

**Identifikation von natürlich prozessierten HLA-  
Liganden des *Mycobacterium tuberculosis* mittels  
massenspektrometrischer Analyse**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Christina Christ

aus Serebrjany Bor (Russische Föderation)

Tübingen

2014

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

29.01.2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Stevanović

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg  
Rammensee

# I: Inhaltsverzeichnis

<b>I: Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>II. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>III. Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Tuberkulose .....	1
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	2
1.2.1 Die mykobakterielle Zellwand .....	3
1.3 Diagnostik und Therapie der Tuberkulose .....	5
1.4 Impfungen gegen Tuberkulose .....	7
1.5 Das Immunsystem .....	9
1.5.1 Das angeborene Immunsystem .....	9
1.5.2 Die adaptive Immunantwort .....	10
1.5.3 Die T-Zell-Subtypen .....	13
1.5.4 Die T-Zell-Aktivierung .....	15
1.5.5 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) .....	16
1.6 <i>M. tuberculosis</i> und das Immunsystem .....	25
1.7 <i>M. tuberculosis</i> und Antigenpräsentation .....	29
1.8 Ausbildung und Funktion der Granulome in der Tuberkulose .....	31
1.9 Reaktivierung einer latenten Tuberkulose .....	35
1.10 Zielsetzung der Arbeit .....	36
<b>2. Methoden und Materialien</b> .....	<b>39</b>
2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Puffer .....	39
2.1.1 Geräte .....	39
2.1.2 Software .....	40
2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	41
2.1.4 Medien und Puffer .....	43
2.1.5 Medien für die Arbeit mit PBMCs und Monozyten .....	44
2.1.6 Verwendete Antikörper für proteinchemische Versuche .....	45
2.1.7 Zytokine und Wachstumsfaktoren für verschiedene Zelllinien .....	45
2.1.8 Im ELISPOT verwendete Antikörper und Reagenzien .....	45
2.1.9 Im ELISA verwendete Antikörper und Reagenzien .....	46
2.1.10 Verbrauchsmaterialien für zellbiologische Experimente .....	46
2.1.11 Verwendete Reagenzien für VITAL-Assay im Durchflusszytometer .....	47
2.2 Zelllinien, Mykobakterien- und Virus-Stämme .....	47
2.2.1 Zelllinie B-LCL JY .....	47
2.2.2 Zelllinie THP-1 .....	47
2.2.3 Zelllinie LG2-EBV .....	48
2.2.4 Mykobakterium-Stämme .....	48

2.2.5 Modified Virus Ankara (MVA) -Stämme .....	49
2.2.6 Spender für immunologische Experimente .....	49
2.2.7 Spender für Infektion mit H37Rv.....	50
<b>2.3 Theoretischer Hintergrund der Methoden .....</b>	<b>50</b>
2.3.1 Massenspektrometrie .....	50
2.3.2 Peptidstimulation von CD8 <sup>+</sup> Gedächtnis T-Zellen.....	53
2.3.3 ELISPOT.....	53
2.3.4 Durchflusszytometrie .....	54
2.3.5 Intrazelluläre Zytokinfärbung .....	55
2.3.6 HLA-Tetramerfärbung .....	55
<b>2.4 Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>56</b>
2.4.1 Isolierung von PBMCs mittels Ficoll.....	56
2.4.2 Einfrieren von Zellen .....	56
2.4.3 Auftauen von Zellen .....	57
2.4.4 Ermitteln der Lebend-Zellzahl .....	57
2.4.5 Infektion von B-LCL mit MVA .....	57
2.4.6 Infektion von monozytären Makrophagen mit dem Laborstamm H37Rv.....	58
2.4.7 Kultivierung von PBMCs für ELISPOT-Versuche.....	58
2.4.8 Peptidstimulation von Gedächtnis-T-Zellen für ELISPOT und ICS-Analysen.....	59
2.4.9 Zellseparation von Tetramer-spezifischen T-Zellen mittels FACS-Sorter .....	59
2.4.10 Magnetunterstützte Zellseparation (MACS) von T-Zellen .....	60
2.4.11 Kultivierung von FACS- bzw. MACS-sortierten T-Zellen .....	61
<b>2.5 Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>61</b>
2.5.1 Synthese der Peptide .....	61
2.5.2 Lösung und Aufbewahrung von Peptiden .....	61
2.5.3 Multimerisierung von MHC Klasse I-Komplexen via Streptavidin .....	62
2.5.4 Lyse von Zellpellets.....	62
2.5.5 Herstellung von Lysat aus H37Rv-infizierten Makrophagen .....	62
2.5.6 Herstellung der Affinitätssäule .....	63
2.5.7 Isolation von MHC/Peptid Komplexen mit Affinitätssäule .....	64
2.5.8 Elution von MHC-Komplexen .....	64
2.5.9 Modifizierung von Peptiden mit Nicotinsäure (NIC) und deuterierter Nicotinsäure (dNIC) .....	65
<b>2.6 Massenspektrometrische Analysen und Interpretation von MS-Daten mit Hilfe von Mascot .....</b>	<b>66</b>
2.6.1 Vorbereiten der Proben für die LC-MS.....	66
2.6.2 Nanoflow LC-MS/MS .....	67
2.6.3 Prozessieren der MS-Daten und interpretieren der MS-Daten.....	68
<b>2.7 Zell-Analytische Methoden .....</b>	<b>69</b>
2.7.1 Vorbereitung der Platten und Zellen für einen IFN- $\gamma$ ELISPOT .....	69
2.7.2 Entwickeln des ELISPOTS.....	69
2.7.3 Extra- und intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS) .....	70
2.7.4 IFN $\gamma$ -ELISA.....	71
2.7.5 Anfärben von spezifischen T-Zellen mit HLA-Tetrameren.....	72
2.7.6 VITAL-FR-Zytotoxizitätstest .....	73
<b>3. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>75</b>
<b>3.1 Infektion der B-LCL mit MVA.....</b>	<b>75</b>
3.1.1 Etablierung der Infektion mit MVA-GFP .....	75
3.1.2 Infektion der B-LCL mit MVA-Ag85A bzw. MVA-TBF .....	78

3.2 Infektion mit Laborstamm H37Rv und Identifikation von mykobakteriellen Liganden .....	92
3.3 Bindekapazität der eluierten HLA-A*02-Liganden an das HLA-A*02-Molekül.....	103
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Isolierung von mykobakteriellen HLA-Liganden.....	105
3.5 Immunogenität der eluierten Peptide .....	106
3.5.1 Testen der eluierten Liganden auf eine Immunreaktion bei gesunden Spendern .....	106
3.5.2 Testen der HLA-Liganden auf Reaktion bei gesunden und nicht-geimpften Spendern.....	113
3.5.3 Charakterisierung der beobachteten Immunreaktionen.....	114
3.6 Biologische Funktionalität des Epitops LLDAHIPQL .....	116
3.6.1 Untersuchung der Zytotoxizität von LLDAHIPQL-spezifischen CD8 T-Zellen gegen peptidbeladenen bzw. Epitop-präsentierenden Zellen .....	121
3.6.2 <i>In vivo</i> -Untersuchungen der Zytotoxizität von Peptid-spezifischen T-Zellen in HLA-A*02- transgenen Mäusen .....	123
3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Immunigenität von identifizierten mykobakteriellen Liganden .....	127
<b>4. Zusammenfassung.....</b>	<b>132</b>
<b>5. Abstract.....</b>	<b>133</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>134</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>137</b>
<b>8. Lebenslauf.....</b>	<b>162</b>

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aufbau der mykobakteriellen Zellwand und ihrer wachsartigen äußeren Schicht. ....	4
Abbildung 1.2: Die dreidimensionale Struktur von MHC-Klasse I und MHC Klasse II und ihrer Liganden. ..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der MHC Klasse I-Synthese und Antigenprozessierung. ....	20
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der MHC Klasse II-Synthese und Antigenprozessierung. ....	22
Abbildung 1.5: Die Struktur eines CD1-Oberflächenmoleküls der Gruppe 1, CD1c. ....	24
Abbildung 1.6: Wechselwirkung zwischen T-Zellen und infizierten Makrophagen. ....	29
Abbildung 1.7: Schematischer Ablauf einer Granulom-Entwicklung im Menschen. ....	34
Abbildung 1.8: Das Modell zur Identifizierung von natürlich prozessierten Peptiden mykobakteriellen Ursprungs. ....	38
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometers. ....	52
Abbildung 2.2: Peptid-Fragmentierung. ....	52
Abbildung 3.1: Zeitlicher Verlauf der GFP-Expression nach der Infektion von B-LCL mit MVA GFP. ....	76
Abbildung 3.2: Infektionsrate im Verhältnis zu infizierten und toten Zellen. ....	77
Abbildung 3.3: Arbeitsablauf zur Isolierung von mykobakteriellen HLA-Liganden. ....	79
Abbildung 3.4: Fragmentspektren von identifizierten <i>M. tuberculosis</i> HLA-Liganden aus B-LCL infiziert mit MVA-Ag85A oder MVA-TBF. ....	84
Abbildung 3.5: Peptidspektren eines Peptid-Kandidaten mit negativer Validierung. ....	85
Abbildung 3.6: Fragmentspektren der von MHC Klasse II eluierten Vaccinia-Peptiden. ....	91
Abbildung 3.7: Messung von CD14-positiven Zellen mittels FACS-Analyse und Anzahl von eluierten Peptiden im Verhältnis zu der Zellzahl. ....	94
Abbildung 3.8: Fragmentspektren von identifizierten <i>M. tuberculosis</i> HLA-Liganden aus Makrophagen infiziert mit dem pathogenen Laborstamm H37Rv. ....	101
Abbildung 3.9: Bindung von mykobakteriellen Peptiden an rekombinante HLA-A*02-Moleküle. ....	104
Abbildung 3.10: Beispiel eines ELISPOT-Ergebnisses. ....	108
Abbildung 3.11: Intrazelluläre Färbung von PBMCs von PPD-positiven Spendern nach Stimulation mit TVFDAIRAAK. ....	111
Abbildung 3.12: ELISPOT-Ergebnisse nach der Stimulation mit dem Peptid LLDIHIPQL und seiner Längenvariante SLLDAHIPQL. ....	113
Abbildung 3.13: Beispiel eines ELISPOT-Ergebnisses mit einem Negativ-Spender. ....	114
Abbildung 3.14: Intrazelluläre INF $\gamma$ -Färbung nach der Stimulation mit LLDIHIPQL. ....	115
Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der Isolierung Epitop-spezifischer CD8-Zelllinien und deren biologische Relevanz auf Epitop-präsentierende Zellen. ....	116
Abbildung 3.16: Ermittlung der Frequenz von LLDIHIPQL-spezifischen Zellen mit Hilfe eines LLDAHIPQL-Tetramers. ....	117
Abbildung 3.17: Darstellung einer LLDIHIPQL-Tetramer-spezifischen CD8-Zelllinie. ....	118
Abbildung 3.18: Beispiel einer intrazellulären Färbung einer LLDIHIPQL-spezifischen Zelllinie nach Stimulation. .... Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Abbildung 3.19: Auswertung des Vital-Assay mit der Zelllinie CK17. ....	122
Abbildung 3.20: Repräsentatives Ergebnis für die <i>in vivo</i> -Impf-Experimente mit HLA-A*02-transgenen Mäusen. ....	124
Abbildung 3.21: Repräsentatives Ergebnis für die intrazelluläre Färbung der Zellen aus HLA A*02- transgenen und Peptid-geimpften Mäusen. ....	125
Abbildung 3.22: Analyse der IFN $\gamma$ -Sekretion und Titer-Bestimmung von LLDIHIPQL-spezifischen Antikörpern der HLA-A*02-transgenen Mäusen geimpft mit LLDIHIPQL. ....	126
Abbildung 3.23: ELISPOT-Ergebnis nach Restimulation von T-Zellen mit <i>in silico</i> vorhergesagten Peptiden der Acetyl-CoA-Synthetase. ....	130

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Die meist versprechendsten Impfkandidaten in klinischen Studien (Kaufmann et al. 2010)...	8
Tabelle 2.1: Antikörper für MHC-Präzipitation .....	45
Tabelle 2.2: Antikörper für ELISPOT.....	45
Tabelle 2.3: Verwendete Antikörper und Reagenzien für ELISA Tests.....	46
Tabelle 2.4: Verwendete Antikörper und HLA-Tetramer für extrazelluläre und intrazelluläre Färbungen. .....	46
Tabelle 2.5: Verwendetes Amin für die Lebend-Tot-Färbung von Zellen.....	47
Tabelle 2.6: Reagenzien für den Vital-Assay.....	47
Tabelle 2.7: Geeignete Anzahl Zellen in verschiedenen Plattengrößen.....	58
Tabelle 3.1: Kodierte mykobakterielle Antigene von verwendeten MVA-Vektoren.....	80
Tabelle 3.2: Mykobakterielle Liganden isoliert nach der Infektion der B-LCL mit MVA TBF und MVA- Ag85A .....	81
Tabelle 3.3: Tabelle der identifizierten Vaccinia Liganden nach Infektion der B-LCL mit MVA-TBF und MVA-Ag85A von Meyer et. al. 2008.....	87
Tabelle 3.4: Proben für die Infektion mit H37Rv und anschließender MHC-Präzipitation.....	93
Tabelle 3.5: Zusammenfassung der vorgeschlagenen H37Rv-Peptide aus infizierten Buffy Coat-Proben nach der Mascot-Prozessierung und Berücksichtigung von gewählten Filterkriterien wie $\Delta$ ppm, Ion Score und Rank.....	96
Tabelle 3.6: Zusammenfassung von humanen und mykobakteriellen Peptiden der Leukapheresen Proben nach der Prozessierung und Berücksichtigung von gewählten Filterkriterien wie $\Delta$ ppm, Ion Score und Rank.....	97
Tabelle 3.7: Mykobakterielle Liganden eluiert von ausdifferenzierten Makrophagen nach der Infektion mit dem pathogenen Laborstamm H37Rv.....	98
Tabelle 3.8: Spender für immunologische Tests.....	107
Tabelle 3.9: Zusammenfassung der <i>Screening</i> -Ergebnisse im ELISPOT mit den eluierten HLA-Liganden. .....	109
Tabelle 3.10: Liste der mit Hilfe von IEDB ( <a href="http://www.iedb.org/">http://www.iedb.org/</a> ) <i>in silico</i> vorhergesagten HLA-A*02- und HLA-A*03-Peptide.....	129



# 1. Einleitung

## 1.1 Die Tuberkulose

Die Tuberkulose (TB) ist eine Krankheit, die schon seit Jahrtausenden die Menschheit peinigt. Die ersten bekannten Anzeichen von Tuberkulose wurden bereits an Knochen und Wirbelsäulen alter ägyptischer Mumien entdeckt. Vor ca. 2000 Jahren beschrieb Hippokrates eine verzehrende Erkrankung mit dem Namen „Phthisis“ die weit verbreitet war und fast immer tödlich endete. Schätzungsweise eine Milliarde Menschen starben an „der Weißen Pest“ in den zwei Jahrhunderten zwischen 1700 und 1900. Auch heute stellen Infektionen mit Mykobakterien ein weltweites Problem dar. Nach dem letzten globalen Tuberkulose Report der World Health Organization (WHO) wurden im Jahre 2011 8,7 Millionen Menschen mit einer Neuinfektion der Tuberkulose geschätzt. 13% dieser neu diagnostizierten Patienten haben zusätzlich eine Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) ([http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)). 1,4 Millionen der Tuberkulose-Infizierten starben im Jahre 2011 an dieser Erkrankung, 430000 davon waren HIV- positiv.

Die TB ist eine Infektion der Lunge und ist durch Knötchenbildung (Granulome) und Gewebszerstörung (Kavernen) gekennzeichnet. Überwiegend zeichnet sich die Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) durch eine lebenslange Persistenz aus. Die bakterielle Replikation und die Immunantwort des Wirts bilden ein Gleichgewicht ohne ersichtliche Beschwerden. Hinweise auf eine Infektion können durch die Reaktivität des Immunsystems auf mykobakterielle Antigene gezogen werden. Dieser Stand der Infektion wird klinisch als latente Phase der TB bestimmt und laut WHO ist ein Drittel der Weltbevölkerung latent mit einer TB infiziert. In einem kleinen prozentualen Anteil (5-10%) dieser Infizierten kann es zu Reaktivierung einer klinisch relevanten Form der TB kommen ([http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/gtbr12\\_main.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr12_main.pdf)). Die aktive Form der TB lässt sich anhand folgender Symptomatik erkennen: Husten, teils blutig und schleimig, Brustschmerzen, Gewichtsverlust, Fieber und Nachtschweiß (<http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/>). Dieser zumeist verspätete Krankheitsausbruch ist aufgrund einer sich langsam entwickelnden Infektion zu erklären. Bei den meisten Erwachsenen entwickelt sich die Erkrankung eher aus einem bereits vorhandenen Infektionsherd als aus einer Primärinfektion. Der Ausbruch der Erkrankung nach der Erstinfektion kommt eher in immunsupprimierten Menschen vor. Nach der Infektion mit Mtb und gelungener Ausbildung einer Erkrankung werden die Infektionsherde

wegen des massiven Zellsterbens zu sich verflüssigenden Granulomen. Diese können im schlimmsten Fall des Krankheitsverlaufs ausbrechen und somit die Bakterien freilassen, welche wiederum in die Alveolaren gelangen und von dort ausgehustet werden. Infizierte mit geschlossenen Granulomen sind keine Überträger. In 50% der Fälle kommt es zum Tod wenn die klinisch relevante TB nicht therapiert wird (Kaufmann 2001).

## 1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Im Jahre 1882 entdeckte Robert Koch den Erreger der Tuberkulose, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (<http://edoc.rki.de/documents/rk/508-428-445/PDF/428-445.pdf>), (Sakula, 1982.; Taylor et al., 2003.). Er isolierte diesen aus unterschiedlichen Organen und Sekreten infizierter Menschen bzw. Tiere. Anschließend infizierte er gesunde Tiere mit den isolierten Bakterien, die wiederum an der Tuberkulose erkrankten. Durch diese Versuchsreihe konnte Robert Koch die Mykobakterien als Erreger der Tuberkulose identifizieren. Im Jahre 1905 bekam Robert Koch den Nobelpreis der Medizin verliehen (<http://www.nobelprize.org/educational/medicine/tuberculosis/readmore.html?do>).

Die Mykobakterien gehören zu der Familie *Mycobacteriaceae* aus der Ordnung der Aktinomyzeten und bilden die einzige Gattung ihrer Familie (Mykobakterium, M.) (Rastogi et al. 2001). Es sind stäbchenförmige Bakterien von 0,4 µm Breite und 2-3 µm Länge, die unbeweglich sind und keine Sporen bilden. Die Mykobakterien sind obligat aerob und haben eine Teilungsrate von mehreren Stunden (*in vitro* circa 24 h). Die Kultivierung dieser Gattung erfolgt meist in lipidreichen Medien wohingegen *M. leprae* im Vergleich zu anderen Mykobakterien *in vitro* nicht kultivierbar ist (Hahn et al. 2009). Diese Teilungsrate wird auch mit einem chronischen Verlauf der Erkrankung, langwieriger Medikamenten-Therapie und komplexer mikrobieller Diagnostik assoziiert (Cole et al. 1998). Weitere typische Merkmale von Mykobakterien sind ihr komplexer Zellwandaufbau mit hohem Wachsanteil, intrazelluläres Wachstum und ihr relativ hoher genomischer G/C-Gehalt (Koch 1882; Lehmann et al. 1896). Zusätzlich haben die Mykobakterien die Fähigkeit sich in eine biologische Ruhe, in die sogenannte Dormanz, zu begeben.

Die *Mycobacteriaceae* werden aufgrund ihrer Pathogenität in drei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe, der *M. tuberculosis*-Komplex, beinhaltet die klassischen Erreger der Tuberkulose (TB), die zweite Gruppe den Erreger der Lepra, *M. leprae*, und die dritte eine große Gruppe mit über 100 Spezies der nicht-tuberkulösen Bakterien („*non-Tuberculous Mycobacteria*“, NTM). Zum *M. tuberculosis*-Komplex zählen die nahe verwandten Stämme:

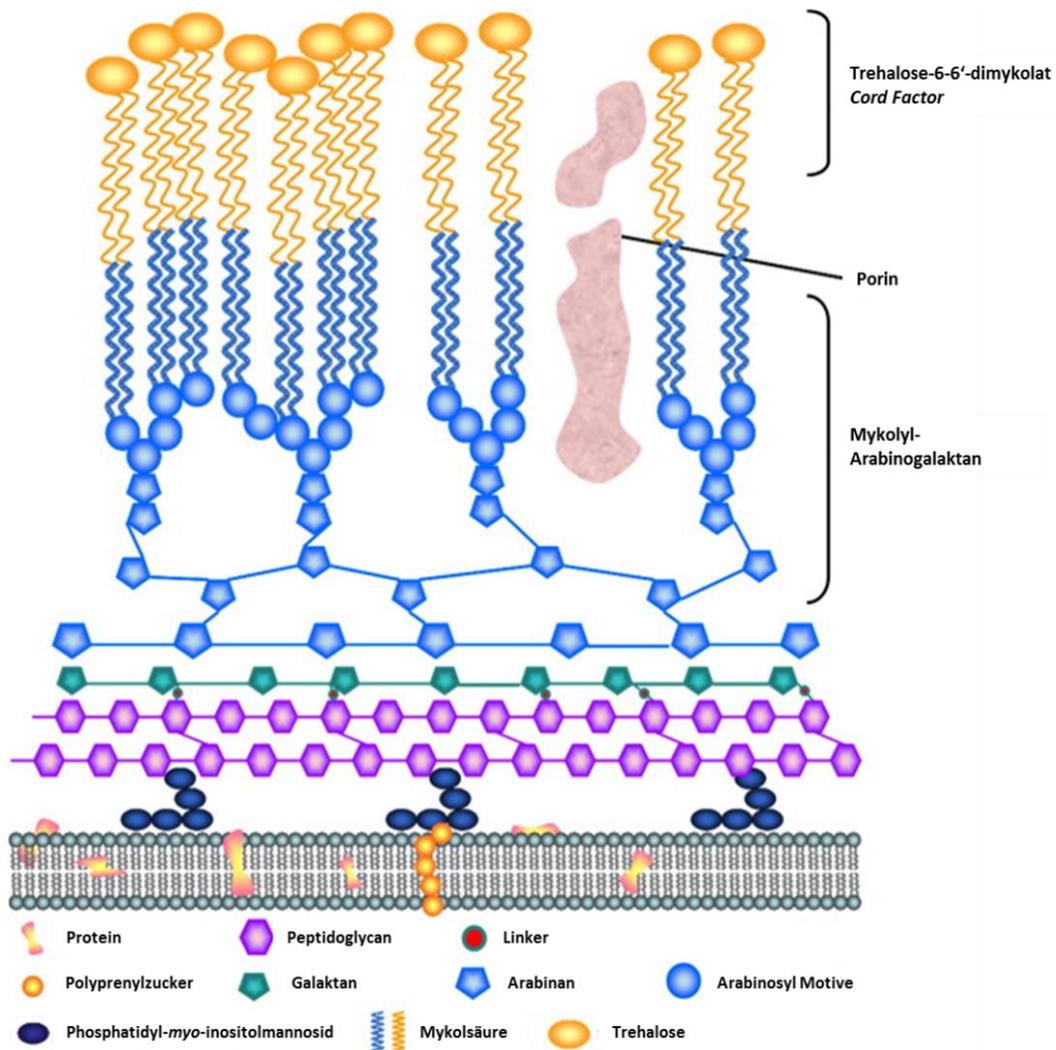
*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, der Impfstamm *M. bovis BCG*, *M. microti*, *M. canettii* und *M. pinnipedii* (Cole et al. 1998). Sie haben eine hohe genetische Übereinstimmung, unterscheiden sich jedoch in ihrer Epidemiologie, der Pathogenität und dem Wirtsspektrum. So ist *M. tuberculosis* hauptsächlicher Verursacher der Tuberkulose im Menschen, *M. bovis* bevorzugter Wirt sind Rinder und *M. microti* infiziert Nagetiere. Die Vertreter der Gruppe NTM sind obligate Erreger der Menschen und können Erkrankungen in immunsupprimierten oder in bereits mit Tuberkulose erkrankten Personen verursachen, diese verlaufen meist chronisch. Für sie wird auch der Begriff „Mycobacteria Other Than Tuberculosis, MOTT“ oder atypische Mykobakterien verwendet (Turenne et al. 2007).

### **1.2.1 Die mykobakterielle Zellwand**

Viele besondere Eigenschaften der Mykobakterien sind auf ihre Zellwand zurückzuführen, welche im Vergleich zu anderen Bakterien sehr lipidreich ist. Circa 250 Gene sind für den Fettsäuren-Metabolismus codiert (Kaufmann 2001). Der Lipidbestandteil kann bis zu 60% des Trockengewichts der Zellwände ausmachen und ist der Grund für die große Widerstandsfähigkeit der Mykobakterien gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperatur, Austrocknung, UV-Licht und Säure (Helmut et al. 2009). Des Weiteren sind Resistenzen gegenüber üblicher Antibiotika, wie Penizillin, auf ihre Zellwand zurückzuführen, welche im Vergleich zu anderen Bakterien wenig permeabel ist (Chatterjee 1997; Brennan 2003).

