients--reversal by highly active anti-retroviral therapy (HAART)*. *Clin Exp Immunol*, 2006. **143**(3): p. 398-403.
90. Morrissey, P.J., et al., *Recombinant interleukin 7, pre-B cell growth factor, has costimulatory activity on purified mature T cells*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1989. **169**(3): p. 707-716.
91. Borger, P., et al., *IL-7 differentially modulates the expression of IFN-gamma and IL-4 in activated human T lymphocytes by transcriptional and post-transcriptional mechanisms*. *The Journal of Immunology*, 1996. **156**(4): p. 1333-1338.
92. Gringhuis, S.I., et al., *Interleukin-7 Upregulates the Interleukin-2-Gene Expression in Activated Human T Lymphocytes at the Transcriptional Level by Enhancing the DNA Binding Activities of Both Nuclear Factor of Activated T Cells and Activator Protein-1*. *Blood*, 1997. **90**(7): p. 2690-2700.
93. Schaberg, T., et al., *[Tuberculosis Guideline for Adults - Guideline for Diagnosis and Treatment of Tuberculosis including LTBI Testing and Treatment of the German Central Committee (DZK) and the German Respiratory Society (DGP)]*. *Pneumologie*, 2017. **71**(6): p. 325-397.
94. Pai, M., A. Zwerling, and D. Menzies, *Systematic Review: T-Cell-based Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Update*. *Annals of internal medicine*, 2008. **149**(3): p. 177-184.
95. Feske, M., et al., *Enhancement of Human Antigen-Specific Memory T-Cell Responses by Interleukin-7 May Improve Accuracy in Diagnosing Tuberculosis*. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, 2008. **15**(10): p. 1616-1622.
96. Sudo, T., et al., *Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(19): p. 9125-9.
97. Armitage, R.J., et al., *Expression of receptors for interleukin 4 and interleukin 7 on human T cells*. *Adv Exp Med Biol*, 1991. **292**: p. 121-30.
98. Noguchi, M., et al., *Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor*. *Science*, 1993. **262**(5141): p. 1877-80.
99. Rochman, Y., R. Spolski, and W.J. Leonard, *New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(7): p. 480-90.
100. Levin, S.D., et al., *Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism*. *J Immunol*, 1999. **162**(2): p. 677-83.
101. Henriques, C.M., et al., *IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7Ralpha in T cells*. *Blood*, 2010. **115**(16): p. 3269-77.
102. Park, J.H., et al., *Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 289-302.
103. Alves, N.L., et al., *Differential Regulation of Human IL-7 Receptor  $\alpha$  Expression by IL-7 and TCR Signaling*. *The Journal of Immunology*, 2008. **180**(8): p. 5201-5210.
104. Güler, A., et al., *Suppressor of cytokine signalling 3 is crucial for interleukin-7 receptor re-expression after T-cell activation and interleukin-7 dependent proliferation*. *Eur J Immunol*, 2020. **50**(2): p. 234-244.
105. Puel, A., et al., *Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency*. *Nat Genet*, 1998. **20**(4): p. 394-7.
106. Zenatti, P.P., et al., *Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Nat Genet*, 2011. **43**(10): p. 932-9.

107. Rethi, B., et al., *Loss of IL-7R $\alpha$  is associated with CD4 T-cell depletion, high interleukin-7 levels and CD28 down-regulation in HIV infected patients.* Aids, 2005. **19**(18): p. 2077-86.
108. Sasson, S.C., et al., *Increased plasma interleukin-7 level correlates with decreased CD127 and Increased CD132 extracellular expression on T cell subsets in patients with HIV-1 infection.* J Infect Dis, 2006. **193**(4): p. 505-14.
109. Rose, T., et al., *Identification and biochemical characterization of human plasma soluble IL-7R: lower concentrations in HIV-1-infected patients.* J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7389-97.
110. Goodwin, R.G., et al., *Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily.* Cell, 1990. **60**(6): p. 941-51.
111. Seyfarth, J., et al., *Interleukin-7 receptor  $\alpha$ -chain haplotypes differentially affect soluble IL-7 receptor and IL-7 serum concentrations in children with type 1 diabetes.* Pediatr Diabetes, 2018. **19**(5): p. 955-962.
112. Crawley, A.M., S. Faucher, and J.B. Angel, *Soluble IL-7R  $\alpha$  (sCD127) inhibits IL-7 activity and is increased in HIV infection.* J Immunol, 2010. **184**(9): p. 4679-87.
113. O'Doherty, C., et al., *IL7RA polymorphisms and chronic inflammatory arthropathies.* Tissue Antigens, 2009. **74**(5): p. 429-31.
114. Lundstrom, W., et al., *Soluble IL7R $\alpha$  potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(19): p. E1761-70.
115. Wu, S., et al., *Association between the IL7R T244I polymorphism and multiple sclerosis risk: a meta analysis.* Neurol Sci, 2016. **37**(9): p. 1467-74.
116. Gregory, S.G., et al., *Interleukin 7 receptor  $\alpha$  chain ( IL7R ) shows allelic and functional association with multiple sclerosis.* Nature Genetics, 2007. **39**(9): p. 1083-1091.
117. Badot, V., et al., *Serum soluble interleukin 7 receptor is strongly associated with lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus.* Ann Rheum Dis, 2013. **72**(3): p. 453-6.
118. Monti, P., et al., *Concentration and activity of the soluble form of the interleukin-7 receptor alpha in type 1 diabetes identifies an interplay between hyperglycemia and immune function.* Diabetes, 2013. **62**(7): p. 2500-8.
119. Demaret, J., et al., *Elevated plasmatic level of soluble IL-7 receptor is associated with increased mortality in septic shock patients.* Intensive Care Med, 2014. **40**(8): p. 1089-96.
120. Afum-Adjei Awuah, A., et al., *Dynamics of T-cell IFN-gamma and miR-29a expression during active pulmonary tuberculosis.* Int Immunol, 2014. **26**(10): p. 579-82.
121. Faucher, S., et al., *Development of a Quantitative Bead Capture Assay for Soluble IL-7 Receptor Alpha in Human Plasma.* PLoS ONE, 2009. **4**(8): p. e6690.
122. Ponchel, F., R.J. Cuthbert, and V. Goeb, *IL-7 and lymphopenia.* Clin Chim Acta, 2011. **412**(1-2): p. 7-16.
123. Boutboul, F., et al., *Modulation of interleukin-7 receptor expression characterizes differentiation of CD8 T cells specific for HIV, EBV and CMV.* Aids, 2005. **19**(17): p. 1981-6.
124. MacPherson, P.A., et al., *Interleukin-7 receptor expression on CD8(+) T cells is reduced in HIV infection and partially restored with effective antiretroviral therapy.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2001. **28**(5): p. 454-7.
125. Carini, C., et al., *Dysregulation of interleukin-7 receptor may generate loss of cytotoxic T cell response in human immunodeficiency virus type 1 infection.* Eur J Immunol, 1994. **24**(12): p. 2927-34.
126. Rajalingam, R., et al., *Correlation of serum interleukin-2 receptor-alpha levels with clinical manifestations in pulmonary tuberculosis.* Tuber Lung Dis, 1996. **77**(4): p. 374-9.