Die Zellwand der Mykobakterien ist ein komplexes Gebilde, welches grob in drei Schichten angeordnet ist. Von innen nach außen wird die mykobakterielle Zellwand in eine Plasmamembran, einen Mykolyt-Arabinogalaktan-Peptidoglykan (mAGP) Komplex und eine Kapsel-ähnliche Schicht aus Glykanen, Lipiden und Proteinen unterteilt, welche auch im mAGP-Komplex ineinander greift (Abbildung 1.1) (Brennan 2003). Die Plasmamembran ist eine typische Lipiddoppelschicht aus amphipathischen polaren Phospholipiden. Über der Phospholipidmembran befindet sich die Peptidoglykanschicht. Das Peptidoglykan (PG) ist kreuzvernetzt mit verzweigten Arabinogalaktan-Ketten, diese Bindung ist kovalent (Chatterjee 1997). Das Arabinogalaktan ist wiederum an distalen Enden mit langen und verzweigten Ketten der Mykolsäuren verestert (Brennan 2003). Mykolsäuren sind langkettige, gesättigte Fettsäuren aus 60-90 Kohlenstoffatomen ( $\alpha$ -Alkyl- $\beta$ -Hydroxy-Fettsäuren), die für die stark hydrophobe Natur der Zellwand verantwortlich sind und den größten Teil der Zellhülle ausmachen (Chatterjee, 1997; Watanabe et al. 2001). Dieses Makromolekül, mAGP, ist Hauptbestandteil der Zellwand (Chatterjee 1997; Brennan 2003). Das Eingreifen in die Synthese des mAGP Komplexes oder schon in die Synthese der

Mykolsäuren führt zur erhöhten Permeabilität und Fluidität gegenüber hydrophoben Substanzen, was wiederum zur Temperatursensitivität und zum schwächeren Wachstum der Mykobakterien führt (Barry, 2001; Yuan, Zhu, Crane, & Barry III, 1998).



**Abbildung 1.1: Aufbau der mykobakteriellen Zellwand und ihrer wachstartigen äußeren Schicht.**

Ein vereinfachter schematischer Zellwandaufbau von *Mycobacterium tuberculosis* ist dargestellt. Die Zellmembran ist aus einer Lipid-Doppelschicht aufgebaut. Die innere Schicht setzt sich aus dem Komplex mehrerer Makromoleküle zusammen, die kovalent miteinander verbunden sind und das Mykolyl-Arabinogalaktan-Peptidoglykan bilden: Mykolsäuren, Peptidoglykan und Arabinogalaktan. Die äußere Schicht wird aus dem Cord Factor und anderer transmembrane Proteine gebildet (McLean, Dunford, Neeli, Driscoll, & Munro, 2007).

Die über dem mAPG liegende „Kapsel“ besteht aus freien Lipiden mit langen bzw. kurzen Fettsäuren, die die jeweiligen Ketten der Mykolsäuren komplettieren. Weiterhin ist die Kapsel mit Zellwand-Proteinen und Glykolipiden durchsetzt, wie Phosphatidyl-myo-

inositolmannosid (PIM), Lipomannan (LM), Lipoarabinomannan (LAM) (Brennan 2003). Bei der Auftrennung der Zellwand in ihre Bestandteile mit Hilfe unterschiedlicher Lösungsmittel findet man freie Lipide, Proteine, LAM und PIM gelöst vor, der Komplex aus Mykoly-Arabinogalaktan-Peptidoglykan bleibt unlöslich. Nach Brennan 2003 könnten die löslichen Bestandteile Effektor- bzw. Signal-Moleküle sein, verantwortlich für die unterschiedlichen Prozesse der Pathogenität. Der mAGP-Komplex ist dagegen essentiell für das Überleben des Mykobakteriums und kann als potentieller Angriffspunkt für die Antibiotikaentwicklung angesehen werden. So greifen die typischen Antibiotika gegen Tuberkulose-Bakterien in die Synthese der Zellwand ein, z.B. inhibiert Isoniazid die Synthese der Mykolsäure und Ethambutol die des Arabinogalactans (Takayama & Kilburn, 1989; Winder & Collins, 1970).

Die Mortalität der Mykobakterien kann auch durch die Abwesenheit von bestimmten Glykopeptidolipiden erhöht werden, da unter anderem diese Glykolipide die Kolonisierung an den Wirt ermöglichen. Viele dieser frei assoziierten Lipide wurden in den letzten Jahren aufmerksam untersucht, da sie als mögliche Virulenzfaktoren betrachtet werden, wie das Trehalose-6,6'-dimykolat (TDM), auch Cord Faktor genannt. TDM ist nicht-kovalent mit Mykolsäuren assoziiert. Es ist aufgrund seiner toxischen Wirkung in Mäusen bekannt. Wiederholt in einem Ölvehikel intraperitoneal injiziert, ist es letal (Brennan 2003; Hunter et al. 2006a). Zusätzlich schützt es die Mykobakterien vor dem Abtöten durch die Makrophagen. Der Einfluss des *Cord Factors* in der Ausbildung von Kavernen in der Lunge konnte ebenso beobachtet werden (Hunter et al. 2006b). Das Glykolipid Lipoarabinomannan (LAM) von Mtb hat eine Kappe aus kurzen Mannose-Polysacchariden. Diese erlaubt seinem Träger die Bindung an Mannose-Rezeptoren auf Makrophagen oder den *Toll-Like*-Rezeptoren und kann somit das Einschleusen in die Wirtszelle auslösen (Gilleron et al. 2000; Brennan 2003). ManLAM wird auch als ein möglicher Virulenzfaktor angesehen, da es die Phagosomenreifung in Makrophagen inhibiert. In Mtb ist LAM mannosyliert. In avirulenten Mykobakterien findet man LAM allerdings in Verbindung mit Arabinose vor (AraLAM) (Briken, Porcelli, Besra, & Kremer, 2004).

### **1.3 Diagnostik und Therapie der Tuberkulose**

Zur Diagnose einer Tuberkulose werden unterschiedliche Methoden zur Hilfe genommen. Mit der Radiologie können die Lungenflügel und darin vorkommende Kavernen bzw. Granulome dargestellt und visuell die Schwere der Erkrankung bestimmt werden. Der

mikroskopische Test eignet sich für den Nachweis des Erregers im Sputum oder Magensaft, jedoch ist dieser Test weniger sensitiv da dazu  $5 \cdot 10^3$  bis  $1 \cdot 10^4$  Bakterien/ml zur Detektion im Sputum nötig sind. Der heutige Goldstandard ist der kulturelle Nachweis von Bakterien aus dem Sputum, der auch zur Empfindlichkeitstestung von Standardmedikamenten genutzt werden kann. Jedoch werden Patienten mit einer latenten Infektion kaum damit erfasst. Aufgrund der langsamen Teilungsrate der Mykobakterien ist dieses diagnostische Verfahren langwierig und kann eine Woche, wenn nicht Monate in Anspruch nehmen. Die PCR (Polymerasekettenreaktion, *polymerase chain reaction*) ist eine sensitivere Methode (60-90%) der Diagnostik. Sie wird zur Unterscheidung der Infektion mit nicht-tuberkulösen und tuberkulösen Bakterien genutzt. Beim Tuberkulin-Hauttest wird PPD (*Purified Protein Derivate*) in die Haut injiziert, was das Eindringen der spezifischen T-Zellen zum Injektionsort zur Folge hat, und anhand der Rötung und Schwellung wird das Ergebnis interpretiert. Jedoch kann dieser Test falsche Ergebnisse liefern, wie im Falle der BCG-Impfung oder einem früheren Kontakt mit ubiquitären Bakterien. Personen mit Erkrankungen des Immunsystems oder unter Therapien mit Immunsuppressiva können falsch negativ im PPD-Test sein. In den neueren Methoden wird die Sekretion von IFN $\gamma$  durch spezifische T-Zellen detektiert, welche mit mykobakteriellen Antigenen stimuliert werden, QuantiFERON-TB Gold von Cellestis. Dieses Verfahren ist sensitiver als der PPD-Test, unter anderem weil Antigene der RD-1 Region (ESAT-6 und CFP-10) zur Stimulation benutzt werden, die in BCG und ubiquitären Mykobakterien nicht vorkommen (Lange et al. 2006; Sia & Wieland 2011).

Die Therapie orientiert sich nach der Empfehlung der WHO, die Patienten werden mit der vierfachen Standardtherapie aus Isoniazid (INH), Rifampicin (RMP), Ethambutol (EMB), Streptomycin (SM) oder Pyrazinamid (PZA) zwei Monate lang behandelt. Diese Zeit wird Initialphase genannt, in der sich die Bakterien rasch vermehren. Durch die Vierfachbehandlung versucht man die Bakterienzahl zu reduzieren und die Ansteckungsgefahr zu mindern. Die Vierfachtherapie soll zudem die Resistenzentwicklung der Erreger verhindern. Bei der Sensitivität gegenüber den obenstehenden Antibiotika wird mit INH und RMP bis zu sechs Monate weiter behandelt ([http://www.pneumologie.de/fileadmin/pneumologie/downloads/LL\\_Tuberkulose.pdf](http://www.pneumologie.de/fileadmin/pneumologie/downloads/LL_Tuberkulose.pdf)?cnt=mark). Bei MDR (*multidrug-resistant tuberculosis*; MDR-TB) ist eine Unempfindlichkeit gegenüber INH und RMP zu beobachten. Als Therapie-Ersatz wird zu den Zweistrand-Medikamenten (z.B. Kanamycin, KM; Rifabutin, RFB) gewechselt. Die XDR-TB (*extensively drug-resistant tuberculosis*) hat neben der INH und RMP zusätzlich die Resistenz gegenüber den Fluoroquinolon entwickelt. Zudem erregte das Auftauchen von TDR-TB (*totally drug-*

*resistant tuberculosis*) in Italien, in Iran und in Indien weitere Aufmerksamkeit, die die Notwendigkeit zur Erforschung weiterer wirksamer Medikamente vor Augen führt ([http://www.who.int/tb/publications/2010/mdrtb2010report\\_executive\\_summary.pdf](http://www.who.int/tb/publications/2010/mdrtb2010report_executive_summary.pdf); <http://www.nature.com/news/totally-drug-resistant-tb-emerges-in-india-1.9797>).

## 1.4 Impfungen gegen Tuberkulose

Um Tuberkulose entgegen zu wirken, ist ein großer Bedarf an neuen oder verbesserten Impfungen vorhanden. Diese Impfungen sollten mehrere Mechanismen des Immunsystems aktivieren wie Th1-Zellen zur Aktivierung von Phagozyten oder CD8-Zellen, die direkt Mykobakterien töten können. Zusätzlich sollte ein langanhaltendes und wirkungsvolles Immungedächtnis eingeleitet werden. Die Impfungen der heutigen Zeit zielen auf die Aktivierung einer Immunantwort, welche schnell gegen das Bakterium in der Infektionsphase wirkt und somit die Etablierung der Infektion verhindert. Jedoch wechselt Mtb von einer aktiven Replikation in eine latente Phase über, als Antwort auf das reagierende Immunsystem (Schnappinger et al. 2003). Dieser Übergang zeigt sich in der Änderung des Metabolismus und davor gehenden Änderung der Genexpression, resultierend in einer Dormanz, gewissermaßen in einer sich langsam bis kaum teilenden Phase. Deswegen besteht die Nachfrage an Vakzinen die auch langsam replizierende Bakterien erfassen können, die sich in ihrer Proteinexpression von denen in der aktiven Phase unterscheiden. Aus dem Grunde versucht man Impfungen zu entwickeln, die ein oder mehrere Gene des RD1-Regulon besitzen, um auch das Immunsystem gegen die latenten Erreger zu aktivieren.

BCG ist die einzige zugelassene Impfung gegen TB. BCG wurde zwischen 1906 und 1919 von Albert Calmette und Camille Guérin entwickelt (Oettinger et al. 1999; Andersen & Doherty 2005). Der entscheidende Vorgang war die Abschwächung des pathogenen Stamms *Mycobacterium bovis* durch mehrere Passagen in einem Nährmedium auf der Basis von Glycerin, Kartoffeln und Galle (Calmette 1931) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2182232/pdf/procrsmed00808-0023.pdf>). In den darauf folgenden Jahren wurden mehr als 14 Substämme entwickelt und in unterschiedlichen Teilen der Welt appliziert ([http://www.who.int/biologicals/BCG\\_DB\\_HK\\_23\\_April\\_2012.pdf](http://www.who.int/biologicals/BCG_DB_HK_23_April_2012.pdf)). Im Jahre 1921 wurde zum ersten Mal ein Mensch mit BCG geimpft und 1974 wurde diese Impfung in das Impfprogramm der WHO (EPI; Expanded Programme on Immunization) aufgenommen. Die Folge war, dass mehr als 80% der Weltbevölkerung eine BCG Impfung bekommen hatten.

Trotz des weitverbreiteten Gebrauchs ist die BCG-Impfung nur eingeschränkt wirksam. Bei Neugeborenen verhindert BCG eine meningeale Tuberkulose oder bei Erwachsenen die disseminierte Form der Tuberkulose. Jedoch ist der Schutz vor einer Erkrankung im erwachsenen Alter variabel und in Ländern mit hoher Verbreitung schwach. Durch eine Koinfektion mit umweltbedingten Mykobakterien, die vor allem in den Entwicklungsländern verbreitet sind, könnte eine Kreuz-Reaktivität mit BCG entstehen, was die schwache Wirkung dieser Impfung teilweise erklärt (Weir et al. 2006). Durch das abgeschwächte Immunsystem mit HIV kann die BCG-Impfung nicht gegeben werden. Aus diesem Grund hat die WHO die Empfehlung für BCG-Impfung in Kindern mit HIV zurückgezogen, die hohes Risiko haben eine disseminierte Erkrankung mit BCG zu entwickeln ([http://www.who.int/immunization/wer8221bcg\\_May07\\_position\\_paper.pdf](http://www.who.int/immunization/wer8221bcg_May07_position_paper.pdf)).

Aufgrund des Bestrebens vieler Forscher haben es in den letzten Jahren mehrere Impfstoffe in die klinischen Studien geschafft (Tabelle 1.1). Diese Impfungen wurden als Ersatz für BCG und andere als Boosterimpfung entwickelt (Ottenhoff & Kaufmann 2012; Kaufmann et al. 2010).

**Tabelle 1.1: Die meist versprechendsten Impfkandidaten in klinischen Studien (Kaufmann et al. 2010).**

Typ	Kandidat	Beschreibung	Klinische Studie
<b>Rekombinantes BCG als Prime Impfung, vor der Erstinfektion</b>	VPM 1002	rBCG: Expression von Listeriolysin und Deletion von Urease-Gen	in Phase IIa
	rBCG30	rBCG: Expression von Ag85A	Phase I abgeschlossen/ Phase II anstehend
	Aeras-422	rBCG: Expression von Perfringolysin und Ag85A, 85B Rv3407	Phase I beendet wegen Nebenwirkungen
<b>Viraler Vektor als Boosterimpfung vor einer Erstinfektion</b>	Oxford MVA85A/Aeras-485	Modifiziertes Vaccinia Virus Ankara: Expression von Ag85A	In Phase II
	Crucell Ad35/Aeras-402	Replikation-defizienter Adenovirus 35: Expression von Ag85A, Ag85B, TB10.4	In Phase IIb
	AdAg85A	Replikation-defizienter Adenovirus 5: Expression von Ag85A	Phase I
<b>Fusionsproteine in Adjuvantien als Boosterimpfung vor der Erstinfektion</b>	Hybrid 1+IC31	Fusion von Ag85B und ESAT-6 in Adjuvans IC31	Phase I, bald in Phase IIa
	Hybrid 56+IC31	Fusion von Ag85B, ESAT-6 und Rv2660c in Adjuvans IC31	In Phase I

## 1.5 Das Immunsystem

Der menschliche Organismus ist ständigen Bedrohungen durch verschiedene pathogene Mikroorganismen ausgesetzt, die ständig mit dem Wirtsorganismus in Kontakt treten und Infektionen auslösen können. Zum Schutz vor eindringenden Erregern, wie Viren, Bakterien, Pilzen, Protozoen und Parasiten entwickelten die Säuger das Immunsystem. Es wird in das angeborene und adaptive Immunsystem unterteilt, welche unterschiedliche Aufgaben innehaben. So basiert die Immunität des angeborenen Immunsystems auf der Erkennung von konservierten Strukturen der Pathogene. Die adaptive Immunität jedoch kann spezifisch bestimmte Erreger erfassen. Das Immunsystem selber ist komplex indem beide Richtungen der Abwehr ineinander verflochten sind und gleichzeitig interagieren müssen um eine etablierte Infektion erfolgreich zu bekämpfen.

Im nachfolgenden Kapitel wird auf die allgemeinen Aspekte des Immunsystems und später verstärkt innerhalb der Thematik mit den Tuberkulose-Erregern und der Erkrankung eingegangen.

### 1.5.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem bildet die erste immunologische Verteidigungsbarriere gegen die eindringenden Erreger. Im Gegensatz zur adaptiven, ist die angeborene Immunabwehr weniger spezifisch und sofort wirksam. Sie erkennt Pathogene an ihren häufig vorkommenden Merkmalen mit Hilfe von keimbahnkodierten Rezeptoren. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um PRRs (*pattern recognition receptors*) wie TLRs (*Toll-like receptors*). TLRs erkennen bestimmte hochkonservierte Moleküle der Mikroorganismen, die PAMPs (*pattern recognition molecular patterns*), wie LPS (Lipopolysaccharid) durch TLR2 und TLR4, Flagellin durch TLR5 oder Doppelstrang-RNA durch TLR3. Die Aktivierung durch TLR führt zur Expression und Sezernierung von Zytokinen, Chemokinen und von Adhäsionsmolekülen (C. A. Janeway, Jr, P. Travers, M. Walport, 2005).

Die Immunzellen des angeborenen Immunsystems sind professionelle Phagozyten (z.B. Makrophagen und neutrophile Granulozyten) deren Aufgabe es ist, die Mikroorganismen mit Hilfe ihrer PRRs zu erkennen und durch Phagozytose unschädlich zu machen. Sie erkennen die Pathogene zusätzlich mit weiteren spezialisierten Oberflächenrezeptoren wie z. B. Mannose-Rezeptoren oder Scavenger-Rezeptoren. Mannose-Rezeptoren erkennen bestimmte Kohlenhydrate, die nicht auf Zellen der Säugetiere vorkommen und

so die Unterscheidung zwischen selbst und fremd ermöglichen (Stahl & Ezekowitz 1998). Scavenger-Rezeptoren binden an spezielle Lipoproteine (Bowdish et al. 2007). Zusätzlich exprimieren Phagozyten eine Reihe von Rezeptoren, die die Phagozytose von opsonisierenden Pathogenen verstärken (Fc-Rezeptoren). Bei der Phagozytose erzeugen Makrophagen und neutrophile Granulozyten noch eine Reihe weiterer toxischer Produkte, die beim Abtöten aufgenommener Mikroorganismen mitwirken. Die wichtigsten sind: Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), das Superoxidanion ( $O_2^-$ ) und Stickstoffperoxid (NO), welche für die Bakterien direkt toxisch sind. Falls es dem Wirtsorganismus nicht möglich ist die Pathogene effektiv zu beseitigen, wird eine adaptive Immunantwort ausgelöst, deren Leistungsfähigkeit auf ihrer Antigenpezifität und der Ausbildung von Gedächtniszellen beruht.

Das Bindeglied zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem bilden die Dendritischen Zellen (DZs). Sie zirkulieren durch den Organismus und nehmen gelöste Partikel, wie Antigene und auch apoptotische Partikel durch Endozytose oder Pinozytose auf (Schaible et al. 2003). Nach einem Kontakt mit fremden Antigenen wird die Reifung der DZs von einem unreifen zu einem reifen Stadium ausgelöst, die Aktivierung kann durch eine TLR-Stimulation passieren. Die Ausdifferenzierung der DZ zeigt sich durch Expression bestimmter Oberflächenrezeptoren, z.B. CD40, CD80 und CD86. Nachdem die DZ zu einer Antigen-präsentierenden Zelle (APZ) gereift ist, begibt sie sich auf eine Wanderung zu den lymphatischen Organen. Dort befinden sich die naiven T-Zellen, die mit ihren einzigartigen T-Zell-Rezeptoren (TZR) die MHC-Moleküle und die präsentierenden Antigene auf DZ gewissermaßen scannen. Die T-Zelle mit entsprechendem T-Zell-Rezeptor wird aktiviert und vermehrt sich in Folge einer klonalen Expansion (Christ 2009).

### **1.5.2 Die adaptive Immunantwort**

Das offensichtliche Merkmal der adaptiven Immunantwort ist die Bereitstellung von Lymphozyten, die ein Pathogen bzw. ein fremdes Partikel unter mehreren identifizieren können. Die Erkennung der Lymphozyten beruht auf der Diversität ihrer Rezeptoren, welche der genetischen Reorganisation, klonalen Selektion und Hypermutation (nur B-Zellen) unterliegt. Die Hauptakteure der adaptiven Immunität sind B- und T-Lymphozyten. Während die B-Zellen ihre Epitope mit Hilfe eines B-Zellrezeptors (BZR, BCR *B-cell receptor*), quasi eines membrangebundenen Antikörpers erkennen, müssen die Epitope der T-Zellen auf sogenannten MHC (*major histocompatibility complex*:

Histokompatibilitätskomplex) –Molekülen präsentiert werden. Daraus ergeben sich die Unterschiede beider Lymphozyttypen. Die B-Zellen können globuläre, die T-Zellen jedoch nur lineare Epitope erfassen. Die Immunität durch B-Zellen beruht auf der Sezernierung von Antikörpern ins Blut oder in den Mukus. Die Antikörper erkennen dreidimensionale Strukturen der Pathogene bzw. Partikel und neutralisieren diese durch Bindung. Auf diese Weise inhibieren Antikörper bestimmte Proteine oder Erreger in ihrer Wirkungsweise und Ausbreitung. Des Weiteren können so markierte Fremdkörper besser von den Zellen des nativen Immunsystems erkannt und dann eliminiert werden. Die T-Lymphozyten sind die Zell-vermittelte Abwehr der adaptiven Immunität. Ein Teil dieser T-Zellen kann direkt infizierte oder entartete Zellen lysieren oder andere Zellen aktivieren, damit diese anschließend ihre Funktion ausüben können (z.B. mit Mtb infizierte Makrophagen) (C. A. Janeway, Jr, P. Travers, M. Walport 2005).

Da sich diese Arbeit ausschließlich mit T-Zellen beschäftigt, wird im Folgenden nur dieser Zelltyp behandelt.

### **1.5.2.1 T-Zell-Rezeptor**

Die T-Zellen stammen wie B-Zellen von lymphoiden Vorläuferzellen ab, die jedoch im Thymus ausreifen. Die T-Zellen tragen einen membranständigen Rezeptor, der die Bindung mit dem passendem Epitop-MHC-Komplex eingehen kann. Jeder T-Zell-Rezeptor besteht aus zwei transmembranen Ketten,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten bzw.  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten. Den Großteil der T-Zellen machen die  $\alpha\beta$ -T-Zellen aus, der restliche geringe Anteil der zirkulierenden T-Zellen besitzt den  $\gamma\delta$ -Rezeptor. Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen finden sich hauptsächlich in der Mukosa und Submukosa. Sie erkennen bevorzugt phosphorylierte Antigene. Man vermutet, dass diese T-Zellen für die frühe, wenig spezifische Abwehr in Haut und Schleimhäuten verantwortlich sind (Riganti et al. 2012).

Die Ketten der  $\alpha\beta$ -Rezeptoren werden von V- (*variable*), D- (*diversity*) und J- (*joining*) Gensegmenten kodiert. Die einzelnen Segmente werden auf Chromosom 14 ( $\alpha$ -Kette; 50 kDa) und Chromosom 7 ( $\beta$ -Kette, 39 kDa) kodiert (Garboczi et al. 2010). Die Rezeptoren bestehen aus zwei membranständigen konstanten ( $C\alpha$  und  $C\beta$ ) und zwei extrazellulären ( $V\alpha$  und  $V\beta$ ) Domänen. Die beiden extrazellulären Domänen sind variabel und bilden die Bindungsstelle zum MHC-Peptid-Komplex (Townsend et al. 1986). Während der Entwicklung im Thymus werden in unreifen T-Lymphozyten die  $\alpha$ -Kette aus V- (70-80) und J (61)-Segmenten, die  $\beta$ -Kette aus V- (52), J-(2) und D-(13) Segmenten und je einer C-Kette zusammengesetzt, wobei es bei der  $\beta$ -Kette zwei Gen-Variationen der konstanten Region gibt (Rowen et al. 1996). Die mögliche Genumlagerung dieser Segmente (somatische

Rekombination) sowie ein zufälliges Einfügen oder Entfernen einzelner Nukleotide (junktionale Diversität) kann zur einer theoretischen Diversität von  $10^{18}$  Möglichkeiten in der variablen Region führen (Willerford et al. 1996; Jouvin-Marche et al. 2009). Die distalen Enden der variablen Region enthalten hypervariable CDR-Schleifen (Komplementaritätsbestimmende Regionen, *complementary determining regions*), die die Epitopdiversität der TZR festlegen. Studien an kristallinen TZR-MHC-Peptid-Komplexen zeigen eine diagonale Orientierung des TZR, die den Kontakt an den Peptid-Komplex erlaubt und somit den hochvariablen CDR3 zur Erkennung positioniert. Diese Art der augenscheinlichen Wechselwirkung ist in den variablen Regionen der  $\alpha$ -Kette und des  $V\beta$  Segments, die mit MHC interagieren, kodiert (Morris & Allen 2012).

Die Signalübertragung des TZR geschieht über den CD3 (*cluster of differentiation*) Protein-Komplex, welcher an TZR assoziiert ist. Der Korezeptor CD3 besteht aus sechs verschiedenen transmembranen Molekülen, jeweils eine  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette und je zwei  $\epsilon$ - und  $\zeta$ -Ketten (Call et al. 2002). Zusätzlich ist noch ein Differenzierungsrezeptor an den TZR assoziiert, der Korezeptor CD4 oder CD8. Dieser legt unter anderem die Spezifität der T-Zellen fest. Jeder T-Lymphozyt exprimiert CD4 oder CD8 auf seiner Oberfläche, welches die Bindung mit dem jeweiligen MHC-Molekül einget. CD4 bindet an das MHC Klasse II-Molekül und CD8 an das MHC Klasse I-Molekül (Cammarota et al. 1992; Salter et al. 1990). Der T-Zell-Rezeptor-Komplex besteht aus dem TZR, CD3-Korezeptor und der  $\zeta$ -Kette. Nach der Erkennung eines passenden MHC-Peptid-Komplexes und der Bindung des jeweiligen Korezeptors (CD4 bzw. CD8) an das MHC-Molekül kommt es zur Konformationsänderung und zur Phosphorylierung der ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Durch die Phosphorylierung wird die Signaltransduktionskaskade in den Zellkern ausgelöst.

### **1.5.2.2 Die T-Zell Entwicklung**

Die lymphoide Vorläuferzelle wandert zur Reifung zum T-Lymphozyten in den Thymus. Zu dieser Zeit besitzt die T-Zelle keine CD4- oder CD8-Rezeptoren und wird als „doppelt-negativ“ gekennzeichnet. Währenddessen erfährt sie die ersten Ausdifferenzierungssignale und exprimiert kurz darauf CD44 und CD25 (Zúñiga-Pflücker & Lenardo 1996). Im Anschluss beginnt in dem T-Lymphozyten das Arrangieren von Gensegmenten für den TZR. Bei einer erfolgreichen Rekombination der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten kann die Zelle sich in eine  $\gamma\delta$  T-Zelle entwickeln bzw. zu einer  $\alpha\beta$ -Zelle nach erfolgreicher Rekombination der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten. Alle anderen Zellen, die keinen funktionalen Rezeptor haben, gehen in den Zelltod. Weiter wird die gleichzeitige Expression von CD4 und CD8 (doppelt-positiv) eingeleitet. Daran anschließend durchlaufen die jungen T-Zellen zwei wichtige Kontrollen. Zum einem

muss der Rezeptor das körpereigene, epitheliale HLA-Molekül mit einem gebundenen Peptid erkennen (positive Selektion). Ist dies nicht der Fall, wird die Zelle in die Apoptose geschickt. Währenddessen wird festgelegt zu welchen Subtypen die T-Zellen werden. Bei schwacher Bindung an den MHC-Rezeptor wird die Expression des Korezeptors ausgeschaltet, welcher den MHC-Peptid-Komplex nicht erkennt. Die positive Selektion sortiert hier alle T-Zellen aus, welche keine Bindungskapazität zum MHC haben und womöglich generell keine Epitope erfassen können. Das zweite Selektionskriterium basiert auf der Erkennung des TZR von Selbstpeptiden, die durch MHC präsentiert werden. In diesem Schritt sollen alle autoreaktiven T-Zellen aussortiert werden (negative Selektion). Bei einer zu starken Bindung an thymusspezifische MHC-Peptid-Komplexe wird der Zelltod induziert (Jameson et al. 1995). In ihrer Entwicklungsphase und weiterer Lebensspanne müssen die jungen T-Zellen eine gewisse Bindungskapazität gegenüber körpereigenen, auf MHC präsentierten Peptiden zeigen. So könnten die wichtigsten schwach affinen Interaktionen einer T-Zelle diejenigen zwischen ihrem eigenen TZR und den auf MHC präsentierenden Antigenen des Thymus sein, die das T-Zell-Repertoire während der Entwicklungsphase festlegen (Morris & Allen 2012). Zuletzt wandert die ausgereifte naive T-Zelle aus dem Thymus in die Lymphknoten ein bzw. zirkuliert durch das Blutkreislaufsystem (Picker 1994). In den Lymphknoten kontrollieren die naiven T-Zellen die APZs und deren MHC-Peptid-Komplexe nach potentiellen Fremdliganden. Die naiven T-Zellen können mehrere Jahre alt werden, ihre Überlebenssignale erhalten sie ähnlich der positiven Selektion durch die schwache Bindung an Selbst-MHC-Peptid-Komplexe (Kirberg et al. 1997). Tote Zellen werden durch die Teilung von naiven T-Zellen oder durch Nachschub aus dem Thymus ersetzt, somit bleibt die Anzahl an Lymphozyten gleich (Hayden et al. 1996).

### **1.5.3 Die T-Zell-Subtypen**

Die T-Zellen werden in zwei Hauptgruppen aufgrund ihrer auf der Oberfläche exprimierten Ko-Rezeptoren unterteilt, den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden auch T-Helferzellen (*T helper cells*, Th) genannt, da sie hauptsächlich andere mitwirkende Zellen des Immunsystems aktivieren können. Die meisten CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben die Fähigkeit infizierte Zellen und auch sonst entartete Zellen zu lysieren, deswegen hat man ihnen den Namen Killerzellen verpasst.

### **1.5.3.1 CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen bilden die eine große Hauptgruppe der Lymphozyten, die in weitere Subgruppen unterteilt wird: den Th1- (*T helper 1*, T-Helferzelle 1), Th2-, Th17- und Treg- (*regulatory t cells*) Zellen. Diese Subgruppen werden anhand ihrer Funktion und des Zytokinsekretionsmusters während einer Immunantwort unterschieden. Zudem hängt die Differenzierung zu unterschiedlichen Subtypen von vorherrschendem Zytokinmilieu während ihrer Aktivierung ab.

Die Th1-Zellen sind die Vermittler der zellulären Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene. So aktivieren Th1-Zellen durch die Sekretion von IL-2 (Interleukin 2), IL-3, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ ) die zytotoxischen Immunzellen wie CD8<sup>+</sup> Zellen und Makrophagen (Wan 2010a; Wan 2010b). CD8<sup>+</sup> Zellen können folgend durch bestimmte Tötungsmechanismen infizierte Zellen töten und Makrophagen besser aufgenommene Erreger verdauen. Die Ausdifferenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> Zellen in Th1-Zellen bedarf der Stimulation dieser mit IL-12 und weiterer kostimulatorischer Moleküle. Dieses Zytokinmilieu wird durch Toll-Like Rezeptoren wie TLR2 induziert (Brightbill et al. 1999; Means et al. 1999; O'Garra & Arai 2000). Der Gegenspieler von Th1 sind die Th2-Zellen, die beiden T-Helferzellen sind Antagonisten. Durch die Aktivierung von einem Zelltyp wird der andere gehemmt, somit wird die einmal eingeschlagene Richtung der Immunantwort beibehalten. Th2-Zellen werden aktiv nach einer Infektion mit extrazellulären Erregern, die mit Hilfe einer Antikörper-Antwort bekämpft werden können. So produzieren Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 (Wan 2010a). Sie aktivieren naive B-Zellen zur Differenzierung in Plasmazellen und zur Freisetzung der Antikörper, die wiederum extrazelluläre Partikel neutralisieren (Parker 1993). Die Th17-Zelle ist eine relativ neuentdeckte Subpopulation der CD4<sup>+</sup> Zellen und das Hauptzytokin dieser Gruppe ist IL-17 (Harrington et al. 2005). Th17-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegenüber eindringenden Pathogenen wie Bakterien und Pilzerreger indem sie Neutrophile rekrutieren (Ye et al. 2001; Wan 2010a). Zusätzlich wird ihnen ein Beitrag zu Entzündungsprozessen und Autoimmunerkrankungen nachgesagt (Pulendran & Artis 2012). Treg ist eine Subgruppe, die charakteristisch für CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> Rezeptoren und die Expression vom Transkriptionsfaktor FoxP3 ist (Hori et al. 2003; Wan 2010a). Während andere CD4<sup>+</sup> Subgruppen der T-Zellen eine Immunantwort vermitteln, besteht die Aufgabe der Treg-Zellen in der Suppression der Immunantwort. Sie sind für die Einhaltung der Homöostase und Selbst-Toleranz zuständig (Sakaguchi 2004).

### **1.5.3.2 CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung zu zytotoxischen T-Zellen (*Cytotoxic T-Lymphocytes*, CTLs) und können virusinfizierte und entartete körpereigene Zellen direkt angreifen und abtöten. Der CD8-T-Zell-Rezeptor erkennt etwa 8-10 Aminosäuren lange Peptide, präsentiert auf MHC-Klasse-I-Molekülen, die von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert werden. Ihre Fähigkeit direkt Zellen abzutöten, erfolgt über die Freisetzung von zytotoxischen Proteinen, wie Perforin, Granzym und Granulysin, die lytisch auf die Zielzelle wirken (Barry & Bleackley 2002; Masson et al. 1986). Zusätzlich exprimieren CD8<sup>+</sup> Zellen den Fas-Liganden, der nach der Bindung an den Todesrezeptor Fas die Zellen der Wahl in die Apoptose schickt (Stalder et al. 1994). Nach ihrer Aktivierung sezernieren CD8<sup>+</sup> Lymphozyten proinflammatorische Zytokine wie IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  (Sasiain et al. 1998).

### **1.5.4 Die T-Zell-Aktivierung**

Die naiven T-Zellen werden über die Interaktion von MHC-Peptid-Komplex auf APZs (meist DZ) aktiviert. Durch die Bindung des TZR an den MHC-Peptid-Komplex entsteht eine immunologische Synapse, welche eine Zeitlang stabil ist (Lee et al. 2002). Zusätzlich braucht die T-Zelle weitere Signale zur kompletten Aktivierung und Umwandlung in eine Effektorzelle, ohne dieses zweite Signal wird sie nach der Ausbildung der immunologischen Synapse anerg. Das zweite Signal bekommt die T-Zelle über den Rezeptor CD28, an den kostimulatorische Moleküle der APZ, CD80 und CD86, binden (Gonzalo et al. 2001). Auf diesem Wege wird zusätzlich ein Schutz vor selbst-reaktiven T-Zellen gewährleistet (Guerder et al. 1994). Daraufhin wird in der T-Zelle durch den autokrinen Einfluss des Wachstumsfaktors IL-2 die klonale Expansion induziert (Appleman et al. 2000) und sie kann unter der Einwirkung weiterer Zytokine zu einer Effektorzelle differenzieren (Mempel et al. 2004). Die Ausdifferenzierung und Expansion dauert in der Regel ca. 5 Tage. Nachdem die Infektion erfolgreich bekämpft wurde, bleiben nur wenige Effektorzellen übrig, der Rest geht in die Apoptose. Diese überlebenden Lymphozyten bilden die Population der Gedächtnis-T-Zellen. Im Falle einer erneuten Infektion bzw. Kontakt mit dem Antigen brauchen sie keine weiteren kostimulatorischen Signale, folglich wird die Immunantwort schneller ausgelöst (Rogers et al. 2000).

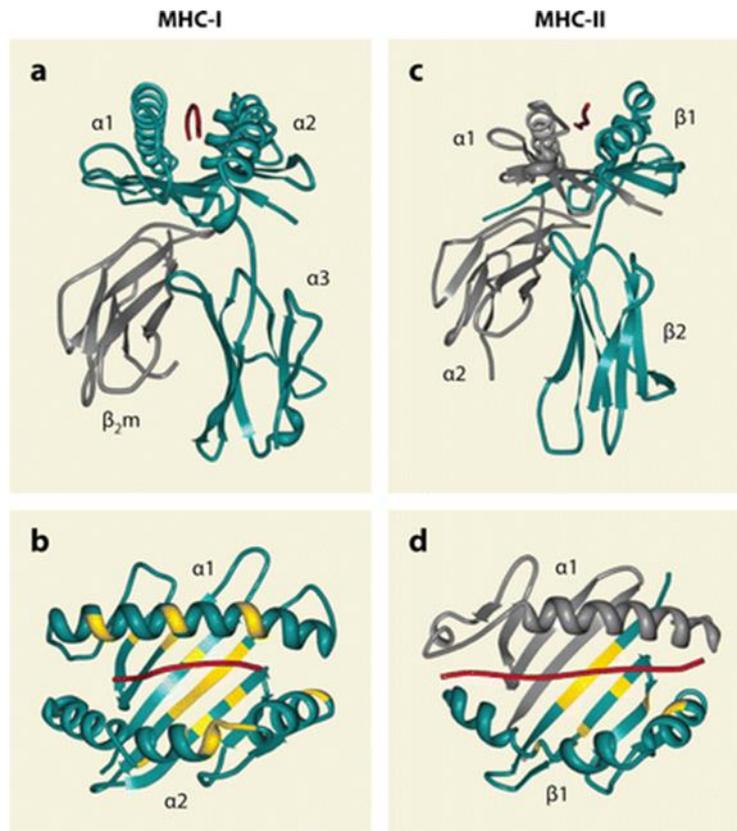
### 1.5.5 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

Die T-Zellen können ihr spezifisches Antigen im Verband mit Körper-eigenen MHC-Molekülen erkennen (Zinkernagel & Doherty 1974). Die MHC-Moleküle sind membranständige Glykoproteine und machten erstmals im Kontext mit Transplantationsabstoßung auf sich aufmerksam, daher ihr Name „*major histocompatibility complex*“. Die humanen Moleküle heißen HLA (*human leukocyte antigen*) und wurden erstmals auf Leukozyten entdeckt. Die Moleküle für das humane MHC werden auf dem Chromosom 6 kodiert. Es gibt drei MHC-Proteingruppen, wobei die Gene für MHC Klasse III keine Oberflächen-präsentierenden Moleküle kodieren, sondern vielmehr andere Mediatoren des Immunsystems, wie z.B. die Komplementfaktoren (Colten 1984). Die zwei anderen Proteinklassen, MHC I und MHC II, haben ihre Aufgabe in der Präsentation von Peptiden unterschiedlicher Herkunft und Länge. Die Gene für das humane HLA sind polygen und werden kodominant exprimiert. Das bedeutet: ein einzelner Mensch exprimiert bis zu sechs verschiedene HLA-Moleküle einer Proteinklasse. Ergänzend findet man bei keinem anderen Protein eine so hohe genetische Variabilität. Die MHC Klasse I- und Klasse II-Moleküle unterscheiden sich voneinander in ihrem Aussehen, Aufbau, der Peptidbindung, der Antigen-Quelle und Aktivierung ihrer T-Zell-Subtypen. Für MHC Klasse I sind bisher 7.089 Allele mit insgesamt 5126 unterschiedlichen Proteinsequenzen und für MHC Klasse II 2065 Allele mit 1491 Proteinen bekannt (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>; Release: 3.12,0/2013-04-17).

Das MHC Klasse I-Molekül besteht aus einer 43 kDa schweren  $\alpha$ -Kette und dem 13 kDa leichten  $\beta_2$ -Mikroglobulin, welches als einziges Protein der HLA-Gruppe auf Chromosom 15 kodiert wird. Die  $\alpha$ -Kette wird in drei Domänen unterteilt, die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domänen bilden durch  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter die Peptidbindungsfurche. An der  $\alpha_3$ -Domäne befindet sich ein Membrananker, welcher das Molekül in der Zellmembran verankert (Abbildung 1.2 a und b) (Madden et al. 1993). Das  $\beta_2$ -Mikroglobulin ist mit der  $\alpha$ -Kette nicht-kovalent assoziiert. Die Bindungsfurche dieser HLA-Moleküle hat Platz für Peptide der Länge von 8-12 Aminosäuren (Rammensee 1995). Das Peptid liegt in gestreckter Form und wird über Ankeraminosäuren am Carboxy- und Aminoterminus festgehalten (Bouvier & Wiley 1994). Zusätzlich wird das Peptid über Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen in der Bindungsfurche stabilisiert. Durch die Aminosäure-Ankerpositionen können Peptide verschiedenen Ursprungs aber mit gleichen Anker-Aminosäuren auf demselben HLA-Molekül präsentiert werden (Falk et al. 1991). Die Präsentation der Klasse I-Peptide findet man auf allen kernhaltigen Zellen, wobei die Expressionsstärke vom Zelltyp abhängig ist. Die präsentierten Peptide sind meist zytosolischen Ursprungs und werden von CD8<sup>+</sup>

T-Zellen erkannt. Somit werden größtenteils eigene oder entartete Eigenproteine, während einer Infektion virale bzw. intrazelluläre Pathogenproteine präsentiert. Teils findet man im Falle einer Kreuzpräsentation auch Proteine extrazellulärer Herkunft. Die Kreuzpräsentation kann z.B. durch Übergang endogener Proteine aus frühen Endosomen ins Zytosol passieren (Heath & Carbone 2001; Amigorena & Savina 2010).

Die MHC Klasse II-Moleküle bestehen im Vergleich zu MHC I aus einer  $\alpha$ -Kette (34 kDa) sowie einer  $\beta$ -Kette (29 kDa), die in je zwei Domänen unterteilt sind (Abbildung 1.2 c und d). Die konstanten Domänen  $\alpha 2$  und  $\beta 2$  bilden die Membran-ständigen Untereinheiten. Die Peptidbindungstasche wird aus den Domänen  $\alpha 1$  und  $\beta 1$  gebildet und bindet Peptide von ca. 13 bis über 20 Aminosäuren Länge. Dabei erfolgt keine Bindung des Carboxy- und Aminoterminus des Peptids wie bei MHC I, sondern das Peptid wird über die Interaktion mit den Seitenketten der Bindungstasche und Wasserstoffbrücken des Peptidrückgrats (*backbone*) stabilisiert. Die Enden der Furche bleiben offen, womit Peptide längerer Sequenz präsentiert werden können (Rammensee 1995). Die MHC Klasse II-Moleküle werden hauptsächlich auf DZs, Makrophagen und B-Zellen exprimiert. Diese Zellen nehmen Partikel auf und prozessieren sie um die Antigene exogenen Ursprungs den CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu präsentieren. Bei der Autophagie können prozessierte Peptide endogener Herkunft auf MHC II-Moleküle geladen werden (Dengjel et al. 2005). Es gibt drei klassische MHC Klasse II-Moleküle: HLA-DR, HLA-DP und HLA-PQ. Diese Moleküle sind noch divergenter als MHC Klasse I, da manche Menschen mehr als ein Gen für die  $\beta$ -Kette haben.



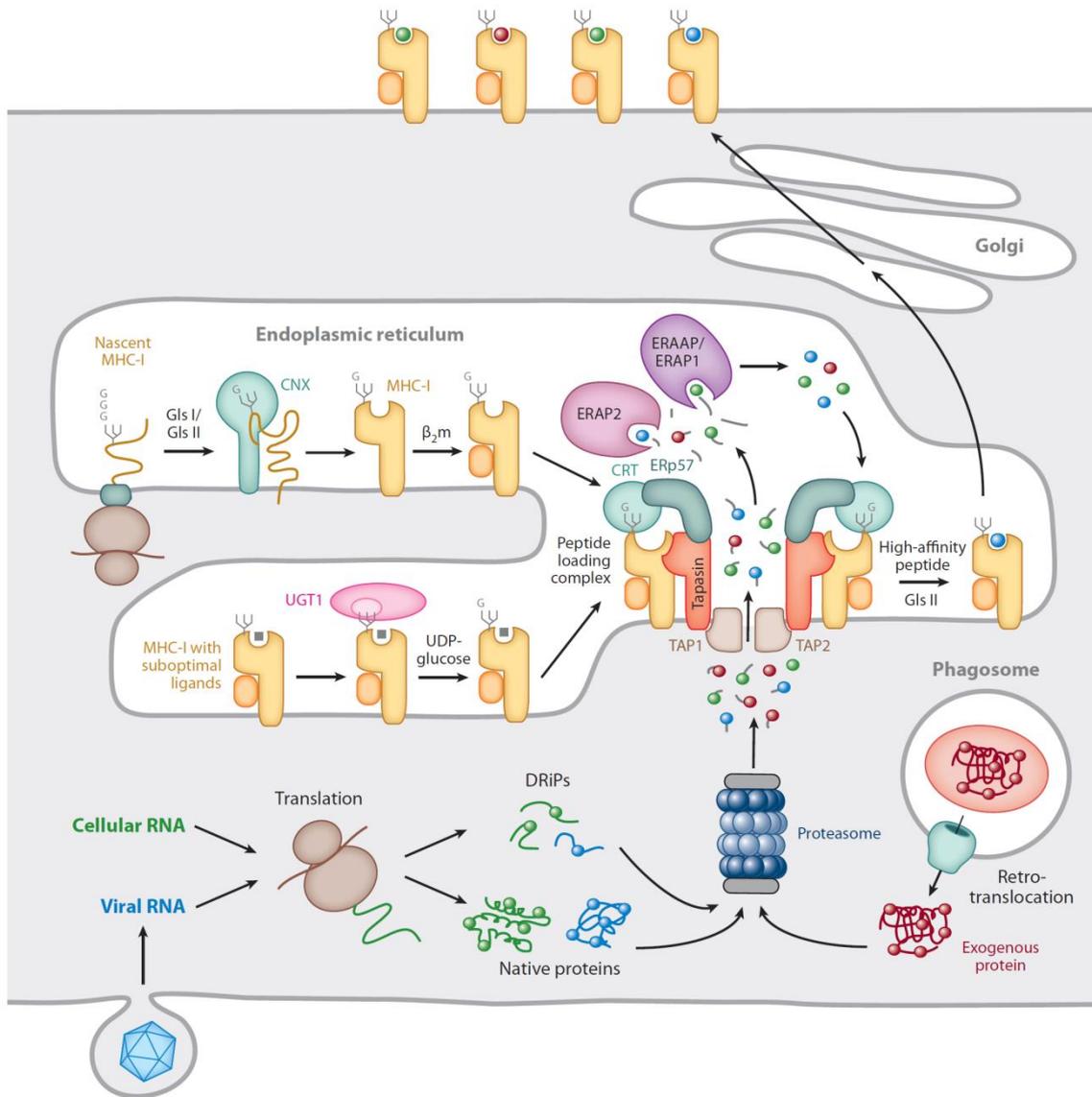
**Abbildung 1.2: Die dreidimensionale Struktur von MHC-Klasse I und MHC Klasse II und ihrer Liganden.**

In Abbildung (a) ist das MHC Klasse I bzw. HLA-A2-Molekül dargestellt. Die schwere  $\alpha$ -Kette, eingeteilt in  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - und  $\alpha 3$ -Domänen, wurde blau dargestellt. An das MHC-Molekül ist die  $\beta 2m$ -Kette assoziiert (grau). Die Peptidbindungsfurche wird aus  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Untereinheiten gebildet (b). In (c) wird MHC Klasse II bzw. HLA-DR1 mit seiner  $\alpha$ - (grau) und  $\beta$ -Kette (blau) gezeigt, wobei hier die Peptidbindungsfurche aus  $\alpha 1$ - und  $\beta 1$ -Domänen gebildet wird (d). In Rot: Ligand des jeweiligen Moleküls. Mit Gelb wurden die polymorphen Enden der MHC Moleküle dargestellt. Abbildung von Blum et al. 2013.

### 1.5.5.1 Die Peptid-Beladung

Die Präsentation der Peptide unterschiedlicher Herkunft auf verschiedenen MHC-Klassen ist die Folge der verschiedenen Prozessierungswege der MHC-Moleküle und ihrer gebundenen Peptide. Die Bildung von Peptiden des MHC Klasse I erfolgt zuerst über das Proteasom (Abbildung 1.3). Im Proteasom kommen alle zu degradierenden Proteine an und werden in 8-25 Aminosäuren große Peptide gespalten, längere Peptide werden am N-Terminus weiter von Aminopeptidasen getrimmt. Durch die Spaltung bestimmt das Proteasom den C-Terminus der Peptide. Durch die Aktivierung mit IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  werden die katalytisch aktiven Untereinheiten ausgetauscht und das Proteasom wird zum Immunproteasom,

welches noch mehr affine Peptide zuschneidet. Anschließend werden diese ins ER mit Hilfe eines Transporters (*transporter associated with antigen processing*: TAP) transloziert, in dem sich auch unreife MHC Klasse I-Moleküle befinden. TAP ist ein Heterodimer aus TAP1 und TAP2 und bindet Peptide in seiner bevorzugten Länge von 8-12 Aminosäuren, unter ATP-Verbrauch werden diese ins ER geschleust (Neefjes et al. 1993). Der letztendliche Zusammenbau des MHC-Peptid-Komplexes erfolgt im ER mit Hilfe des PLC (*peptide loading complex*). Dazu sind mehrere Chaperone wie Calnexin, Tapasin und Calreticulin nötig. Kurz zusammengefasst: die schwere Kette des MHC Klasse I-Moleküls wird durch Calnexin in seinem partiell gefalteten Zustand bis zur Bindung mit der kurzen  $\beta$ -Kette stabilisiert. Das weiterhin instabile Heterodimer wird sodann durch Calreticulin und Tapasin dem PLC zugeführt. Beide Chaperone stabilisieren das leere MHC-I/ $\beta$ 2-Mikroglobulin zur Peptidbeladung und stellen Kontakt zu TAP her. Die im ER befindlichen Peptide mit einer längeren Sequenz werden von ER-Aminopeptidasen (ERAAP/ERAP1 und ERAP2) auf eine Länge von 8-12 Aminosäuren zugeschnitten. Die Beladung wird koordiniert durch Tapasin, Calreticulin und ERp57. Der fertige MHC-Peptid-Komplex wird auf die Zelloberfläche durch den Golgi-Apparat transportiert. Dabei trägt die Bindung eines Peptids erheblich zur Stabilisierung des MHC-Moleküls bei, denn unbeladene MHC-Moleküle zerfallen rasch und werden wieder zum erneuten Versuch einer Beladung internalisiert (Blum et al. 2013).