127. Takahashi, S., et al., *Soluble interleukin-2 receptor in sera of patients with pulmonary tuberculosis*. Chest, 1991. **99**(2): p. 310-4.
128. Tollerud, D.J., et al., *Racial variation in serum-soluble interleukin-2 receptor levels: a population-based study of healthy smokers and nonsmokers*. Clin Immunol Immunopathol, 1994. **70**(3): p. 274-9.
129. Motojima, S., et al., *High serum soluble interleukin-2 receptor concentrations in elderly individuals and smokers*. Agerugi, 1993. **42**(11): p. 1715-20.
130. Sadeghi, M., et al., *Strikingly higher interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta and soluble interleukin-1 receptor antagonist (sIL-1RA) but similar IL-2, sIL-2R, IL-3, IL-4, IL-6, sIL-6R, IL-10, tumour necrosis factor (TNF)-alpha, transforming growth factor (TGF)-beta and interferon IFN-gamma urine levels in healthy females compared to healthy males: protection against urinary tract injury?* Clin Exp Immunol, 2005. **142**(2): p. 312-7.
131. Kim, H.R., et al., *Down-regulation of IL-7Ralpha expression in human T cells via DNA methylation*. J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5473-9.
132. Swainson, L., et al., *IL-7R alpha gene expression is inversely correlated with cell cycle progression in IL-7-stimulated T lymphocytes*. J Immunol, 2006. **176**(11): p. 6702-8.
133. Chung, I.Y., et al., *Effects of IL-7 and dexamethasone: induction of CD25, the high affinity IL-2 receptor, on human CD4+ cells*. Cell Immunol, 2004. **232**(1-2): p. 57-63.
134. Armitage, R.J., et al., *Regulation of human T cell proliferation by IL-7*. The Journal of Immunology, 1990. **144**(3): p. 938-941.
135. Yu, N., et al., *CD4(+)CD25 (+)CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood*. Inflammation, 2012. **35**(6): p. 1773-80.
136. Vang, K.B., et al., *IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3285-90.
137. Darrah, P.A., et al., *Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major*. Nat Med, 2007. **13**(7): p. 843-50.
138. Lindenstrom, T., et al., *Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 8047-55.
139. Caccamo, N., et al., *Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active Mycobacterium tuberculosis infection*. Eur J Immunol, 2010. **40**(8): p. 2211-20.

## **DANKSAGUNG**

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Marc Jacobsen für die Möglichkeit bedanken, in der Forschungsgruppe AG Jacobsen mitzuarbeiten. Ich danke für viele inspirierende wissenschaftliche Diskussionen, hilfreiche Ratschläge und die Unterstützung während meiner Promotion. Mein besonderer Dank gilt den „Post-Docs“ der AG Jacobsen, Dr. rer. nat. Norman Nausch, Dr. rer. nat. Bianca Ueberberg und Dr. med. Julia Seyfarth für hilfreiche Diskussionen und die Weitergabe ihrer Expertise. Des Weiteren möchte ich mich auch bei meinen Kollegen in der AG Jacobsen Alptekin, Christian, Vanesa, Heinz und auch dem Rest des „Stoffwechsellabors“ bedanken. Ihr wart mir in meiner Zeit in der AG Jacobsen immer gute Kollegen und ich habe den fachlichen Austausch mit euch stets geschätzt.