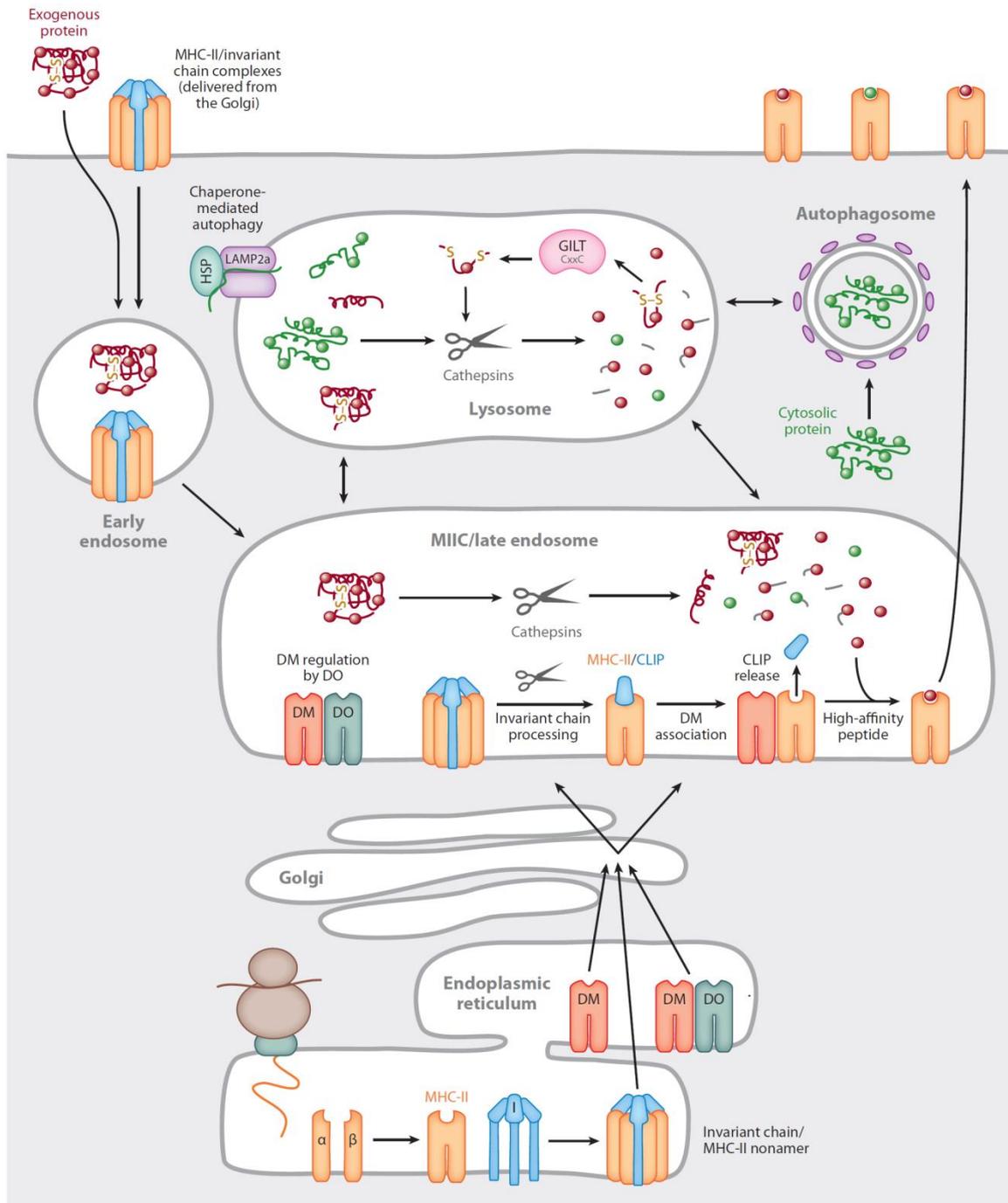


**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der MHC Klasse I-Synthese und Antigenprozessierung.**

Die zellulären Proteine werden durch den proteosomalen Abbau in kurze Peptidfragmente gespalten und über den TAP-Transporter ins ER geschleust. Glucosidase I und II (GlsI/GlsII) ermöglichen die Interaktion von schwerer Kette mit Calnexin (CNX). Die erste Stabilisierung der neu synthetisierten schweren Kette erfolgt über die Assoziation von CNX und  $\beta$ 2-Microglobulin ( $\beta$ 2m). Anschließend wird das instabile Heterodimer zur hochaffinen Peptidbindung durch Calreticulin (CRT) bis zum PLC (*Peptide Loading Complex*) geschleust. Die Peptide werden mit ER-Aminopeptidasen ERAAP/ERAP1 und ERAP2 auf eine Länge von 8-12 Aminosäuren geschnitten, zuletzt gelangen die Peptide über den Tapasin-vermittelten Prozess auf MHC. Der nun stabile MHC-Peptid-Komplex gelangt über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche. UGT1, ein Enzym für MHC I-Moleküle mit suboptimalen Peptiden, ermöglicht den Wiedereintritt von MHC Klasse I ins PLC zum Austausch mit hoch-affinen Peptiden. Abbildung von Blum et. al. 2013.

Die MHC II-Moleküle werden auf anderem Wege mit Peptiden aus extrazellulären Proteinen beladen (Abbildung 1.4). Die phagozytierten Proteine werden zunächst zu Peptiden verdaut,

indem das Phagosom mit dem Lysosom verschmilzt. Durch das Ansäuern der Vesikel werden sogenannte Cathepsine aktiv, die die Proteine in Peptide spalten. Die MHC-II- $\alpha$ - und - $\beta$ -Ketten werden direkt im ER synthetisiert und gelangen durch einen vesikulären Transport über das ER und den Golgi-Apparat in das MHC-II-Beladungskompartiment (MIIC; *lysosome-like-antigen-processing-compartments*), indem sie mit den Peptiden beladen werden (Kvist et al. 1982). Dieses fusioniert mit den Vesikeln, die die Peptide beinhalten. Die Peptidbindungsfurche wird mit einem Teil, CLIP, der invarianten Kette besetzt (*class II-associated invariant chain peptide*), dies verhindert eine verfrühte Beladung des MHC-Moleküls im ER. Im Endosom wird die invariante Kette durch aktivierte Cathepsine mehrfach gespalten bis nur das CLIP verbleibt (Xu et al. 1994). Der Austausch, CLIP gegen Peptid, wird reguliert und katalysiert durch HLA-DM und HLA-DO (Denzin et al. 1996; Denzin et al. 1997). Die MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexe werden zur Plasmamembran der APZ transportiert und der CD4<sup>+</sup> T-Zelle präsentiert. Autophagosomen können ebenfalls mit dem MIIC fusionieren und so intrazelluläre Peptide in den Beladungsweg schleusen (Münz 2012).



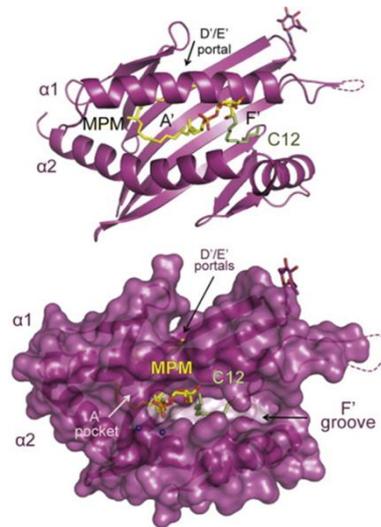
**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der MHC Klasse II-Synthese und Antigenprozessierung.**

MHC-II  $\alpha$  und  $\beta$  werden direkt im ER synthetisiert und assoziieren mit der invarianten Kette (Ii, *invariant chain*). Dieser Komplex wird in das späte Endosom (das MIIC) transportiert, indem die invariante Kette proteolytisch zum CLIP gespalten wird, welches die Peptidbindungsfurche belegt. Daneben werden Proteine zunächst über Endo- oder Phagozytose in Vesikel, frühes Endosom (*early endosome*), aufgenommen. Die Senkung des pH-Wertes führt zu einer Aktivierung von Proteasen, wie Cathepsine, die die extrazellulären Proteine in kürzere Bruchstücke spalten. Die frühen Endosomen fusionieren mit MIIC und die Peptidbeladung wird durch HLA-DM und HLA-DO reguliert und katalysiert. Der fertige MHC-Peptid-Komplex wird auf die Zellmembran zur Präsentation transportiert. Die Autophagosomen können ebenfalls mit Lysosom und anschließend mit MIIC zur Kreuz-Präsentation fusionieren. Abbildung von Blum et. al. 2013.

### **1.5.5.2 CD1-Moleküle und Präsentation**

CD1-Moleküle gehören zu der Familie der MHC Klasse I-ähnlichen Proteinen, deren Aufgabe es ist, Lipid-basierte Antigene zu präsentieren. Die CD1-Moleküle werden im Chromosom 1 kodiert. Im Gegensatz zu den MHCs ist CD1 monomorph. Das humane CD1 teilt sich in zwei Gruppen, Gruppe 1 CD1 (CD1a, CD1b und CD1c) und Gruppe 2 (CD1d), die anhand ihrer Genetik, Sequenzhomologie und Funktion aufgliedert wurden. Die Moleküle der Gruppen 1 und 2 präsentieren ihre Antigene auf der Zelloberfläche. CD1e übt eine intrazelluläre Chaperonaktivität aus. CD1 wird auf unterschiedlichen Zellen mit unterschiedlicher Stärke exprimiert. Das CD1 findet man stärker exprimiert auf zirkulierenden und Milz B-Zellen, weniger auf Monozyten und APZs. Weiter findet man CD1d auf Zellen unterschiedlicher Gewebe, wie Thymozyten, Epithelzellen und Parenchymzellen. CD1c ist typisch für DZs, zusätzlich wird es auf weiteren Zellen des Immunsystems exprimiert, nämlich Langerhans-Zellen und Subtypen der B-Zellen (Brigl & Brenner 2004; Adams 2013).

Die CD1-Moleküle sehen auf dem ersten Blick aus wie die klassischen MHC-Moleküle mit einer Furche aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern. Bei näherer Betrachtung zeigen sich zwei „Haupttunnel“, die tief in die Plattform eindringen (Abbildung 1.5). Die Tunnel bzw. Taschen werden A' bis F' benannt, die Tiefe der Tunnels und ihre Anzahl bestimmen die Bindung und die Diversität der präsentierten Antigene.



**Abbildung 1.5: Die Struktur eines CD1-Oberflächenmoleküls der Gruppe 1, CD1c.**

Angezeigt wird die typische MHC-ähnliche Struktur des CD1c-Moleküls mit  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern. Das CD1c präsentiert ein Lipid aus *M. tuberculosis*, das MPM (*mannosyl- $\beta$ 1-phosphomycoketide*); in Gelb dargestellt. Das CD1c-Molekül hat die A' und F' Taschen. Das D'/E'-Portal und offene F'-Tasche bietet zusätzlich „Stauraum“ für die Lipopeptide und Mykoketide, welche in der Furche präsentiert werden können. Abbildung von Adams 2013.

CD1-Moleküle werden im ER synthetisiert und im gleichen Kompartiment mit endogenen Antigenen beladen um zuletzt auf der Zelloberfläche präsentiert zu werden. Die CD1-Moleküle werden dann wiederaufgenommen und in die endosomalen Kompartimente transportiert, wobei der Transport durch die Sequenzmotive des zytoplasmatischen Endes bestimmt wird. Durch den Transport wird das unterschiedliche Antigen-Repertoire einzelner CD1-Moleküle festgelegt. CD1a hat kein eindeutiges „Transport“-Motiv und wird deswegen in die frühen recycelten Endosomen getragen. CD1b kommt in späten Endosomen und Lysosomen an, CD1c wird als einziges durch alle Kompartimente transportiert und CD1d sammelt seine Antigene in frühen und späten aber nicht in recycelten Endosomen. Nachdem die CD1-Moleküle die Zielkompartimente durchwandert haben und mit ihren neuen Antigenen beladen wurden, werden sie zurück auf die Zelloberfläche zur Präsentation gebracht. Die CD1-Moleküle präsentieren bevorzugt Lipide mit zwei Fettsäure-Ketten und binden Lipide mit einem Hydrokarbonrest. Die  $\alpha$ -gekoppelten Glykolipide finden sich nur in Prokaryonten und sind ein guter Marker für eine bakterielle Infektion. Die Länge der präsentierenden Lipide entscheidet über die Erkennung und Aktivierung der Immunzellen, wie bei humanem Phosphodolichol, das längere Polyprenol-Ketten (C90 - 100) hat (Brigl & Brenner 2004; Adams 2013).

## 1.6 *M. tuberculosis* und das Immunsystem

Mtb wird über die Tröpfcheninfektion übertragen. Obwohl die Tuberkulose sich in allen Organen manifestieren kann, entwickelt sich die Extrapulmonare TB in weniger als 10 % der Fälle. Die Lunge ist der bevorzugte Ort der Infektion, sich ergebend durch den Infektionsweg, welcher durch die Atemwege stattfindet (Kaufmann 2001). Wegen der Wachs-artigen Zellwand sind die Mykobakterien unempfindlicher gegenüber löslichen antimikrobiellen Komponenten der Lunge, wie Surfactant-Protein A und D, die von residenten Zellen der Alveolaren als erste Barriere sezerniert werden (Torrelles et al. 2008). In der Lunge wird der eingedrungene Erreger von professionellen phagozytierenden Zellen, wie Makrophagen, Neutrophilen, Monozyten und DZs, eventuell von Fibroblasten, phagozytiert (Wolf et al. 2007; Ernst 2012). Die Phagozyten erkennen Mykobakterien mit Hilfe der TLR: z.B. TLR2 und TLR4 erkennen mykobakterielle Lipoproteine (19 kDA Lipoprotein), und TLR9 ist der Ligand von mykobakterieller DNA (Wolf et al. 2008; Bafica et al. 2005). NOD2 (*nucleotide oligomerization domain 2*) ist ein intrazellulärer Rezeptor für bakterielles Peptidoglykan, welcher nach der Erkennung den NFκB-Signalweg aktiviert (Girardin et al. 2003; Inohara & Nuñez 2003). Die Aktivierung der Rezeptoren, wie TLR, individuell oder als Kollektiv führt zur Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, bestimmten Chemokinen und zellulären Adhäsionsrezeptoren, welche zur lokalen und systemischen Immunzell-Mobilisierung und Aktivierung nötig sind (J. A. Philips & Ernst 2012; Cooper 2009).

Die Akkumulation dieser Phagozyten sollte der Eindämmung bzw. Beseitigung von Pathogenen dienen, doch im Falle der Mykobakterien ist diese Entwicklung zweischneidig. Die Ansammlung neuer Zellen am Ort der Infektion bietet den Bakterien zusätzliche Nischen zur weiteren Infektion und somit deren Verbreitung (Ramakrishnan 2012).

Mtb wird von mehreren Rezeptoren der Phagozyten erkannt, um dann von der Zelle durch einen Rezeptor-Ligand-Mechanismus aufgenommen zu werden. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um C-Typ Lectin (CLR) Familie Rezeptoren, wie Mannose-, DC-SIGN- (*DC-specific intracellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*) oder Dectin 1-Rezeptoren, die von bronchoalveolaren Phagozyten exprimiert werden (Philips & Ernst 2012; Aderem & Underhill 1999; Torrelles et al. 2008). Die DZ nehmen Mtb mit Hilfe von DC-SIGN auf. Mtb kann auch mit Hilfe des Komplementsystems phagozytiert werden. Durch die Anlagerung der Moleküle C3b und C3bi kann Mtb durch die Komplement-Rezeptoren 1 und 3 des alternativen Wegs oder durch die Bildung der C3-Konvertase internalisiert werden (Schlesinger et al. 1990; Schorey et al. 1997).

Nach der Phagozytose kann Mtb im Phagosom überleben. Dies ist möglich durch das Verhindern der Fusion von dem Phagosom mit dem Lysosom (Russell et al. 2009; Hart et al. 1972). Die gestörte Ansäuerung erfolgt durch mangelnde Bereitstellung von Proton-ATPasen, was die Phagosom-Ausreifung verhindert (Sturgill-Koszycki et al. 1994). Daneben kann Mtb seinen intrazellulären pH-Wert im sauren Milieu der Lysosomen beibehalten (Vandal et al. 2008). Im Phagosom hat Mtb Zugang zu wachstumsnotwendigem Eisen, welches die Bakterien mit Hilfe sezernierter Proteine einfangen kann (Lounis et al. 2001). Die Inhibition der Phagosom-Ausreifung ist kein „Alles-oder-Nichts“ Ereignis. Einige Phagozyten schaffen es die Mykobakterien zu verdauen und bei anderen Fresszellen kann dieser Prozess durch Stimulation mit IFN $\gamma$  eingeleitet werden (Kaufmann 2001).

Am Entzündungsort locken die sterbenden Makrophagen Monozyten und weitere Immunzellen an, es kommt zur Bildung einer lokalen Läsion. Dieser Prozess benötigt TNF $\alpha$ . TNF $\alpha$  ist ein wichtiger Modulator in TB. Es induziert in den Makrophagen den Verdau von phagozytierten Mtb (Keane et al. 2001). Die Bedeutung von TNF $\alpha$  in der TB-Kontrolle wird nach einer anti-TNF $\alpha$ -Therapie in latenten Infizierten klar, die ein erhöhtes Risiko einer Reaktivierung haben (Maini et al. 1999). Dennoch kann ein übermäßiges Freisetzen von TNF $\alpha$  verheerende Folgen auf die infizierten Zellen haben. Zum Teil hat Mtb Mechanismen zur Manipulation des TNF $\alpha$ -Wirkmechanismus zum eigenen Vorteil entwickelt (Agarwal et al. 2009). So konnte Roca zeigen, dass die exzessive Freisetzung von TNF $\alpha$  in Makrophagen mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (ROS) durch den RIP1 (*Receptor-interacting serine/threonine-protein*)-RIP3-Kinase abhängigen Signalweg induziert. Dies führt zu einem erhöhten Vorkommen von ROS im Zellinneren und somit zur programmierten Nekrose bzw. Nekroptose in den Makrophagen und der Verbreitung von Mykobakterien (Roca & Ramakrishnan 2013; van Heijst & Pamer 2013).

IFN $\gamma$  ist ein weiteres Zytokin mit vielseitigen Wirkungen auf die Zellen des Immunsystems. Es kann antimikrobielle Mechanismen, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS; *reactive oxygen species*) und reaktive Stickstoffspezies (RNI; *reactive nitrogen intermediates*), aktivieren (Schaible et al. 1998). Im Mausmodell konnte dementsprechend gezeigt werden, dass die Vor-Inkubation der Makrophagen mit IFN $\gamma$  kurz vor der Infektion mit Mykobakterien die Zellen aktivierte und der Erreger durch die Expression von Stickstoff-Synthetase 2 (*NO-Synthetase*, NOS) und RNI abgetötet wurde. Zusätzlich erhöht IFN $\gamma$  neben der antimikrobiellen Kapazität der Makrophagen die Expression von MHC Klasse II-Molekülen durch die Phagosom-Reifung (Chan et al. 1992). Mutationen des IFN $\gamma$  oder seiner Rezeptor-Gene mit eingehendem Funktionsverlust führen zur erhöhten Anfälligkeit gegenüber der TB (Casanova & Abel 2002). Jedoch sollte die Immunität nicht anhand der IFN $\gamma$ -Sekretion

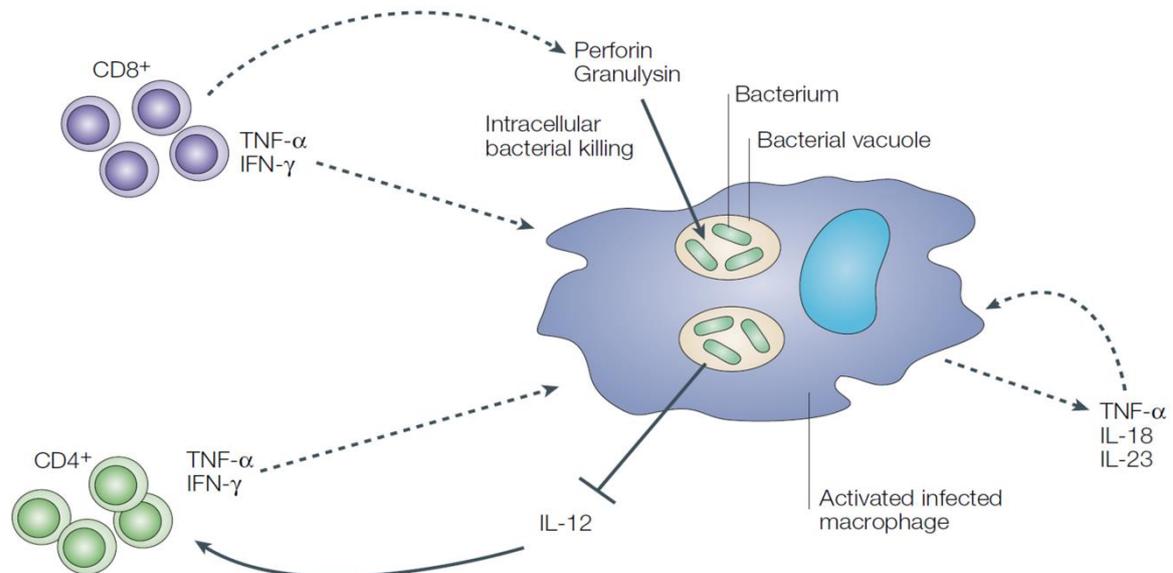
bestimmt werden, da es kaum eine Korrelation gibt (Kagina et al. 2010). Die beiden Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  sind für eine effiziente Immunantwort gegenüber einer Tuberkuloseinfektion von Bedeutung, da beide als Schlüsselmediatoren angesehen werden und eine synergistische Wirkung auf die Makrophagen und auf die Aktivierung der NO-Synthetase haben (Saito & Nakano 1996).

Die APZs sollten normalerweise nach der Aufnahme von fremden Partikeln in die nächstgelegenen Lymphknoten einwandern, um die adaptive Immunantwort auszulösen. Im Vergleich zu anderen Krankheitserregern hat Mtb die Fähigkeit entwickelt, die Aktivierung der Mtb-spezifischen Immunantwort zwei bis drei Wochen zu verzögern (Urdahl et al. 2011; Reiley et al. 2008). Auswertungen, stützend auf Beobachtungen des PPD (*purified protein derivate*) Hauttests, zeigen eine messbare Immunreaktion erst ca. 42 Tage nach Exposition und Infektion mit Tuberkulose-Erregern im Menschen (Wallgren 1948). Eine vergleichbare Kinetik zeigt sich auch nach der Infektion mit dem Hepatitis C-Virus, einem weiteren chronisch persistierenden Erreger (Netski et al. 2005). Im Mausmodell konnten die ersten Mtb-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen verspätet beobachtet werden. 8-10 Tage später gelangten die APZs nach einer Aerosol-Infektion mit Mykobakterien in die Lymphknoten, im Vergleich dazu sind ca. 20 Stunden für den Transport der Influenza-spezifischen Antigene nötig (Ho et al. 2011; Wolf et al. 2008; Ernst 2012). Diese Zeitspanne zwischen Infektion und Auftauchen der ersten Mtb-spezifischen T-Zellen erlaubt dem Pathogen zeitweilig eine ungehinderte Vermehrung in seinem Wirt ohne das Eingreifen der adaptiven Immunantwort (Ottenhoff 2012).

Die CD4<sup>+</sup> Zellen sind ein bedeutender Zelltyp in der Aufrechterhaltung einer Immunantwort gegenüber der TB in Mensch und Maus (Abbildung 1.6). Die Bedeutung dieses Subtyps kann man in TB und HIV Doppel-Infizierten beobachten. Die Inzidenz für eine Reaktivierung einer latenten TB-Erkrankung nimmt im Schnitt 5- bis 10-mal mehr im Vergleich zu Nicht-HIV-Erkrankten zu. Eine Zunahme der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten durch eine antivirale HIV-Therapie vermindert zwar die Reaktivierung der TB, die Inzidenz bleibt jedoch höher als bei TB-Erkrankten ohne eine HIV-Infektion (Kwan & Ernst 2011). Mykobakterien-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind zum größten Teil Th1-Zellen und sind große IFN $\gamma$ -Produzenten (Caruso et al. 1999). Das IFN $\gamma$  der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist eine zusätzliche Quelle für eine optimierte CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort. Th1-Zellen können zusätzlich noch weitere Mediatoren wie TNF $\alpha$  und Lymphotoxin freisetzen. Des Weiteren scheinen sie wichtig für die Aufrechterhaltung der zellulären Organisation in den Granulomen zu sein (Mohan et al. 2001; Roach et al. 2001). Wegen der Bedeutung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antwort gegenüber der TB hat Mtb mehrere Mechanismen zur Inhibition der CD4<sup>+</sup> Immunabwehr entwickelt. Zunächst hemmt Mtb die

MHC Klasse II-Präsentation oder interferiert mit der MHC Klasse II-Peptid-Lade- bzw. Transportmaschinerie (siehe: 1.7 *M. tuberculosis* und Antigenpräsentation) (Harding & Boom 2010).

Die Immunabwehr und Kontrolle einer Infektion mit Mykobakterien hängt von der adaptiven zell-vermittelten Immunantwort ab. Vor allem den CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde die Rolle des Schlüsselzelltyps zugerechnet. In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass die CD8<sup>+</sup> Lymphozyten auch eine Bedeutung in der Abwehr von intrazellulären Erregern wie Mykobakterien haben (Kaufmann 1988). Die CD8-positiven T-Zellen scheinen vor allem eine latente TB-Infektion zu kontrollieren (van Pinxteren et al. 2000). Durch die IFN $\gamma$ -abhängige Freisetzung von toxischen Wirkstoffen wie Perforin, Granzym und Granulysin sind sie in der Lage infizierte Zellen und Mykobakterien direkt abzutöten (Stenger et al. 1997; Stenger et al. 1998; Ottenhoff & Mutis 1995). Daneben kann die mykobakterielle Vermehrung indirekt durch die CD8-vermittelte Induktion der Apoptose mit FasL in infizierten Zellen eingegrenzt werden. Zusätzlich sind CD8<sup>+</sup> Lymphozyten neben CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch potente IFN $\gamma$ -Produzenten (Lewinsohn et al. 2003). In Mausmodell schützen die CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor einer schnell verlaufenden progressiven TB. Die Mäuse ohne eine CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Immunantwort sterben schneller als die Wildtyp-Mäuse jedoch langsamer als Mäuse ohne CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Mogues et al. 2001).



**Abbildung 1.6: Wechselwirkung zwischen T-Zellen und infizierten Makrophagen.**

Nach der Infektion durch die Luftwege werden die Mykobakterien von Makrophagen phagozytiert. Mtb kann jedoch in den phagosomalen Vesikeln durch die Inhibition der Phagosomausreifung überleben. Durch die Rekrutierung von aktivierten T-Zellen können infizierte Makrophagen zur erfolgreichen Degradierung von intrazellulären Bakterien aktiviert werden. CD4<sup>+</sup> Zellen produzieren IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  für die Makrophagen-Aktivierung. Die CD8<sup>+</sup> Zellen zeichnen sich durch ihre direkte lytische Aktivität gegenüber infizierten Zellen aus, indem sie Perforin und Granzym freisetzen. Zusätzlich produzieren CD8 Zellen IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Durch die Stimulation mit diesen proinflammatorischen Zytokinen sind Makrophagen in der Lage die phagosomalen Vesikel anzusäuern und lytische Moleküle wie ROI oder RNI zum Abtöten von MTB zu exprimieren. Daneben können Makrophagen durch Eigen-Stimulation mit TNF $\alpha$ , IL-18 und IL-23 die Replikation von intrazellulären Mykobakterien besser kontrollieren. Die Stimulation mit IL-12 induziert weitere Sekretion von IFN $\gamma$  durch die T-Zellen (CD4). Abgeänderte Abbildung von (Monack et al. 2004).

## 1.7 *M. tuberculosis* und Antigenpräsentation

Nachdem Mtb durch Makrophagen bzw. DZs phagozytiert wurde, ist anzunehmen, dass die mykobakteriellen Proteine in den MHC-Prozessierungsweg eingehen. Diese werden jedoch nur in geringen Mengen präsentiert, da Mtb die Phagosomausreifung inhibiert und Mtb in einem gewissen Grad widerstandsfähig gegenüber der Degradation in Säure-haltigen Phagolysosomen ist (Rohde et al. 2007). Mtb verweilt in phagozytierten Kompartimenten, die anhand ihrer Oberflächenmoleküle eher einem früheren bzw. unreifen Endosom ähneln, statt einem ausgereiften Phagosom. Dies bietet Mtb nicht nur Schutz vor Degradation sondern auch Nährstoffe zur Vermehrung (J. a Philips & Ernst 2012). Zusätzlich hat Mtb weitere Wege entwickelt, die MHC Klasse II-Prozessierung zu inhibieren. Das 19 kDa-Lipoprotein induziert über den TLR-2 die verminderte Expression der MHC Klasse II-Moleküle (Fulton et al. 2004; Noss et al. 2001a). Durch die Inhibition der

Aktivität der Cathepsine kann Mtb den Transport und die Beladung exogener Peptide verhindern (Soualhine et al. 2007; Nepal et al. 2006). Die Urease, kodiert von *ureC*, unterbindet die Ansäuerung der Transport- und Lade-Maschinerie und dadurch indirekt die Aktivität der Cathepsine, die erst im sauren Milieu aktiv werden (Sendide et al. 2004). Zusätzlich hat Mtb einen Weg gefunden, um sich im Zytosol zu replizieren. Je nachdem welcher Zelltyp und welchen Stimuli der Erreger ausgesetzt ist, kann es mehrere Nischen einer Zelle einnehmen. Ein mykobakterieller Sekretionsapparat, welches genau dies ermöglicht, ist Esx-1. Esx-1 wird mit der Pathogenität der Mykobakterien assoziiert und ist im Impfstamm BCG deletiert (Guinn et al. 2004; Hsu et al. 2003). In humanen DZs und Makrophagen schädigt Esx-1 die phagosomale Membran, was die Translokation der Mtb ins Zytosol nach sich zieht (van der Wel et al. 2007). Die Esx-1-Proteine, ESAT-6 und CFP-10, können die Membran durch Komplexbildung perforieren, wobei ESAT-6 auch alleine diese Membran-lytischen Eigenschaften *in vitro* zeigt (de Jonge et al. 2007; J. A. Philips & Ernst 2012). Auf diesem Wege können mehrere Antigene mykobakteriellen Ursprungs auf MHC Klasse I präsentiert werden und eine CD8-vermittelte Immunantwort auslösen (Lalvani et al. 1998; Caccamo et al. 2009). Des Weiteren exprimieren die Mykobakterien viele einzigartige Lipide, die von CD1-Molekülen der APZ präsentiert werden können. CD1b bietet freie monoglykosylierte Mykolsäuren, Phosphatidylisonitol und diazylierte Sulfoglykolipide den T-Zellen dar. CD1c bindet  $\beta$ 1-mannosylierte Phospholipide und CD1a Didehydroxymycobactin (Bricard & Porcelli 2007; Baena & Porcelli 2009).

Nach der Aufnahme und erfolgreichen Vermehrung in den Phagozyten brauchen die Mykobakterien einen Weg, weitere Zellen zu infizieren. Zu diesem Zweck induziert Mtb das nekrotische Absterben seiner Wirtszellen, was wiederum zur Freisetzung neuer Bakterien führt und daneben zur Rekrutierung neuer Makrophagen zum Ort der Nekrose, die wiederum Mykobakterien phagozytieren (Ernst 2012; Davis & Ramakrishnan 2009). Als zusätzlichen Schutz inhibieren Mykobakterien die Apoptose infizierter Zellen. Nekrotische Zellen setzen mehr lebende Bakterien frei als apoptotische Zellen (Molloy et al. 1994). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass attenuierte Mtb bzw. Impfstämme eher die Apoptose induzieren als die Nekrose. Die apoptotischen Körperchen und darin enthaltene Zellbestandteile werden so von APZs aufgenommen und auf MHC Klasse I-Molekülen CD8<sup>+</sup> T-Zellen kreuzpräsentiert (Farinacci et al. 2012a). Die genauen Mechanismen der Apoptosehemmung und die Induktion der Nekrose müssen jedoch noch weiter untersucht werden.

Autophagie ist nicht nur ein Mechanismus der Degradation von Proteinaggregaten und defekten Organellen, sondern auch der intrazellulären Beseitigung von viralen und

bakteriellen Erregern (Xenophagie) (Yoshimori & Noda 2008; Deretic 2010). Die aus der Doppelmembran gebildeten Autophagosomen verdauen zytoplasmisches Material, indem sie mit lysosomalen Organellen (Autolysosomen) verschmelzen. Bei der Xenophagie wird den Bakterien Ubiquitin angehängt, was ein Zeichen für die Degradation ist. Die Degradation auf diesem Weg, führt zur Präsentation von Peptiden auf der Zelloberfläche und Beseitigung von intrazellulären Pathogenen. Da Mtb durch Autophagie degradiert werden kann (Kim et al. 2012), entwickelt es Mechanismen, die mit Autophagie sowie Apoptose interferieren (Gutierrez et al. 2004; Deretic 2010).

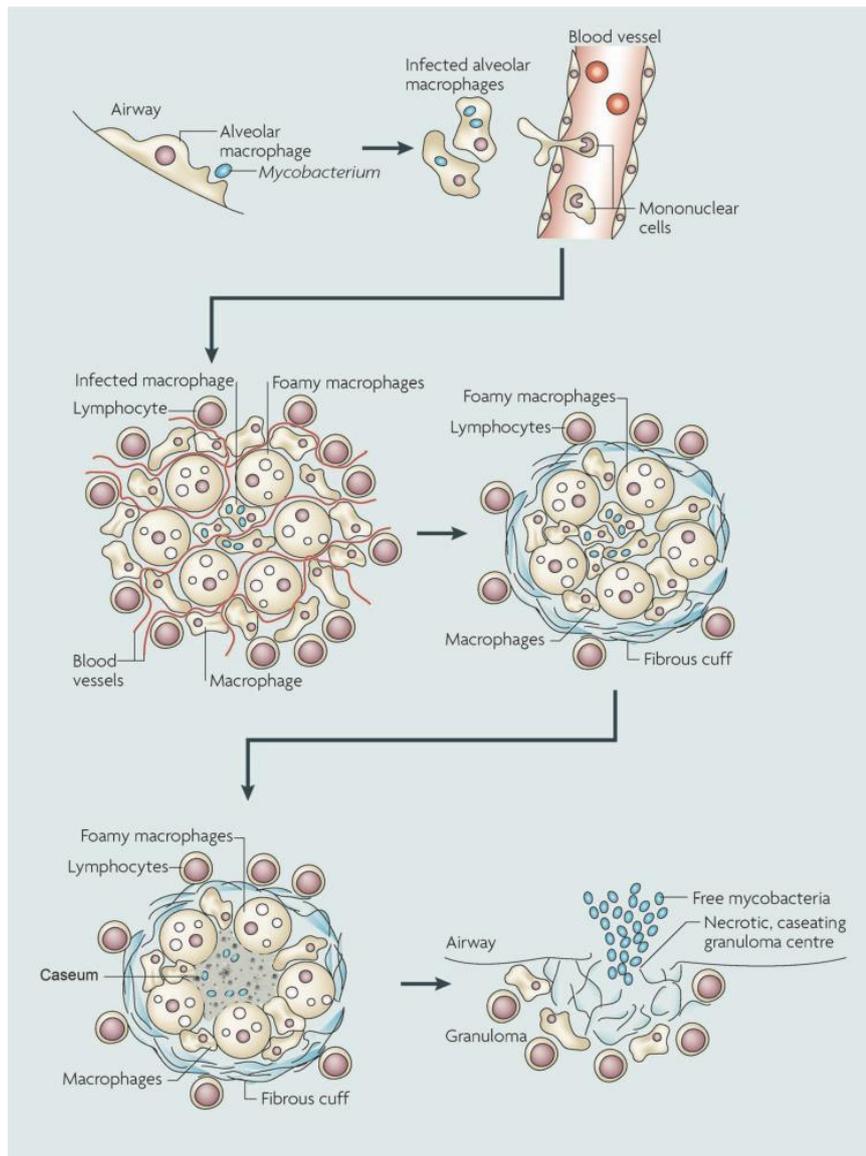
## **1.8 Ausbildung und Funktion der Granulome in der Tuberkulose**

Das mykobakterielle Granulom ist ein Resultat der lokalen Interaktion zwischen dem Erreger und dem Immunsystem, diese kann entweder zur lokalen Abgrenzung und Verhärtung der Läsionen oder zur lokalen Nekrose und der Verflüssigung (Verkäsung) der Läsionen führen. Das zweite Beispiel endet meist in der Freilassung weiterer infektiöser Partikel (Russell et al. 2009). Früher glaubte man, ein Granulom wäre eine feste Struktur. Heute vermutet man, basierend auf den Versuchen mit dem Zebrafischmodell und *M. marinum*, dass die Struktur eines Granuloms weniger starr, sondern mehr dynamisch ist. So können die Immunzellen in und aus den Granulomen ein- und austreten (Ramakrishnan 2012). Kurz nach der Infektion des embryonalen Zebrafischmodells mit fluoreszierendem *M. marinum* wurde eine ungehinderte Vermehrung der Bakterien in Makrophagen und die Rekrutierung weiterer nicht-infizierter Makrophagen zum Ort der Infektion beobachtet. Die neu eingetroffenen Makrophagen grenzten die infizierten Zellen ein. Dies wiederum führte zur Neu-Organisation der Zellaggregate und somit zum anfänglichen Granulom. Während des weiteren Verlaufs vermehrten sich die Mykobakterien aktiv und wurden von sterbenden bzw. toten Makrophagen freigesetzt um anschließend schnell von den umliegenden Makrophagen phagozytiert zu werden. Dies resultierte in der weiteren Vermehrung von Mykobakterien. Viele der infizierten Makrophagen entfernten sich vom ursprünglichen Ort der Infektion und ein weiterer Infektionsherd konnte sich entwickeln (Davis et al. 2002; Davis & Ramakrishnan 2009). Da die Bildung eines Granuloms von der Ausschüttung von TNF $\alpha$  durch die Makrophagen und T-Zellen abhängt, ist ein stetiges TNF-Level nötig, um zusätzliche Zellen durch Chemokine zum Infektionsherd zu locken. TNF „Knock-Out“ Mäuse können zwar auch Granulome ausbilden, jedoch ist deren Krankheitsverlauf nach der Infektion mit Tuberkulose-Bakterien verspätet und die Granulome sind amorph und nekrotisch. Zu viel TNF ist kontraproduktiv für den Ausgang

der TB (siehe 1.6 *M. tuberculosis* und das Immunsystem) (Casadevall & Pirofski 2003; Roca & Ramakrishnan 2013).

Neben den Makrophagen finden sich T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, DZs und Neutrophile Granulozyten in den Granulomen. Als Abgrenzung von dem umliegenden Gewebe werden die Granulome mit einer aus Fibrinogen stammenden Wand umschlossen (Abbildung 1.7) (Reece & Kaufmann 2012). Die eingeschlossenen Makrophagen haben phänotypisch ein unterschiedliches Aussehen: ausdifferenzierte oder epitheliale Makrophagen, verkäsende Makrophagen und multinukleäre Riesenzellen (*multinucleated giant cells, MGCs*). Die verkäsenden Zellen sind Makrophagen, die es nicht schaffen intrazelluläre Mtb zu lysieren und Lipid-reiche Körperchen im Innern enthalten. Die MGCs sind miteinander verschmolzene Makrophagen, wobei die Membranen miteinander verschmelzen, jedoch nicht die Kerne. Aus dem Grunde werden sie auch multinukleäre Riesenzellen (*multinucleated giant cells, MGCs*) genannt (Puissegur et al. 2007). Die Entwicklung zu verkäsenden Makrophagen wird vermutlich mit Hilfe von TLR2-abhängigen Prozessen induziert (Davila et al. 2010). *In vitro* konnte die Differenzierung von Monozyten in verkäsenden Makrophagen durch den Einfluss von Mykol-Säuren gezeigt werden (Peyron et al. 2008). Die verkäsenden Makrophagen enthalten große Mengen an Lipid-Körperchen, möglicherweise mit Cholesterin und Cholesteryl-Ester, die Mtb als eine neue Kohlenstoff-Quelle verstoffwechseln kann (Chang et al. 2009). Die Fusion der Makrophagen zu Riesenzellen wird den pathogenen jedoch nicht apathogenen Mykobakterien zugeordnet. Sie braucht die Exposition von mykobakteriellen Lipiden wie PIMs und LM und TDM (nicht ManLAM und Phosphatidylisonitol) und die TLR2-abhängige Erkennung (Puissegur et al. 2007). Die physiologischen Eigenschaften der MGCs ähneln dem der ausgereiften DZs, ihre Phagozytose ist reduziert und die Expression von MHC Klasse II-Molekülen erhöht (Lay et al. 2007). Neben den MGCs findet sich ein weiterer Antigen-präsentierender Zelltyp in den Granulomen, die DZs, die ihrer üblichen Aufgabe folgen: dem Transport und der Präsentation mykobakterieller Antigene. Die T-Zell-Populationen fallen nicht groß ins Gewicht, vielmehr spielen sie eine Rolle in der Abschirmung der eingeschlossenen Granulome. CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind zum größten Teil (60-70%) diffus im Granulom verteilt oder bilden eine Barriere in der Peripherie (Randhawa 1990; Tsai et al. 2006). Zusätzlich beobachtete man noch eine weitere Zell-Population der adaptiven Immunabwehr, die B-Zellen, in den Granulomen. Ihre eindeutige Aufgabe konnte bisweilen nicht geklärt werden (J. A. Philips & Ernst 2012). Die Granulome werden anhand unterschiedlicher physiologischer Erscheinungen in nekrotische und nicht-nekrotische aufgeteilt. Nekrotische Granulome enthalten einen flüssigen Kern (Käse-artig, deswegen auch verkäsend) infolge von verstärktem Zellsterben von MGCs und verkäsenden Makrophagen,

Nicht-nekrotisierende Granulome besitzen keinen flüssigen Kern (Abbildung 1.7). Um das Bakterienwachstum einzugrenzen, werden die infizierten Zellen geopfert, als eine Folge der verstärkten Immunantwort im Kern, was zur Freilassung der Mykobakterien führt. Diese Art der Nekrose sollte nicht mit der bevorzugten mykobakteriellen Verbreitungsweise durch die Nekrose am Anfang einer Infektion verglichen werden. Denn in Granulomen sind die infizierten Zellen und ihre Erreger eingegrenzt. Der nekrotisierende Kern verbleibt im Inneren und kann weiter anwachsen, wenn aber die nekrotisierende Flüssigkeit die Bronchien überwächst bzw. erreicht, so können die Mykobakterien durch die Lunge verbreitet werden. In diesem Falle handelt es sich um eine offene TB. Durch Husten verkalkt der übriggebliebene Leerraum anschließend. Ähnliches passiert, wenn der flüssige Kern eines Granuloms eine Kapillare trifft. Die Tuberkulose-Bakterien können sich durch den Blutfluss verbreiten und eine Miliartuberkulose einleiten. Manche Granulome verbleiben jedoch in ihrer unveränderten Form, während andere sich ausdehnen und zum Nachteil des Wirts sich weiter entwickeln. Des Weiteren befinden sich in den Granulomen nicht ausschließlich latente Erreger, sondern vielmehr eine heterogene Population an latenten und sich aktiv vermehrenden Mykobakterien. Die Mykobakterien, so scheint es, verhalten sich an verschiedenen Infektionsorten anders als ihre Artgenossen oder die Immunantwort wirkt nicht einheitlich systemisch, sondern mit lokalen Unterschieden (Russell et al. 2009).



**Abbildung 1.7: Schematischer Ablauf einer Granulom-Entwicklung im Menschen.**

Die Mykobakterien werden durch die Atemwege übertragen, wobei ein bis zehn infektiöse Partikel für die Übertragung ausreichen. *Mtb* werden sodann von alveolaren Makrophagen phagozytiert und durch die Erkennung der PAMPs wird eine proinflammatorische Immunantwort ausgelöst. Die proinflammatorischen Signale aktivieren weitere mononukleäre Zellen, die dann durch die Blutgefäße zum Infektionsort einwandern. Diese Einordnung von infizierten und nicht-infizierten Phagozyten bildet das frühe Granulom. Die Organisation des frühen Granuloms enthält in seinem Innern infizierte Makrophagen, die von Riesenzellen bzw. MGC (*foamy macrophages*) und dann von Lymphozyten eingeschlossen sind. Im weiteren Verlauf der Entwicklung kann dieser Komplex von einer Kapsel aus fibrösem Material umschlossen werden, wobei hauptsächlich Makrophagen eingeschlossen werden, kaum jedoch Lymphozyten. Im Falle einer weiter progredienten Tuberkulose verflüssigt sich der Kern durch Nekrose, die Mykobakterien werden frei und können durch die Luftwege ausgehustet werden. Abbildung von Russel et. al. 2009.

Worin der biologische und immunologische Vorteil der Granulome besteht ist noch unklar. Zumindest glaubte man früher, dass die zelluläre Organisation des Immunsystems eine Barriere darstellt, um den Wirt vor weiterer Verbreitung zu schützen. In den früheren

Phasen der Granulomentwicklung werden Makrophagen angelockt, die für das Pathogen als eine weitere bzw. neue Vermehrungsquelle dienen. Das Vorhandensein von Antigen-präsentierenden Zellen wie auch von Effektorzellen des adaptiven Immunsystems erlaubt dem Wirt die Infektion einzugrenzen und sie zu kontrollieren. Die Einkapselung der Granulome mit Immunzellen und dann mit Fibrinogen führt zum Sauerstoffmangel im Inneren. Dieser Mangel hemmt die Bakterien in ihrem Wachstum. Letztendlich führt die Ausbildung der Granulome nicht zur Eliminierung der Mykobakterien, sondern eher zur Etablierung einer persistierenden Infektion (Russell et al. 2009).

## **1.9 Reaktivierung einer latenten Tuberkulose**

10% der Menschen entwickeln nach dem Kontakt mit Mtb eine aktive Tuberkulose, die restlichen 90% bleiben latent infiziert, wobei die Möglichkeit einer Reaktivierung das ganze Leben über besteht (WHOglobalTBreport2011). Es ist nicht bekannt bzw. es konnte nicht belegt werden, ob einzelne infizierte Personen sich des Erregers nach der Erstinfektion komplett entledigen, jedoch wird die sterile Beseitigung eher der angeborenen als der adaptiven Immunantwort zugeschrieben (Cobat et al. 2009; Rose et al. 1995). Tierstudien zeigten, dass die latente Infektion kein starrer Status ist, vielmehr ist es ein Kräftemessen zwischen dem Erreger und dem Immunsystem. Es scheint, dass die Mykobakterien gedrängt werden eine Phase der Ruhe einzunehmen, aber man vermutet die Mykobakterien können diesen Weg auch aktiv wählen. Mit Hilfe des Regulons DosR kann Mtb sogenannte „*Dormancy*“-Gene exprimieren, welche die Anpassung an die feindselige Umgebung des Wirts und seines Immunsystems begünstigen. Dieses Regulon wird durch mehrere Stimuli, wie lokale Sauerstoffarmut, Stickstoffoxid und Kohlenstoffmonoxid, aktiviert. Dadurch stehen dem Bakterium mehrere neue alternative Energiereserven (Lipide) zur Verfügung. Manche Antigene einer latenten Infektion werden von Patienten mit einer latenten TB aber nicht von Patienten mit einer aktiven TB erkannt (Ernst 2012). Zur Aufrechterhaltung einer latenten Infektion ist die Bildung der Granulome wichtig.

Die Reaktivierung einer latenten TB in eine aktive TB zeichnet sich immer durch die Symptomatik und die Fähigkeit aus, infektiöse Mykobakterien durch Husten übertragen zu können. Die Reaktivierung der TB tritt meist nach der Unterdrückung des Immunsystems, z.B. durch HIV-Erkrankung oder Therapie mit Immunsuppressiva, auf und kann Jahrzehnte nach der Primär-Infektion auftreten (Glynn et al. 2010; Keane et al. 2001). Eine Reaktivierung der TB kann auch durch eine Neuankomstung mit einem anderen pathogenen

Mykobakterium induziert werden. Die Neuinfektion ist nur in Regionen mit hoher Prävalenz zuzuordnen (Kaufmann 2001).

Es gibt mehrere Ereignisse, die eine TB-Reaktivierung begünstigen, eine der bedeutendsten wäre die Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Da zur Kontrolle einer Infektion mit Mtb eine CD4<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Immunantwort gehört, ist die Reaktivierung vor allem in Menschen mit einer Ko-Infektion mit HIV zu beobachten (Kwan & Ernst 2011). Der gleiche Ausgang konnte auch im Makak-Tiermodell infiziert mit dem Simianen Immundefizienz-Virus (SIV) beobachtet werden (Diedrich et al. 2010). Weitere Assoziation mit der TB-Reaktivierung ist die Therapie mit einem TNF $\alpha$ -Blocker (Harris & Keane 2010). In seiner Eigenschaft als pro-inflammatorisches Molekül wirkt TNF $\alpha$  auf mehrere Zellen des Immunsystems, die Neutralisierung durch z.B. Infliximab führt zur erniedrigten anti-mykobakteriellen Aktivität der Makrophagen (Clay et al. 2008). Zusätzlich geht die anti-TNF $\alpha$  Behandlung mit einer verminderten Frequenz der CD45RA<sup>+</sup> Effektor Gedächtniszellen einher, die Granulysin zur mykobakteriellen Abwehr enthalten (Bruns et al. 2009). Auch andere anti-inflammatorische Pharmazeutika sind ein Risiko zur Reaktivierung einer latenten TB, wie z.B. Glukokortikoide (Jick et al. 2006).

Generell gibt es mehrere Faktoren, die eine Reaktivierung begünstigen, wie körperliche Mangelerscheinungen (geringes Körpergewicht, Mangelernährung), T-Zell-Beanspruchung durch Virusinfektionen (LCMV), Änderung der Antigenpräsentation, spontane Reaktivierung und mangelnde Rekrutierung der Immunzellen zu den Granulomen (Ernst 2012).

## **1.10 Zielsetzung der Arbeit**

Die Aufgabe dieser Dissertation besteht in der Isolation und Identifizierung von natürlich prozessierten mykobakteriellen Peptiden. Viele der heute bewährten mykobakteriellen Antigene wurden infolge ihrer Fähigkeit eine T-Zell-Antwort auszulösen ausgewählt. Die dazugehörigen MHC-Epitope wurden mit Hilfe von überlappenden Peptiden und durch die Vorhersage des MHC-Motivs identifiziert. Trotz einer großen Anzahl an bekannten MHC-Epitopen ist es unerlässlich nach natürlich präsentierten Peptiden zu suchen. Die *in silico*-Vorhersage anhand unterschiedlicher Programme zeigt nicht den tatsächlichen Status eines präsentierten Proteins. In der Krebsforschung ist es bereits üblich, das Tumor-spezifische HLA-Ligandom zu erforschen und dadurch einen Einblick in den zellulären Ablauf auf molekularer Ebene zu bekommen. Durch die Bestimmung von Tumor-spezifischen Liganden könnten Peptid-basierte Impfungen in der Krebstherapie ihren Einsatz finden. Solche

Ansätze könnten auch zu einer Immuntherapie gegen Tuberkulose führen. Vor allem in Patienten mit einem geschwächten Immunsystem wären HLA-Liganden sicherer als Lebend-Impfstoffe, denn eine erfolgreiche Kontrolle der Tuberkulose setzt eine funktionsfähige Immunantwort aus Zellen des adaptiven Immunsystems voraus. Daneben könnte der Einsatz der Peptide zur Analyse von Protein-spezifischen Immunantworten zu diagnostischen Zwecken genutzt werden. Aus dem Grunde ist die Identifizierung weiterer mykobakterieller Antigen ein sehr interessanter Ansatz. Vor allem HLA-präsentierte Proteine mit einer immunogenen Wirkung auf die Gedächtnis-T-Zellen könnten später als mögliche Kandidaten zur Impfung bzw. zur Verstärkung einer Impfung dienen, wie zum Beispiel das schon bekannte Antigen 85A.

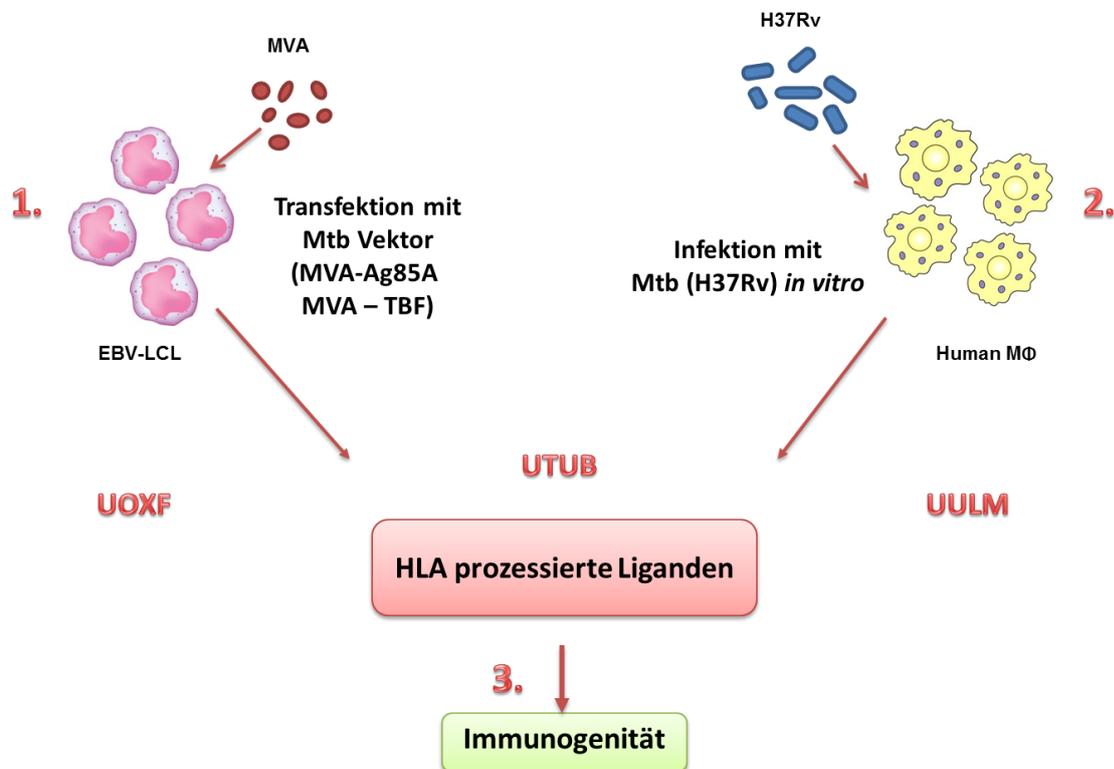
Die Identifizierung von natürlich prozessierten Peptiden mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen wird in der heutigen Zeit immer leichter. Einerseits wird die Analytik durch enorme Entwicklung der Geräte beschleunigt, andererseits ermöglichen besser annotierte Programme die schnellere Auswertung der Daten.

Zur Identifizierung von mykobakteriellen Liganden sollten zwei Ansätze verwendet werden: In dem ersten Teil dieser Arbeit, einem artifiziellen Modell, sollte eine Zelllinie mit modifiziertem Vaccinia-Virus (MVA) infiziert werden (Abbildung 1.8). Das Virus kann Zellen infizieren, ist aber nicht mehr replikationsfähig. MVA-Ag85A kodiert ein und MVA-TBF vier mykobakterielle Proteine. Die Isolation der MHC-Peptide kann mit Hilfe einer etablierten Affinitätschromatographie und anschließender MS-Analyse durchgeführt werden. Dieser Ansatz kann nur eine begrenzte Anzahl an natürlich prozessierten Peptiden aus einem bzw. wenigen exprimierten Proteinen ergeben. Die große Anzahl an Zellen und an Virus würde jedoch die Wahrscheinlichkeit, überhaupt Peptide fremden Ursprungs zu isolieren steigern.

Daneben (Ansatz 2) sollten Makrophagen aus Blutprodukten isoliert und mit einem lebenden *M. tuberculosis* Laborstamm (H37Rv) infiziert werden (Abbildung 1.8). Durch die unterschiedlichen HLA-Motive verschiedener Spender und durch die Infektion mit einem lebenden pathogenen Erreger ist die Anzahl an präsentierenden Peptiden erhöht. Aber die letale Infektion selbst und die schwache Infektionsrate reduzieren zugleich die Anzahl an natürlich präsentierten Liganden und erschweren zugleich die Isolation dieser.

Die erfolgreiche Identifizierung von mykobakteriellen Liganden könnte die tatsächliche MHC-Präsentation dieser im Menschen widerspiegeln. Vom immunologischen Standpunkt aus können alle präsentierten Peptide fremden Ursprungs eine Immunantwort auslösen. Zur Charakterisierung von HLA-Liganden werden diese anschließend in immunologischen Testungen analysiert. Die PBMCs von Spendern mit einer BCG-Impfung und bzw. oder

einem positiven PPD-Status und passendem HLA sollten mit den Peptiden stimuliert und die Immunantwort von Gedächtnis-T-Zellen analysiert werden.



**Abbildung 1.8: Das Modell zur Identifizierung von natürlich prozessierten Peptiden mykobakteriellen Ursprungs.**

1. Die EBV-LCL wird mit MVA-Ag85A (kodiert Antigen85A) und MVA-TBF (kodiert Antigen 85A, ESAT6-like Protein, TB8.9, TB10.5 und Acr2) infiziert und MHC-Peptid-Komplexe mit Hilfe von Affinitätschromatographie isoliert.
2. Makrophagen aus humanen Blutprodukten werden nach ihrer Ausdifferenzierung mit dem pathogenen *Mycobacterium tuberculosis* Stamm H37Rv infiziert und die MHC-Peptidkomplexe wie in 1. isoliert.
3. Die identifizierten HLA-Liganden mykobakteriellen Ursprungs werden auf ihre Fähigkeit eine Immunantwort auszulösen in mehreren immunologischen Verfahren überprüft.

## 2. Methoden und Materialien

### 2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Puffer

#### 2.1.1 Geräte

5% CO <sub>2</sub> Begasungssystem	Messer
Analysenwaage (1 mg- 210 g)	Sartorius
Autosampler Micro AS	Thermo Fisher Scientific
Biologische Sicherheitswerkbank	Holten Lamin Air
Branson Sonifier 250 Branson Ultrasonics	Danbury, USA
Brutschrank	Labotect 3250
Einfrierbehälter	Nalgene
Einkanalpipetten (1000 µl, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Eppendorf
ELISA-Reader Spectra Max 340	Molecular Devices
ELISPOT-Reader CTL	Academic Cellular Technologies LTD
FACS-Canto II	Becton Dickinson
Feinwaage (10 mg - 210 g)	Sartorius
Flachschüttler	IKA-Vibrax-VXR
Gamma-Zelle (Gamma Cell 1000 Elite)	MDS Nordion
Gefrierschrank, auf -20°C eingestellt	Liebherr
Gefrierschrank, auf -80°C eingestellt	Sanyo
Inkubator (37°C, 5% CO <sub>2</sub> )	Heraeus Instruments
Kühlschrank, auf 4°C eingestellt	Liebherr
Laborfuge 400	Heraeus
Lichtmikroskop	DMIL Leica
Lyophilisieranlage	Vaco5 ZIRBUS
MACS-Magnet	Miltenyi Biotec
Megafuge	Heraeus
Mehrkanalpipette 200 µl	Abimed
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand
Mikroliterspritzen Hamilton Gastight Syringe	CS-Chromatographie Service GmbH
Mini-Tischzentrifuge	Qualitron

Nano-HPLC NanoLC 2D	Eksigent
Nano-UHPLC UltiMate 3000 RSLCnano	Dionex
Orbitrap-Massenspektrometer, Typ LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific
Peptide Synthesizer ABI 433A	Applied Biosystems
Peptide Synthesizer EPS 221	Abimed
Pipettenspitzen mit C18-Matrix, Zip-Tip $\mu$ -C <sub>18</sub> , 10 $\mu$ l	Millipore
Pipettierhilfe Pipet Boy Integra	Biosciences
Rotator	Bachofer
SpeedVac Vacuum Concentrator	Bachofer
Tischkühlzentrifuge Biofuge 13	Heraeus
Tischkühlzentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf
Tischkühlzentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus
Tischkühlzentrifuge Megafuge 2.0	Heraeus
Ultraschallbad Sonorex Super	Bandelin
Ultrazentrifuge L-80, Rotor Ti45, Rotor Ti70	Beckman Coulter
UV-Spektrometer Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech
Vortexer MS 1	IKA-Works, Inc.
Wasserbad Thermomix BM-S	Braun Biotech
$\mu$ Kapillar-LC-System Ultimate	Dionex, Sunnyvale, USA

### 2.1.2 Software

FACSDiva	Becton Dickinson
MASCOT Server 2.2.04	Matrix Science
Thermo Proteome Discoverer 1.1	Thermo Fisher
Xcalibur 2.0.7	Thermo Fisher Scientific
ImmunoSpot 4.0 Academic	Cellular Technologies LTD
ImmunoCapture6.1	Cellular Technologies LTD
FlowJo 9.1 (Mac) und 7.6 (Windows)	Tree Star

## 2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

### 2.1.3.1 Verbrauchsmaterialien

12-Well-Platten	Corning Incorporated
24-Well-Platten	Corning Incorporated
5 ml-FACS-Röhrchen	Becton Dickinson
6-Well-Platten	Falcon
96-Well-Platten	Corning Incorporated
Cryoröhrchen, 2 ml	Greiner
ELISPOT-Platten MSHAN4B	Millipore
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one
Glasflaschen 0,5; 1 und 2 L	Schott
Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,1 mm	LO-Laboroptik
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Starlab
Quarzküvetten, Schichtdicke 10 mm, Zentrum 15 mm	Hellma
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Reservoirs 50 ml, 100 ml	Corning Incorporated
Sterile Spritzen, 20 ml, 50 ml	Becton Dickinson
Sterilfilter, 0,22 µm	Corning Incorporated
Zellkulturflaschen (50 ml, 250 ml, 550 ml)	Greiner bio-one

### 2.1.3.2 Chemikalien und Kits

Acetonitril MS-Grade	Thermo Fisher
Ameisensäure	Merck
Ammoniumperoxidisulfat	Sigma-Aldrich
Anti-PE MicroBeads	Miltenyi Biotec
Bovines Serumalbumin (BSA) A-3059	Sigma
Brefeldin A	Sigma
CHAPS	Appllichem
CNBr-aktivierte Sepharose	GE Healthcare
CompBead Set	Becton Dickinson
Cytofix/Cytoperm	Becton Dickinson
Descosept AF	Dr. Schuhmacher GMBH

DMSO	Merck
DNase I	Roche
Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM	Gibco
EDTA	Roth
Ethanol vergällt	SAV Liquid Production
ExtrAvidin Alkalische Phosphatase	Sigma
FACS-Clean, FACS-Rinse, FACS-Flow	Becton Dickinson
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories
Gentamycin	Cambrex Bioscience Verviers
Glycin	Carl Roth
GM-CSF ( <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> )	R&D Systems
GolgiStop	Becton Dickinson
H <sub>2</sub> O doppelt destilliert (ddH <sub>2</sub> O)	mit Heraeus Destamat Bi 18 E
Humanserum (HS)	gepooltes Serum verschiedener Vollblutspender, hitzeinaktiviert, Eigenherstellung des Labors
Imidazol	Merck
Ionomycin	Sigma
Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM	Gibco
Isopropanol	Merck
LC-MS-ACN J.T.Baker	Th. Greyer GmbH
LC-MS-Wasser	Th. Greyer GmbH
LC-MS-H <sub>2</sub> O, LiChrosolv	Merck
Lymphozyten-Separationsmedium (Ficoll)	PAA Laboratories
Methanol	Merck
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich
Natriummolybdat	Sigma-Aldrich
Natrium- <i>ortho</i> -vanadat	Calbiochem
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich
Natriumtartrat	Sigma-Aldrich
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	BioWHITTAKER
Penicillin/Streptomycin (PenStrep, 100x)	PAA Laboratories
PHA-L (Phytohaemagglutinin)	Roche

PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)	Sigma Aldrich
Phosphorsäure	Merck
Proteaseinhibitor-Tabletten „complete“	Roche
Protein Transport-Inhibitor	Becton Dickinson
QuantiFERON®-Tb-Test	Cellestis
RPMI 1640 + 25 mM Hepes + L-Glutamax	Gibco
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure (TFA)	Applied Biosystems
Trypanblau	Merck
Trypsin, <i>sequence grade modified</i>	Promega

## 2.1.4 Medien und Puffer

### 2.1.4.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Experimente

Kopplungspuffer	0,5 M NaCl 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> pH 8,3 mit NaOH einstellen
Lösungsmittel A	Baker H <sub>2</sub> O 2% Acetonitril 0,1% Ameisensäure
Lösungsmittel B	Baker H <sub>2</sub> O 80% Acetonitril 0,1% Ameisensäure
Lösungsmittel B*	20% H <sub>2</sub> O 80% Acetonitril 0,04% Ameisensäure
Lysepuffer (2-fach)	400 mg CHAPS 1 Proteaseinhibitortablette 660 µl Phosphataseinhibitorcocktail 33 ml PBS
Phosphataseinhibitorcocktail (100-fach)	200 mM Imidazol 100 mM Natriumfluorid 115 mM Natriummolybdat 100 mM Natrium-ortho-vanadat 400 mM Natriumtartrat 200 mM β-Glycerophosphat 200 mM Natriumpyrophosphat Salzsäure zugeben, bis alles gelöst

### **2.1.4.2 Puffer und Waschpuffer für zellbasierte Experimente**

Capture-Puffer (MACS-Puffer)	PBS 0,5% BSA
FACS-Fix	2 mM EDTA FACS Puffer PFEA 1% Formaldehyd
MACS-Puffer	PBS 0,5% BSA 2 mM EDTA sterilfiltrieren
PBS/BSA	PBS 0,5% BSA
PBS/Tween	PBS 0,05% Tween20
PBSE (PBS EDTA)	PBS 2 mM EDTA
Permwash	PBS 0,1% Saponin 0,5% BSA 0,02% Natriumazid
Standard-FACS-Puffer PFEA	PBS 2% FCS (hitzeinaktiviert: 30 min bei 56°C) 2 mM EDTA 0,01% NaN <sub>3</sub>
Tetramer-Staining-Puffer (TSB)	50% PBS 50% FCS (hitzeinaktiviert: 30 min bei 56°C) 2 mM EDTA
Trypanblau-Lösung	PBS 0.05% (w/v) Trypanblau 0.01% NaN <sub>3</sub>

### **2.1.5 Medien für die Arbeit mit PBMCs und Monozyten**

Einfriermedium für alle Zelllinien	FCS (hitzeinaktiviert: 30 min bei 56°C) 10% DMSO
Auftaumedium für T-Zellen	RPMI 1640 3 µg/ml DNase 1% PenStrep 25 µg/ml Gentamycin
Kultiviermedium für T-Zellen	RPMI 1640 1% PenStrep 25 µg/ml Gentamycin 10% Humanserum
Kultiviermedium für Monozyten- und Makrophagen-Ausdifferenzierung	RPMI 1640 5% Humanserum 1% PenStrep 10 ng/ml GMCSF

## 2.1.6 Verwendete Antikörper für proteinchemische Versuche

**Tabelle 2.1: Antikörper für MHC-Präzipitation**

Antigen	Klon/Isotyp	Hersteller
MHC Klasse I	W6/32; IgG2 <sub>a</sub>	Claudia Falkenburger, Tübingen
MHC Klasse II	L243; IgG2 <sub>a</sub>	Claudia Falkenburger, Tübingen
HLA-A*02	BB7.2; IgG2 <sub>b</sub>	Claudia Falkenburger, Tübingen
HLA-DR, -DP, -DQ	Tü 39; IgG2 <sub>a</sub>	Claudia Falkenburger, Tübingen

## 2.1.7 Zytokine und Wachstumsfaktoren für verschiedene Zelllinien

GM-CSF (aus engl. <i>Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor</i> ), human rekombinant	R&D Systems
IL-2, human rekombinant	R&D Systems
IL-4, human rekombinant	R&D Systems
IFN $\gamma$ , human rekombinant	R&D Systems
TNF- $\alpha$ , human rekombinant	R&D Systems

## 2.1.8 Im ELISPOT verwendete Antikörper und Reagenzien

**Tabelle 2.2: Antikörper für ELISPOT.**

Antikörper	Mengenangabe	Hersteller
$\alpha$ IFN- $\gamma$ Erstantikörper 1-D1K [1 mg/ml]	1:250	Mabtech
$\alpha$ IFN- $\gamma$ Sekundärantikörper 7-B6-1 Biotin [1 mg/ml]	1:3000	Mabtech
BCIP/NBT SIGMAFAST	1 Tablette auf 10 ml H <sub>2</sub> O	Sigma

## 2.1.9 Im ELISA verwendete Antikörper und Reagenzien

**Tabelle 2.3: Verwendete Antikörper und Reagenzien für ELISA Tests.**

Antikörper bzw. Reagenzien	Mengenangabe	Hersteller
Anti-human IFN $\gamma$	1:1000	ImmunoTools
Anti-human IFN $\gamma$ Biotin	1:1000	ImmunoTools
Rekombinantes humanes (rh) IFN $\gamma$	Verdünnungsreihe ab 20 ng/ml	PanBiotech
TMB Peroxidase Substate	50 $\mu$ l/well	KPL (Kirkegaard & Perry Laboratories)
Streptavidin-HRP	1:5000	ImmunoTools
Peroxidase Substrate Solution	50 $\mu$ l/well	KPL (Kirkegaard & Perry Laboratories)

## 2.1.10 Verbrauchsmaterialien für zellbiologische Experimente

**Tabelle 2.4: Verwendete Antikörper und HLA-Tetramer für extrazelluläre und intrazelluläre Färbungen.**

Antigen	Fluoreszenzfarbstoff	Verdünnung	Ursprung	Hersteller
CD107a	FITC	1:100	Maus	BD
CD4	APC-Cy7	1:100	Maus	BD
CD8	FITC	1:100	Maus	eigene Herstellung
CD8	PerCP	1:50	Maus	Biolegend
IL-2	APC	1:40	Ratte	BD
IFN $\gamma$	PE	1:200	Maus	BD
	PE-Cy7	1:400	Maus	BD
MIP-1 $\beta$	PE-Cy7	1:300	Maus	BD
TNF $\alpha$	PacificBlue	1:120	Maus	BioLegend
LLDAHIPQL-Tetramer	PE	0,375 $\mu$ l/Test	Rekombinantes HLA-A*02:01	eigene Herstellung

**Tabelle 2.5: Verwendetes Amin für die Lebend-Tot-Färbung von Zellen.**

Antigen	Fluoreszenzfarbstoff	Verdünnung	Hersteller
Amine	Aqua	1:400	Invitrogen

### 2.1.11 Verwendete Reagenzien für VITAL-Assay im Durchflusszytometer

**Tabelle 2.6: Reagenzien für den Vital-Assay.**

Farbstoff	Hersteller
Carboxyfluoresceindiacetat-succinimidylester (CFSE)	Invitrogen (Life Technologies)
Far Red-Succinimidylester	Invitrogen (Life Technologies)
PI	Invitrogen (Life Technologies)

## 2.2 Zelllinien, Mykobakterien- und Virus-Stämme

### 2.2.1 Zelllinie B-LCL JY

JY ist eine mit Epstein-Barr-Virus immortalisierte B-lymphoblastoide Zelllinie (B-LCL), welche aus einem jungen männlichen Amischjungen mit Leukämie isoliert wurde. Diese Zelllinie ist homozygot für MHC Klasse I-Moleküle (A\*02:01; B\*07:02; C\*07:02) und ist weiterhin charakteristisch für eine hohe Expression dieser Oberflächenmoleküle [ECACC (*European Collection of Cell Cultures*) Ref. 94022533]. Hierbei handelt es sich vorwiegend um eine Suspensionskultur, die jedoch nach mehreren Zellteilungen zur Aggregatbildung neigt.

Die Zelllinie JY wurde in RPMI 1640 mit 10% hitzeinaktiviertem (30 min bei 56°C) FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) kultiviert. Das Medium wurde jeden Montag, Mittwoch und Freitag zugegeben. An jedem dritten oder fünften Tag wurden die Zellen auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt.

### 2.2.2 Zelllinie THP-1

THP-1 wurde 1978 aus einem 1-jährigem Jungen mit einer akuten monozytären Leukämie (AML) isoliert [DSMZ (Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) Ref. ACC 16]. Es ist eine Monozyten-Vorläuferzelllinie, die in

Suspension wächst. Die Zellen werden in IMDM mit 10% FCS und 1% P/S kultiviert. Jeden dritten oder fünften Tag wurden die Zellen auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt.

### **2.2.3 Zelllinie LG2-EBV**

LG2-EBV wurde hier als eine *Feeder*-Zelllinie für durchflusszytometrische und MACS-sortierte T-Zell-Populationen verwendet. Es ist eine EBV-transformierte humane lymphoblastoide Zelllinie, die dem Labor von Pierre van der Bruggen aus Brüssel (Belgien) entstammt. LG2-EBV ist eine Suspensionskultur und wurde in RPMI mit 10% FCS und 1% P/S gehalten. Jeden zweiten Tag wurde Medium zugegeben und einmal die Woche wurden die Zellen auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt.

### **2.2.4 Mykobakterium-Stämme**

#### **2.2.4.1 H37Rv**

H37Rv (ATCC: 25618) ist ein pathogener Laborstamm mykobakteriellen Ursprungs. Der Stamm H37 wurde ursprünglich 1905 isoliert und gewann Aufmerksamkeit durch seine Pathogenität im Meerschweinchen-Tiermodell. Im Jahre 1934 wurde H37 in einen pathogenen „Rv“-Stamm und in einen avirulenten Stamm „Ra“ aufgeteilt (Bifani et al. 2000). Seitdem wurden die beiden Stämme in Labor als Referenzstämme genutzt. Wegen des in Tübingen fehlenden Labors mit der Sicherheitsstufe 3 wurde mit H37Rv in Ulm gearbeitet. Zur Aufzucht wurde H37Rv auf Lowenstein-Jenson oder Middlebrock 7H10 Medium kultiviert und in Glycerol zum Einfrieren (-80 °C) aliquotiert.

#### **2.2.4.2 BCG**

Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Medac Trockensubstanz ist ein Lebendimpfstoff RIVM, welcher bei Patienten mit Blasenkrebs als therapeutisches Mittel zur Aktivierung des Immunsystems verschrieben wird. Die komplette Trockensubstanz wurde vorsichtig unter sterilen Bedingungen in 10 ml PBS oder RPMI resuspendiert und 15 Minuten lang zum Lösen im Ultraschallbad inkubiert. Die mittlere Anzahl an lebensfähigen Einheiten dieser Suspension entsprach  $10^8$  BCG-Partikel pro ml. Die resuspendierte BCG-Lösung wurde bei 4°C gelagert und zur Infektion der THP-1 Zellen verwendet.

### 2.2.5 Modified Virus Ankara (MVA) -Stämme

Das MVA-Ag85A (MVA85A) ist ein für die Tuberkulose entwickeltes *Subunit*-Vakzin, welches die Immunantwort auf Mtb nach einer BCG-Impfung verstärken soll (McShane et al. 2004). Zurzeit befindet sich MVA85A als Impfkandidat in der klinischen Phase IIb (Tameris et al. 2013). MVA ist ein lebender Vaccinia-Stamm, der nach der Infektion seiner Zielzellen nicht mehr repliziert. MVA85A kodiert das mykobakterielle Protein Ag85A (*mycobacterial mycol-transferase A*; Rv3804c) welches immunogene Wirkung gezeigt hat (McShane et al. 2002; Huygen et al. 1996). In klinischen Studien zeigte sich MVA85A als sicheres und immunogenes Booster-Vakzin (McShane et al. 2004; Hawkrigde et al. 2008).

MVA-TBF kodiert neben Ag85A zusätzlich TB9.8 (*ESAT-6 like protein ESXG*; Rv0287), TB10.4 (*low molecular weight protein antigen 7 ESXH*; Rv0288) und Acr2 (*heat stress induced ribosome binding protein A*; Rv0251c).

MVA-85A, MVA-TBF, MVA-GFP (*green fluorescent protein*) und MVA-wt (Wildtyp) wurden freundlicherweise von Helen McShane und ihrem Team der Universität Oxford zur Verfügung gestellt. Alle Virus-Stämme wurden auf Trockeneis in 10 mM Tris pH 9,0 bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.6 Spender für immunologische Experimente

Bei den Spendern, denen für die immunologischen Tests Blut abgenommen wurde, handelt es sich um BCG-geimpfte und nicht-geimpfte Spender (Tabelle 3.8). Zusätzlich wurden sie einem PPD-ELISA (*Purified Protein Derivate*) unterzogen (2.6.11) und mit dem QuantiFERON®-Tb-Test getestet. Der QuantiFERON®-Tb-Test dient zur Feststellung ob die Spender Kontakt mit dem pathogenen Stamm *M. tuberculosis* und dementsprechend eine Infektion durchlaufen hatten. Hierbei handelt es sich um ein „*INF $\gamma$ -Release-Assay*“, in dem das freigesetzte IFN $\gamma$  nach Kontakt mit ESAT-6, CFP-10 und TB7.7 in einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) nachgewiesen wird ([http://www.cellestis.com/IRM/content/aust/qftproducts\\_tbgoldintube.html](http://www.cellestis.com/IRM/content/aust/qftproducts_tbgoldintube.html)). Die in QuantiFERON®-Tb-Test verwendeten mykobakteriellen Antigene werden von dem BCG-Impfstamm nicht exprimiert (Andersen et al. 2000; Arlehamn et al. 2012). Den Spendern wurde dafür Blut nach Herstellerprotokoll abgenommen und zur Auswertung an das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Tübingen abgegeben.

### 2.2.7 Spender für Infektion mit H37Rv

Für die Infektion mit Mykobakterien wurden *Buffy Coats* und Leukapheresen aus der Transfusionsmedizin Ulm und Tübingen verwendet. Beide Blutprodukte wurden nach der Isolierung der PBMCs und 90 Minuten langer Adhärenzphase in Makrophagen ausdifferenziert, damit sie mit H37Rv infiziert werden konnten. Die Monozyten wurden zu Makrophagen in RPMI 1640 mit 5% HS, 1% P/S und 10 ng/ml GM-CSF für  $5 \pm 1$  Tage ausdifferenziert.

## 2.3 Theoretischer Hintergrund der Methoden

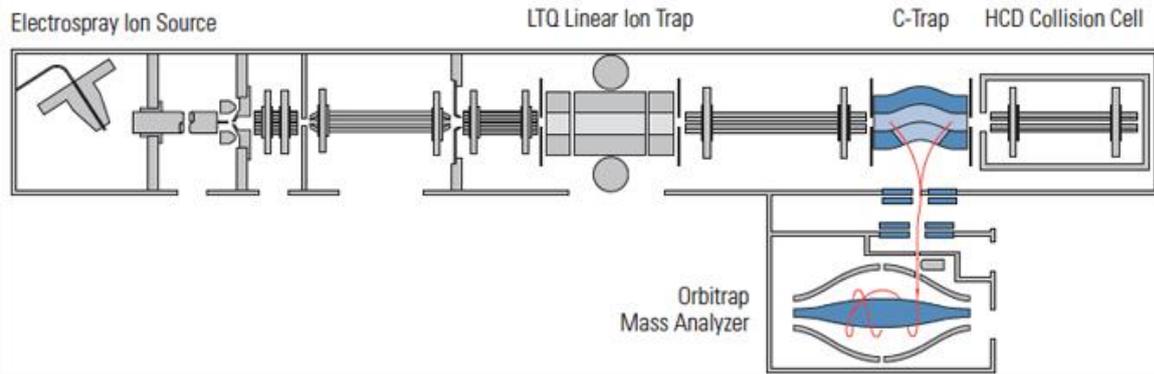
### 2.3.1 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren zur Analyse des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ -Verhältnis) einzelner ionisierter Moleküle (Thomson 1913; Aston 1933). Die ionisierten Moleküle können auf unterschiedlichem Wege erzeugt werden, wobei im Rahmen dieser Arbeit nur die sogenannte *Electrospray*-Ionisation (ESI) verwendet wurde (Fenn et al. 1989; Whitehouse et al. 1985). Vor der eigentlichen Analyse im Massenspektrometer wurden die komplexen Proben in einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) aufgetrennt, welche wiederum selber an die Ionisationsquelle gekoppelt ist. Als Gesamtes wird diese Methode der Auftrennung und Analyse als LC-MS-Analyse (*liquid chromatography mass spectrometry*) bezeichnet.

Der Analyt wird in einem säurehaltigen Lösungsmittel gelöst, wodurch die Moleküle in einen protonierten Zustand überführt werden. Diese werden durch eine dünne Kapillare als Spray in Richtung Massenspektrometer gepumpt, an deren Spitze der positive Pol einer hohen Spannung (im Bereich von 1 kV) anliegt. Die hohe Spannung bewirkt an der Spitze der Kapillare die Entstehung von kleinen, positiv geladenen Lösungströpfchen. Die Ionen gelangen durch eine beheizte (ca. 200°C) Transferkapillare ins Innere des Massenspektrometers an dem der negative Pol anliegt. Durch die Verdunstung des Lösungsmittels verkleinern sich die Tröpfchen bis die kritische Schwelle der Ladungsdichte so groß wird, dass die Tröpfchen in sogenannten Coulomb-Explosionen zerfallen und in einzelne Ionen in der Gasphase freigesetzt werden. Wie letztendlich die einzelnen Analyt-Ionen entstehen ist nicht gänzlich geklärt. Zwei Modellvorstellungen existieren, IEM

(*ion evaporation model*) und CRM (*charged residue model*). Beim IEM geht man davon aus, dass einzelne Ionen am Rand der Tröpfchen austreten, sobald die Feldstärke und Ladungsdichte im Tropfen hoch genug ist (Nguyen & Fenn 2007). Das CRM weist auf die wiederholte Explosion einzelner Tröpfchen, die bei erhöhter Ladungsdichte eintritt. Die Tröpfchen explodieren fortwährend zu kleineren bis darin nur noch einzelne Molekülonen enthalten sind, aus denen dann das Lösungsmittel verdunstet (Dole 1968).

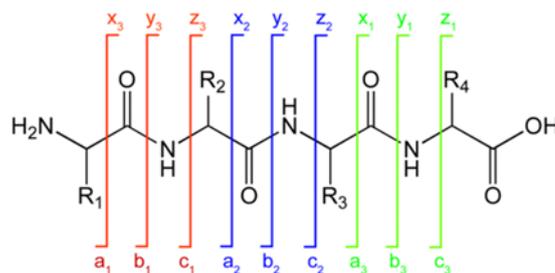
Die Analyse isolierter Peptide fand in einem Hybridmassenspektrometer LTQ Orbitrap XL von Thermo Scientific statt. Das Gerät kombiniert zwei hochauflösende Analysatoren: die LTQ (*linear trap quadrupole*) sowie einen Orbitrap-Massenanalysator (Abbildung 2.1). Zusätzlich befindet sich in dem Gerät eine eingebaute HCD-Kollisionszelle, die eine erweiterte MS/MS-Untersuchung von Proben und deren Strukturaufklärung ermöglicht. Die Ionen gelangen durch die Transferkapillare in das eigentliche Massenspektrometer. Die Transferkapillare ist beheizt und umspült von heißem Stickstoff. An dem Linsensystem werden die Ionen in der LTQ fokussiert und in die Ionenfalle injiziert. In der linearen Ionenfalle wird der Ionenstrom von der ESI-Quelle gesammelt, fragmentiert und gemessen. In unserem System wurde der Strom weiter in die hintere C-Trap, die ihren Namen ihrer gebogenen Form verdankt, orthogonal gelenkt. Aus der C-Trap werden die Ionen-Pakete weiter in den Orbitrap-Massenanalysator (E-TRAP) geleitet. Dort wird das Masse-zu-Ladungs-( $m/z$ ) Verhältnis im elektrischen Feld des Masseanalysators mit Hilfe der Oszillation der Moleküle bestimmt. Die Oszillation ermöglicht die Bewegung der Ionen auf einer Kreisbahn mit gleichzeitiger Schwingung, welche durch die elektrostatische Anziehungskraft radial um eine in der Mitte befindliche spindelförmige Elektrode entsteht. Das  $m/z$ -Verhältnis der Ionen wird an der harmonischen Oszillation entlang der z-Achse berechnet. Zur weiteren Analyse der Moleküle werden manche von ihnen in der LTQ anhand ihrer Masse aussortiert und die gefangenen Ionen mit Helium fragmentiert und zuletzt gemessen.



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines LTQ Orbitrap XL Massenspektrometers.**

Vorne befindet sich die ESI-Quelle (*Electrospray Ion Source*), die den Analyten in einen kontinuierlichen Ionenstrom überführt und in Paketen an die C-Trap weiterleitet. Die C-Trap dirigiert den Ionenstrom weiter in den Orbitrap-Analysator, welcher das  $m/z$ -Verhältnis von Ionen-Paketen im MS-Scan bestimmt. Im MS/MS-Modus werden ionisierte Peptide bestimmter Masse gesammelt und fragmentiert. Die MS-Scans laufen in der Orbitrap ab und parallel MS/MS-Scans in der linearen Ionenfalle. (Thermo Fisher Scientific LTQ Orbitrap XL™ Hardware Manual).

Die Peptide werden durch CID (*collision induced dissociation*) fragmentiert, dabei entstehen verschiedenen Ionen (Roepstorff & Fohlman 1984). Hypothetisch kann ein Peptid (Abbildung 2.2) an verschiedenen Stellen brechen, jedoch bricht jedes Peptid in einem bestimmten Muster (Fragmentspektrum) an dem es erkannt werden kann.



**Abbildung 2.2: Peptid-Fragmentierung.**

Das Rückgrat eines Peptids kann an mehreren Stellen brechen mit dem Resultat, dass zwei Fragmente entstehen. Die Fragmente werden anhand ihrer Sequenz benannt, wobei Fragmente mit N-Terminus a, b und c heißen und die Fragmente mit einem C-Terminus x, y und z. Durch CID zerfallen Peptid-Ionen bevorzugt in b- und y-Ionen (<http://www.mbc.manchester.ac.uk/whatwedo/Fragmentation.png>).

Die Masse fragmentierter Ionen wird zusätzlich neben der Masse des Mutterions (nicht-fragmentiertes Ion) aufgenommen und daraus schließt man auf die Sequenzabfolge des zu analysierenden Peptids. Mit Hilfe der Datenbanken, in der Sequenzen hinterlegt sind, ist die Identifikation von Sequenzen vieler Peptide in kurzer Zeit möglich.

### **2.3.2 Peptidstimulation von CD8<sup>+</sup> Gedächtnis T-Zellen**

Trotz der hochspezifischen Verfahren (FACS, ELISPOT) gelingt der *ex vivo*-Nachweis von spezifischen T-Zellen oft nicht. Der Grund dafür wäre, dass peptidspezifische T-Zellen in sehr kleinen Populationen vorliegen. Die Nachweisgrenze beim ELISPOT liegt ungefähr im Bereich einer spezifischen Zelle in einem Pool von  $1 \cdot 10^4$  unspezifischen Zellen (Scheibenbogen et al. 2000). Erfahrungsgemäß kann man bei naiven T-Zellen mit einer antigenspezifischen Zelle in  $1 \cdot 10^6$  Zellen rechnen. Um tatsächlich spezifische Zellen detektieren zu können, bedient man sich eines bekannten immunologischen Phänomens der Amplifikation. Im Grunde werden die Zellen vor der Durchführung der Tests durch einmalige Gabe eines Stimulus (Peptid) zu Beginn einer 12-tägigen Stimulationsphase und der Gabe von IL-2, dem T-Zellwachstumsfaktor amplifiziert. Diese Methode funktioniert auch dann wenn im PBMC-Pool APZs wie z.B. Monozyten, die über Klasse-I-Moleküle verfügen, sich befinden. Durch eine hohe Dosis an Testpeptid ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) werden einige auf den HLA-Molekülen der Zellen gebundenen Peptide aus den Bindungsfurchen verdrängt und durch das Testpeptid ersetzt. In dem Zell-Pool befindliche spezifische CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen erkennen das so präsentierte Peptid, beginnen sich zu teilen und erlangen ihre Effektorfunktionen. Nach dieser 12-tägigen Proliferationsphase können die spezifischen Zellen z.B. durch eine erneute Peptidgabe und IFN- $\gamma$ -Nachweis detektiert werden (Kyzirakos 2009).

### **2.3.3 ELISPOT**

Der IFN- $\gamma$ -ELISPOT (*Enzyme Linked Immunospot*) bietet die Möglichkeit, antigenspezifische Zellen auf Einzelzellebene zu quantifizieren. Mit ELISPOT ist die Detektion von Zellen über eine antigenabhängige Aktivierung der IFN- $\gamma$ -Produktion möglich. Eine Mikrotiterplatte wird mit einem Antikörper, welcher das Protein von Interesse (hier IFN- $\gamma$ ) erkennt, beschichtet. Danach können Zellen hinzugegeben, spezifisch stimuliert und für 24 – 26 Stunden inkubiert werden. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen durch sorgfältiges Waschen entfernt und ein biotinylierter Sekundärantikörper wird dazugegeben, der

ebenfalls an das Protein von Interesse (IFN- $\gamma$ ) bindet. Über Avidin wird daran ein Enzym gekoppelt, welches die Umsetzung eines Farbstoffes katalysiert. Der Farbstoff präzipitiert in unmittelbarer Umgebung und führt zur Bildung der typischen Punkte („Spots“). Jeder detektierte Spot stellt eine IFN- $\gamma$ -produzierende Zelle dar (Kyzirakos 2009). Eine spezifische Antwort auf ein Peptid bedeutet, wenn mindestens der Mittelwert von 10 Spots als Reaktion auf ein Peptid detektiert wird und die Anzahl der Spots mindestens dreifach über der Negativkontrolle (DMSO) liegt.

### 2.3.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder auch FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) ist eine Methode zur phänotypischen und funktionalen Analyse von Zellen deren Gesamtanteil in einer Population in der gleichen Messung quantifiziert werden kann. Trotz der Namensgebung findet meist keine Sortierung sondern eine reine Analyse statt. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Detektion von optischen Signalen, die von der Zelle selbst oder durch gebundene Fluoreszenzfarbstoffe nach Anregung durch einen Laserstrahl emittiert werden. Die Zellen werden hierbei durch eine vibrierende Fließkammer in Einzelzellsuspension gebracht und durch hydrodynamische Fokussierung einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Photomultiplikatoren messen die emittierten Signale. Zuerst werden die Zellen mit Hilfe des Vorwärtsstreulichts (FSC, *Forward Scatter*) und des Seitwärtsstreulichts (SSC, *Side Scatter*) anhand ihrer Größe und Granularität in verschiedene Populationen eingeteilt, hierzu sind keine gebundenen Farbstoffe nötig. Dazu passieren die Zellen einen Laserstrahl der Wellenlänge 488 nm, die von ihnen verursachte Lichtstreuung wird gemessen. Das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität, also u.a. von der Anzahl an Vesikeln in einer Zelle beeinflusst wird. Anhand dieser Parameter können verschiedenen Leukozyten, wie Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten, voneinander unterschieden werden. Zur weiteren Aufteilung werden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt, die entweder *per se* an bestimmte Moleküle der Zelle binden (wie z.B. Life Dead Aqua, ein aminreaktiver Fluoreszenzfarbstoff), oder an monoklonale Antikörper gekoppelt sind, welche die Antigene von Interesse binden. Diese Antigene sind meist Oberflächenmerkmale wie die Proteine der CD-Klassifizierung (*cluster of differentiation*, CD), aber auch intrazelluläre Merkmale können nach Permeabilisierung der Zellmembran für eine Färbung zugänglich gemacht werden. Durch die Verwendung verschiedenfarbiger Laser und verschiedener Filter kann die Anzahl der unterscheidbaren Fluoreszenzfarbstoffe

und somit die vielfältige Charakterisierung der Zellen erhöht werden. In dieser Arbeit wurde mit dem FACSCanto II (BD) gearbeitet, welches über 3 Laser (Wellenlängen: 488 nm, 633 nm und 405 nm) und die Möglichkeit, 8 verschiedene Farben zu messen, verfügt (Kyzirakos 2009).

### **2.3.5 Intrazelluläre Zytokinfärbung**

Die intrazelluläre Zytokinfärbung bietet im Gegensatz zum ELISPOT die Möglichkeit Zellen anhand ihrer Zytokinproduktion nach einem Antigenkontakt und gleichzeitiger Oberflächenmarkierung phänotypisch zu bestimmen ohne eine vorherige aufwändige Zellseparation durchführen zu müssen. Jede Zelle kann dabei individuell auf verschiedene phänotypische Eigenschaften und Funktionen überprüft werden. Hierbei werden die Zellen zusätzlich zur intrazellulären Zytokinfärbung auf charakteristische Oberflächenantigene (z.B. CD4 und CD8) angefärbt. Um die stimulierte Zytokinproduktion intrazellulär nachzuweisen, muss die Sekretion der Zytokine verhindert werden. Dies geschieht unter Verwendung von Proteintransportinhibitoren. Während dieser Arbeit wurde Brefeldin A verwendet, es blockiert den vesikulären Proteintransport vom rauen endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat (Klausner et al. 1992). Nach einer festgelegten Produktionsphase sammeln sich die Zytokine im intrazellulären Lumen. Zur Permeabilisierung werden die Zellen mit einer Saponine enthaltenden Lösung behandelt und somit für die Anfärbung durch Antikörper zugänglich gemacht. Die intrazelluläre Zytokinfärbung kann zusätzlich auch mit einer Lebend/Tot-Färbung, z.B. mit dem aminreaktiven Farbstoff Live/Dead Aqua, kombiniert werden (Kyzirakos 2009).

### **2.3.6 HLA-Tetramerfärbung**

Mit der HLA-Tetramerfärbung hat man die Möglichkeit T-Zellen anhand ihrer Antigenspezifität zu bestimmen. Tetramere sind Komplexe aus einem Streptavidin-Molekül, an dem noch zusätzlich vier HLA-Monomere gebunden sind. HLA-Monomere sind rekombinante Komplexe aus einem synthetisch hergestellten Peptid,  $\beta_2$ -Mikroglobulin und MHC Klasse I, dessen transmembrane und zytosolische Region durch eine Sequenz zum Biotinylieren ersetzt wurde (Beckett et al. 1999). Um anschließend die mit Tetramer gebundenen Zellen erkennen zu können, wird für die Tetramerherstellung Farbstoffgekoppeltes Streptavidin verwendet. Mit dieser Methode ist es möglich in einer FACS-Messung T-Zellen unterschiedlicher Antigenspezifität zu erfassen.

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Isolierung von PBMCs mittels Ficoll

PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) wurden aus *Buffy Coat* und Leukapheresen mittels Leukozytenseparationsmedium („Ficoll“) nach Standardprotokoll isoliert. In die 50 ml-Röhrchen wurden 15 ml Ficoll vorgelegt, darauf wurden vorsichtig Leukozytenkonzentrate aus *Buffy Coat* bzw. Leukapherese, welche vorher 1:2 mit PBS verdünnt wurden, überschichtet. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 2000 rpm bei RT für 25 - 30 Minuten ohne Bremse. Als nächstes wurde ein Drittel des Plasma-PBS-Gemischs verworfen. Der weißliche Interphasen-Ring wurde abgenommen. Dieser Ring wurde sogleich wieder mit PBS gemischt und bei 1500 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Danach wurden die PBMCs nochmal 2mal mit PBS gewaschen (erster Waschschrift: 1300 rpm; zweiter Waschschrift: 1100 rpm, für je 10 min). Die isolierten PBMCs wurden gezählt und bei -80°C im Einfriermedium eingefroren (siehe 2.4.2) bzw. sofort für weitere Versuche verwendet.

Die Blutprodukte wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Wernet (Zentrum für klinische Transfusionsmedizin) zur Verfügung gestellt. Soweit nicht anders angegeben wurden die PBMCs für T-Zellversuche in T-Zellmedium und für Makrophagen-Ausdifferenzierung in Makrophagen-Medium (RPMI mit 5 % HS, 1% P/S, 10 ng/ml GM-CSF) kultiviert. Die PBMCs wurden zum Vorbereiten der Versuche immer im T-Zellmedium gewaschen und bei 1400 rpm für 7 Minuten bei RT zentrifugiert.

### 2.4.2 Einfrieren von Zellen

Die Kryokonservierung von Zelllinien erfolgte in 4°C kaltem Einfriermedium. Die PBMCs wurden in zwei Einfriervolumina aliquotiert ( $1 \cdot 10^8$  Zellen in 2 ml und  $2 \cdot 10^7$  in 1 ml). Alle anderen Zelllinien wurden in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^8$  in 2 ml eingefroren, wobei die ausdifferenzierten Makrophagen sofort für die Infektionsversuche verbraucht wurden. Nachdem die Zellen in Einfriermedium aufgenommen wurden, wurden sie sogleich in vorgekühlte Einfrierboxen überführt, welche mit Isopropanol gefüllt waren und somit ein langsames Einfrieren (1°C pro min) ermöglichen.

### 2.4.3 Auftauen von Zellen

Da das im Einfriermedium enthaltene DMSO eine zytotoxische Wirkung auf Zellen hat, wurden bei -80°C gelagerte Zellen möglichst rasch aufgetaut. Dafür wurden die PBMCs in der Hand oder im Wasserbad bis zur halben Schmelze aufgetaut und augenblicklich in 15 ml warmem Auftaumedium aufgenommen. Die Zellen wurden sogleich für 7 Minuten bei 1400 rpm (Megafuge 1.0) abzentrifugiert, nochmals mit Medium gewaschen und dann im gewünschten Medium aufgenommen. Die Zelllinien (JY, THP-1 und LG 2-EBV) wurden im Kulturmedium aufgetaut, damit gewaschen und letztendlich darin kultiviert.

### 2.4.4 Ermitteln der Lebend-Zellzahl

Die Lebend-Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer und Trypanblau ermittelt. Trypanblau färbt tote Zellen tiefblau da es durch die Membran eindringt, die Lebenden erscheinen im Vergleich leuchtend. Da Trypanblau bei längerer Einwirkzeit toxisch ist, wurden die Zellen kurz vor dem Zellzählvorgang mit dem Farbstoff gemischt und in die Zählkammer gegeben. Es wurden 4 Großquadrate gezählt und deren Mittelwert bestimmt. Die Zellzahl wurde durch die folgende Formel ermittelt:

$$\frac{\text{Mittelwert}}{10e4} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Gesamtvolumen [ml]}$$

### 2.4.5 Infektion von B-LCL mit MVA

Für die Infektion wurden die Zelllinien JY bzw. THP-1 kurz vor Viruszugabe zweimal mit PBS gewaschen und gezählt. Anschließend wurden je  $10 \cdot 10^8$  Zellen in 1 ml PBS gelöst und die entsprechende Virusmenge für die jeweilige MOI (*multiplicity of infection*) dazugegeben. Die Suspension von Zellen und Viren wurde zusammen eine Stunde lang bei 37°C und sanftem Schütteln inkubiert. Nach einer Stunde wurde Kultiviermedium auf die infizierten Zellen gegeben und eine gegebene Zeit (2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h und 16 - 17 h) im Brutschrank stehen gelassen. Als nächstes wurden diese geerntet (in 50 ml-Röhrchen überführt und abzentrifugiert, 1700 rpm, 10 min) und zweimal mit PBS gewaschen. Zuletzt wurde das Pellet im 2fach Lysepuffer resuspendiert und bei -80°C bis zur MHC/Peptid-Präzipitation gelagert.

## 2.4.6 Infektion von monozytären Makrophagen mit dem Laborstamm H37Rv

Um die Makrophagen mit H37Rv (*Mycobacterium tuberculosis*, Laborstamm) zu infizieren, wurden Makrophagen aus Monozyten generiert. Als erstes wurden PBMCs mit Hilfe der Ficoll-Aufreinigung isoliert (2.4.1.) und in 21 ml Kulturmedium (RPMI, 5% HS) für 60 - 90 Minuten in Kulturflaschen (250 cm<sup>2</sup>, Blue-Cap, Sigma –Aldrich) zur Adhärenz stehen gelassen. Die nicht adhärenen Zellen wurden abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und die nicht-adhärenen Zellpellets mit flüssigem Stickstoff schockgefroren oder bei -80°C eingefroren. Die Flaschen mit adhärenen Monozyten wurden ebenfalls zweimal mit PBS gewaschen und in 30 ml Kulturmedium mit 10 ng/ml GM-CSF benetzt. Die Monozyten wurden zur Ausdifferenzierung in Makrophagen in Anwesenheit von GM-CSF für 5 ± 1 Tage inkubiert. Zur Hochregulation von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche wurden die Makrophagen aus zweiter Leukapherese (L02) vor der Infektion mit 100 U/ml IFN $\gamma$  2 Tage lang stimuliert.

Infolge eines fehlenden S3-Labors wurden die monozytären Makrophagen (*monocyte-derived macrophages*, MDM) nach Ulm zur Infektion mit H37Rv gebracht. Dort wurden die Zellen abgeerntet und gezählt. Die Bakterien wurden aufgetaut und 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden die Zellen und H37Rv mit MOI5 gemischt und für 1 oder 3 Tage inkubiert. Nach der erwünschten Infektionszeit wurden die Zellen abgeerntet und mit Hilfe des Lyspuffers wie in 2.5.5 beschrieben lysiert.

## 2.4.7 Kultivierung von PBMCs für ELISPOT-Versuche

Frisch isolierte PBMCs oder aufgetaute PBMCs wurden für ELISPOT-Versuche in T-Zell-Kultiviermedium im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) abhängig von der ermittelten Zellzahl in verschiedenen Zellkulturplattengrößen gehalten (Tab. 2.8).

**Tabelle 2.7: Geeignete Anzahl Zellen in verschiedenen Plattengrößen.**

Plattengröße (in Wells)	Geeignete Anzahl Zellen pro Well (*10 <sup>6</sup> )	Geeignetes Volumen Kultiviermedium (ml)
6	20 - 30	3 - 5
12	10 - 12	2 - 4
24	5 - 6	1 - 2
48	2,5 - 3	0,5 - 1
96	0,3 - 1,3	0,15 - 0,2

#### **2.4.8 Peptidstimulation von Gedächtnis-T-Zellen für ELISPOT und ICS-Analysen**

Die T-Gedächtnis-Zellen wurden nach 13 Tagen Peptidstimulation gewonnen (Weinzierl et al. 2008). Die zu testenden PBMCs wurden zuerst (Tag 1) anhand ihrer Zellzahl ausplattiert (siehe Tab. 2.8). Am nächsten (Tag 2) wurde die erste Stimulation durchgeführt. Die Peptide wurden in T-Zellmedium (1/4 des Gesamtvolumens) in der Konzentration 1 µg/ml gelöst und auf die Zellen gegeben. Die PBMCs wurden mit den zu testenden Peptiden immer als Peptid-Pool (1 µg/ml pro Peptid) stimuliert. Anschließend erfolgte die 2malige Stimulation mit IL-2 (20 U/ml) an den Tagen 3 und 6. Am Tag 9 oder wenn nötig früher wurden die Zellen gesplittet und zusätzlich frisches T-Zell-Medium zugeführt. Das PHA bzw. PMA/Ionomycin, ein Mitogen und Agglutinin, welches die Eigenschaft hat, T-Zellen unspezifisch zur IFN- $\gamma$ -Produktion anzuregen, diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle diente hier in den ELISPOT-Versuchen DMSO. Alle zu testenden Peptide wurden in DMSO gelöst, um auszuschließen, dass DMSO auf PBMCs eine aktivierende Wirkung hat. Eine Negativkontrolle mit einem Negativ-Peptid gibt es in diesem Ansatz nicht, jedoch werden hier die Zellen mit allen Epitopkandidaten zusammen als Pool und auch mit HLA-unpassenden Peptiden stimuliert. Deswegen konnte ausgeschlossen werden, dass die IFN $\gamma$ -Antworten unspezifisch als Stress auf ein Peptid ausgelöst wurden.

Am Tag 12 konnten die Zellen für ELISPOT für eine extra- und intrazelluläre Färbung verwendet werden. Nach 12tägiger Amplifikation konnten die Zellen auch für eine MACS-vermittelte oder für eine Durchflusszytometrie (FACS-Sorter)-vermittelte Isolation von Tetramer-spezifischen und CD8-positiven Zellen genutzt werden.

#### **2.4.9 Zellseparation von Tetramer-spezifischen T-Zellen mittels FACS-Sorter**

Bevor die FACS-vermittelte T-Zellseparation durchgeführt wurde, wurde das hergestellte HLA-Tetramer zuerst an den 12 Tage restimulierten bzw. amplifizierten T-Zellen getestet (siehe 2.7.5). Die eigentliche Tetramer-vermittelte Isolierung von Epitop-spezifischen T-Zellen erfolgte mit einem spezifischen Tetramer unter sterilen Bedingungen. Es wurde zügig gearbeitet, da die Zellen bei 4°C gelagert wurden und noch lebend für die anschließende Sortierung mithilfe eines BD FACSAria sein sollten.

Vor der Tetramer-CD8-Färbung wurden 96-Well-Platten mit runden Böden und *Feeder*-Zellen vorbereitet. Als *Feeder*-Zellen wurde pro Well 0,15\*10<sup>6</sup> frisch isolierte PBMCs von mindestens 3 Spendern und 0,015\*10<sup>6</sup> LG2-EBV-Zellen ausgesät. Die *Feeder*-Zellen wurden gezählt und anschließend in einer Gamma-Zelle bestrahlt damit die Zellteilung

unterbrochen wird: PBMCs mit einer Dosis von 60 Gray und LG2-EBV mit 200 Gray. Nach dem Bestrahlen wurden die *Feeder*-Zellen vereinigt, in T-Zellmedium resuspendiert und in einem Volumen von 150 µl auf die Platten verteilt. Zusätzlich wurden die Mediatoren IL-2 und PHA-L in die Feeder-Zellsuspension gegeben, in der Verdünnung IL-2 150 U/ml und PHA-L 1 µg/ml.

Nach der 12-tägigen Amplifikation der Zellen mit dem Peptid LLDAHIPQL wurden die Zellen geerntet und gezählt. Die Färbung der T-Zellen mit HLA-Tetramer und folgend mit CD8-Antikörpern erfolgte nach dem Protokoll 2.7.3 mit kleinen Modifikationen. Die Waschschrte erfolgten im MACS-Puffer und die einzelnen Reagenzien wurden darin gelöst. Zur Vorbereitung wurden die Zellen in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und mit 10 ml 4°C kalten MACS-Puffer gewaschen. Wegen des größeren Volumens wurde hier 10 Minuten lang in der auf 4°C vorgekühlten Megafuge bei 1300 rpm zentrifugiert. Für die eigentliche Tetramerfärbung wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen (4-5\*10<sup>6</sup> amplifizierte Zellen pro Röhrchen) mit 200 µl Endvolumen (auf 200 µl 1,5 µl LLDAHIPQL-Tetramer-PE) 30 Minuten auf Eis (4°C) und im Dunkeln gefärbt. Das Tetramer wurde in sterilem Tetramer-Puffer gelöst. Die Markierung der Ko-Rezeptoren CD8 erfolgte in 200 µl MACS-Puffer mit entsprechender Verdünnung der Antikörper. Zuletzt wurden die zu sortierenden Zellen in 300-500 µl MACS-Puffer gelöst und durch ein steriles Zellsieb filtriert. Die T-Zell Separation wurde mit Hilfe von Sabrina Treml von der Core Facility Tübingen am Sorter FACS Aria durchgeführt. Die separierten Zellen wurden wie in 2.3.11 kultiviert.

#### **2.4.10 Magnetunterstützte Zellseparation (MACS) von T-Zellen**

Die restimulierten Zellen wurden am Tag 12 bzw. 13 mit Hilfe von PE-Magnetikbeads anhand des Hersteller-Protokolls isoliert. Hierbei handelt es sich um eine positive Selektion: das heißt die Zellen wurden mit erwünschter Spezifität an die Säule gebunden und die restlichen Zellen nach dem Waschschrte als Durchfluss gesammelt. Als Vorbereitung wurden die Zellen vorher mit PE-gekoppelten HLA-Tetramer unter sterilen Bedingungen in MACS-Puffer wie in 2.4.9 gefärbt ohne anschließende Färbung von CD8.

Nach der Tetramer-Inkubation wurden auf 10<sup>7</sup> Zellen 1-2 ml MACS-Puffer gegeben, resuspendiert und bei 1400 rpm für 8 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig verworfen und die Zellen in 80 µl Puffer und 20 µl anti-PE MicroBeads pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert. Die Zell-Reagenz-Mischung inkubierte für 15 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Anschließend wurden die *Beads*-gebundene Zellen wieder wie oben gewaschen und in MACS-Puffer (500 µl/10<sup>8</sup> Zellen) für die eigentliche magnetische Zell-Aufreinigung gelöst. Die Säule im Magnetfeld wurde mit MACS-Puffer equilibriert und die Zellen in die

MACS-Säule gegeben. Die Tetramer negativen Zellen wurden mit dreifachen Säulenvolumina des MACS-Puffers ausgewaschen. Zuletzt wurde die Säule aus dem Magnetfeld gebracht und die Tetramer-positiven Zellen wiederum mit dreifachen Säulenvolumina eluiert. Diese Zellen wurden dann in ein Well einer 6-Well-Platte ausplattiert und wie in 2.4.11 kultiviert.

#### **2.4.11 Kultivierung von FACS- bzw. MACS-sortierten T-Zellen**

Nach der Isolation von Tetramer-spezifischen T-Zellen wurden sie in der ersten Woche am Montag, Mittwoch und Freitag mit IL-2 (20 U/ml) in T-Zellmedium stimuliert. In der nachfolgenden Woche wurde nur Dienstag IL-2 (20 U/ml) auf die Zellen gegeben und am Donnerstag wurden die LLDAHIPQL-spezifischen T-Zellen mit *Feeder*-Zellen sowie IL-2 und PHA-L mit den in 2.4.9 angegebenen Konzentration restimuliert. Die Aufteilung einer T-Zell Population in zwei Wells erfolgte erst, wenn das Medium nach 2-3 Tagen eine Gelbfärbung zeigte und die Zunahme der Zelldichte beobachtet werden konnte. Sich vermehrende Populationen wurden zuerst mittels Tetramerfärbung auf ihre Spezifität untersucht. Die Tetramer-positiven T-Zellen wurden anschließend auf ihre Fähigkeit Zytokine nach einer Aktivierung mit entsprechendem Peptid zu exprimieren untersucht.

## **2.5 Proteinchemische Methoden**

### **2.5.1 Synthese der Peptide**

Alle verwendeten Peptide wurden von Patricia Hrستیć, Nicole Zuschke und Stefan Stevanović nach Standard-Fmoc-Chemie synthetisiert. Die Syntheseprodukte wurden anschließend mittels HPLC auf Reinheit sowie massenspektrometrisch, im QTOF-Massenspektrometer, auf Identität überprüft. Die Peptide wurden lyophilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

### **2.5.2 Lösung und Aufbewahrung von Peptiden**

Die lyophilisierten Peptide wurden mit einer Analysenwaage abgewogen und zuerst in DMSO in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Danach wurden die Peptide in sterilfiltriertem Milli-Q-Wasser auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Bei Einsatz im Massenspektrometer wurden die Peptide auf die Zielkonzentration von 10 pmol/ml gebracht.

### **2.5.3 Multimerisierung von MHC Klasse I-Komplexen via Streptavidin**

100 µg MHC-I-Monomer wurden im stöchiometrisch molaren Verhältnis von 4:1 (HLA:Streptavidin) mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertem Streptavidin (Konjugiertes Streptavidin-PE, *phycoerythrin*, von Invitrogen) versetzt. Hier: auf 50 µg Monomer kamen insgesamt 78,5 µl Streptavidin-PE. Zur Multimerisierung wurde die berechnete Menge Streptavidin in 10 Intervallen à 10% der errechneten Gesamtmenge zugegeben und jeweils für 30 Minuten im Dunkeln bei 4°C rotiert. Die fertige Tetramerlösung wurde bei ca. 4°C im Dunkeln gelagert. Die Tetramerkonzentration betrug bei PE-Konjugation 483 µg/ml. HLA-Monomere wurden freundlicherweise von Stefanie Souczek hergestellt.

### **2.5.4 Lyse von Zellpellets**

Die komplette Herstellung des lysierten Zellpellets wurde bei 4°C durchgeführt.

Die frischen bzw. eingefrorenen Zellpellets wurden mit einem Volumen des 2fach Lysepuffers versetzt und mindestens 30 Minuten heftig geschüttelt. Im Lysepuffer eingefrorene Zellpellets wurden direkt auf den Schüttler gestellt und bis zur kompletten Lösung geschüttelt. Nach der Zugabe eines Volumens 1fach konzentrierten Lysepuffers wurden die Zellen eine Stunde lang auf den Schüttler gestellt. Anschließend wurde das Lysat drei Mal 20 Sekunden mit je 20 Sekunden Pause auf Eis sonifiziert. Dem folgte eine weitere Zugabe von einem halben bis ganzen Volumen von 1fach Lysepuffer und eine weitere Stunde Inkubation auf dem Schüttler. Das Zelllysat wurde auf 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße verteilt und bei 13000 rpm für mindestens 1,5 h zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Nach Filtration durch einen 0,2 µm-Filter wurde das erhaltene Lysat bei -80°C gelagert oder weiter verwendet (Trautwein 2011; Kowalewski & Stevanovic 2013).

### **2.5.5 Herstellung von Lysat aus H37Rv-infizierten Makrophagen**

Die Herstellung von Lysat aus infizierten Makrophagen wurde nach dem Original-Protokoll mit einigen Abweichungen durchgeführt. Die nicht-adhärenenten Makrophagen wurden abgenommen und in Falcon-Röhrchen angepasster Größe überführt, anschließend abzentrifugiert (10 min, 1300 rpm Megafuge), Überstand verworfen und das Zellpellet in

0,5 ml 2fach Lysepuffer mit Vortexer gemischt. Zusätzlich wurden wieder 0,5 ml 1fach Lysepuffer zugegeben, die Zellsuspension bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert und noch 1 ml 1fach Lysepuffer zugeführt. Die Lösung wurde auf Eis bis zum nächsten Schritt aufbewahrt. Parallel wurden auch die adhärennten Zellen lysiert. Dazu wurde zuerst 1 ml 2fach- und dann noch 1 ml 1fach-Puffer pro Flasche dazu gegeben. Dann wurden die Flaschen 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden zusätzliche 2 ml 1fach-Lysepuffer zugegeben, die Zellsuspension vom Boden der Flasche abgeschabt und mit den vorbereiteten nicht-adhärennten Zellen vereinigt. Diese Zelllösung wurde auf Eis zwei Stunden lang mit einem Magnetrührer gerührt, danach bei 4000 rpm 20 Minuten abzentrifugiert und in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen zu je 1 ml abgefüllt und nochmal 1,5 h bei 14000 rpm abzentrifugiert. Hier ist anzumerken, dass alle Zentrifugationsschritte bei 4°C durchgeführt wurden und die Gesamtdauer der Zentrifugation bei circa zwei Stunden lag um alle festen Partikel zu separieren.

Das Lysat wurde zuletzt durch einen 0,2 µm-Filter (Millipore) filtriert um alle infektiösen Partikel zu entfernen und bei -80°C tiefgefroren. Bevor das Lysat zurück nach Tübingen verschickt wurde, wurde ein Steriltest mit dem filtrierten Lysat über 3 Wochen durchgeführt. Dazu wurden filtrierte und unfiltrierte Lysate auf einer 7H11-Platte mit einer Impfschlinge ausgestrichen. Sobald keine Bakterien angewachsen waren, hatte das Filtrat die Sterilkontrolle bestanden und es wurde nach Tübingen verschickt.

### **2.5.6 Herstellung der Affinitätssäule**

Die MHC-Komplexe wurden mit Hilfe einer Affinitätssäule isoliert, die mit einer Antikörpergekoppelten CNBr-aktivierten Sepharose befüllt wurde (Kohn & Wilchek 1981). Dafür wurden 400 mg Sepharose abgewogen, in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und anschließend mit 1 mM Salzsäure aufgefüllt. Die Sepharose wurde durch leichtes Schütteln suspendiert und im Anschluss daran für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf ein Drehrad gespannt, um gewaschen und reaktiviert zu werden. Danach wurde das Röhrchen bei 300 rpm ohne Bremse für 4 Minuten zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstands wurde die Sepharose mit 10 mg des gewünschten Antikörpers (W6/32 oder L243), gelöst in Kopplungspuffer, aufgefüllt. Die Kopplungsreaktion wurde circa 2 Stunden auf einem Drehrad bei RT durchgeführt, bis eine Effizienz von mindestens 90% erreicht war. Zur Bestimmung der Kopplungseffizienz wurde die Absorption des Überstands vor und nach Inkubation mit dem Antikörper bei 280 nm gemessen. Eine Kopplungseffizienz von 90% war dann gegeben, wenn weniger als 10% Gesamtprotein noch in Lösung war. Nach

einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand erneut entfernt und noch eventuell vorhandene reaktive Stellen auf der Sepharose wurden mit 0,2 M Glycin in einstündiger Inkubation abgeblockt. Anschließend wurde die Sepharose zwei Mal mit PBS gewaschen, in 0,02% NaN<sub>3</sub>/PBS aufgenommen und auf zehn Aliquots zu je 40 mg verteilt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C (Trautwein 2011; Kowalewski & Stevanović 2013).

### **2.5.7 Isolation von MHC/Peptid Komplexen mit Affinitätssäule**

Die Isolation von MHC-Komplexen und die Elution dieser wurden in einem Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

Die Säulen für die Affinitätschromatographie wurden folgendermaßen hergestellt: Eine *Micro Spin Column* wurde mit einem Deckel versehen, welcher einen „Luer Lock“ Anschluss besitzt, das untere Ende der Säule wurde in einen Dreiwegehahn gesteckt. Diese Verbindung wurde mit viel Parafilm fixiert und abgedichtet. Zwei Säulen (für W6/32 und L243 in dieser Reihenfolge) wurden anschließend mit Schläuchen verbunden und in Reihe hinter eine Pumpe angeschlossen. Bevor die Säulen mit Sepharose befüllt wurden, musste die ganze Apparatur für einige Minuten mit PBS gewaschen und gleichzeitig auf Dichtigkeit geprüft werden. Daraufhin wurden die Säulen mit 40 mg Antikörper-gekoppelter Sepharose gefüllt und für weitere 30 Minuten gewaschen um das für die Lagerung der Sepharose zugegebene Azid zu entfernen. In die dichten Säulen wurde das frisch hergestellte und filtrierte Zellysate auf 3-5 ml mit Lysepuffer aufgefüllt und über Nacht zyklisch mit 1-2 ml/min über die Säule/n laufen gelassen. In dieser Zeit sollten die im Lysat befindlichen MHC-Komplexe samt Peptiden durch die Antikörper in der Säule gebunden werden (Trautwein 2011; Kowalewski & Stevanović 2013).

### **2.5.8 Elution von MHC-Komplexen**

Die Säulen mit über Nacht gebundenen MHC-Molekül-Komplexen wurden am nächsten Tag zuerst 30 Minuten mit PBS, dann eine Stunde mit MilliQ-Wasser gespült. Danach ließ man die Säulen trocken laufen. An den Säulen wurden die Dreiwegehähne geschlossen und die Schläuche entfernt. Nachdem die Sepharose mit 60 µl 0,2% TFA und einmalig mit 1 µl 10% TFA bedeckt wurde, kamen die Säulen für 20 Minuten auf den Schüttler. Nach Ablauf der Zeit und anschließendem Öffnen des Hahns wurde das Eluat mit Hilfe einer Spritze in ein *Amicon*-Filtrationsröhrchen mit der Filtergröße 1000 Da gedrückt. Säurebehandlung und Elution (mit 0,2% TFA) wurden insgesamt acht Mal durchgeführt. Durch die

Behandlung mit Säure werden die nicht-kovalenten Bindungen zwischen Antikörpern, MHC-Molekülen und Peptiden gelöst. Die gesuchten löslichen MHC-Liganden wurden durch die Filtration im *Amicon* von Antikörpern und MHC-Komplexen abgetrennt.

Die *Amicons* wurden 30 Minuten lang bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der so erhaltene Durchfluss, welcher die Peptidliganden enthält, wurde bei -80°C eingefroren und anschließend über Nacht lyophilisiert. Das Retentat hingegen wurde für weitere Versuche bei -20°C aufbewahrt (Trautwein 2011; Kowalewski & Stevanović 2013).

### **2.5.9 Modifizierung von Peptiden mit Nicotinsäure (NIC) und deuterierter Nicotinsäure (dNIC)**

Zur Analyse von unterschiedlichen Proben (hier: infiziert vs. nicht-infiziert) in einem Probenlauf, wurde eine Methode der chemischen Modifizierung durchgeführt (Lemmel et al. 2004). Dazu wurden die Peptide unterschiedlicher Herkunft vor der eigentlichen Messung mit NIC (+105,00 Da) und mit dNIC (+109,00 Da) am N-Terminus markiert. Anhand der Peptid-Pärchen kann man unterscheiden, welche Peptide in beiden Proben bzw. Ansätzen und welche nur in einem Ansatz vorhanden sind. Dadurch sollten die Peptide fremder Herkunft (H37Rv oder *Vaccinia*), die nur als Einzel-Peaks vorkommen, leichter zu erkennen sein (Meyer et al. 2008a).

Die folgenden Schritte gelten nur für ein Eluat, falls mehrere vorhanden waren, wurden die einzelnen Schritte parallel mit mehreren Eluaten durchgeführt.

Vor der NIC- und dNIC-Modifizierung wurden Lysine bei pH 11 guanidiert. Das lyophilisierte Eluat wurde in 500 µl Reinstwasser aufgenommen und mit 92 µl einer 1,1 M O-Methyl-Isourea-Lösung gemischt. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung mit 10 M NaOH auf pH 10,5-11 eingestellt und bei 65°C 10 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch den Transfer auf Eis und Zugabe von 20 µl konzentrierter Ameisensäure gestoppt.

Zur Modifizierung wurde auf die 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen eine C<sub>18</sub>-Säule gesteckt. Sie diente zum Auffangen des Durchflusses. Zur Aktivierung der C<sub>18</sub>-Säulen wurden diese dreimal mit 200 µl 50% AcN/1% FA aufgefüllt und dann abzentrifugiert. Dann konnten die Säulen dreimal mit 200 µl 0,1% TFA äquilibriert werden. Während der einzelnen Schritte wurde die erwünschte Puffer-Lösung zugegeben und die Probe bei 2000 rpm zentrifugiert. Die Zentrifuge verblieb dabei im *hold*-Modus und die Zentrifugation wurde nach dem Erreichen der 15 sec manuell gestoppt und der Durchfluss verworfen. Zusätzlich wurde immer beachtet, dass die Säulen niemals trocken liefen.

Als nächstes wurde die guanidierte Probe auf die Säule geladen. Dazu wurden 3\*200 µl guanidierter Peptidprobe auf die Säule gegeben und abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die gebundenen Peptide wurden dreimal mit 200 µl ddH<sub>2</sub>O entsalzt und dann nicotinyliert. Dazu wurde eine 1 ml-Spritze an der Spitze abgeschnitten (bei ca. 0,05 ml), der Kolben ausgefahren, die Säule in die abgeschnittene Spritze gedrückt und zusammen in den Spritzenkörper eingepresst. NIC und dNIC wurden in der Konzentration 2,2 mg/ml in 50 mM Phosphatpuffer (pH 8,5) im Ultraschallbad gelöst. 500 µl NIC- bzw. dNIC-Lösung wurden auf die Apparatur (Spritze mit eingedrückter Säule) gegeben und durch die Säule gezogen. Dabei wurde der Kolben der Spritze alle 1 bis 1,5 Minuten mit 50 µl Abstand aufgezogen, Gesamtdauer 10-15 Minuten. Anschließend wurde die Säule mit den gebundenen Peptiden mit 200 µl ddH<sub>2</sub>O in der Zentrifuge gewaschen. Dann wurde eventuell gebundenens NIC von Tyrosin durch 500 µl Hydroxylamin mittels einer Spritze wie beim Nicotinylierungsvorgang 10-15 Minuten gelöst. Es wurde wieder mit 200 µl ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend eluiert. Zur Elution wurden viermal 50 µl 50% AcN/1% FA auf die Säule gegeben und in ein neues Eppendorf-Röhrchen zentrifugiert, die Eluate wurden am Ende gesammelt und lyophilisiert.

## **2.6 Massenspektrometrische Analysen und Interpretation von MS-Daten mit Hilfe von Mascot**

### **2.6.1 Vorbereiten der Proben für die LC-MS**

Zur Analyse der Probe wurde das Lyophilisat in Lösungsmittel A (A) gelöst, entsprechend der Anzahl der Messungen (5-6 µl pro Messung). Für die Messung mit der nanoHPLC wurde die so vorbereitete Probe für fünf Minuten bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, um eventuelle Verunreinigungen abzutrennen und eine Verstopfung der analytischen Säule zu verhindern. Dann wurden 5 µl der Probe in ein *Autosampler*-Röhrchen (*Vial*) überführt und anschließend im Probengeber platziert. Falls das Volumen höher als 5-6 µl war, wurde die Probe in der *Speed-Vac* bis zum angemessenen Volumen eingeeengt.

Im späteren Verlauf der Arbeit wurden die Eluate vor der MS-Messung mit ZipTip-Spitzen nochmals entsalzt, aufgereinigt und aufkonzentriert. Die ZipTip-Pipettenspitzen sind mit C<sub>18</sub>-Matrix gefüllt. Durch die nominale Bindekapazität der ZipTips wurde deren Fassungsvermögen von 2 µg Peptid definiert. Eine ZipTip-Aufreinigung bedeutete die Elution von beladenen ZipTips in einem 0,5 ml-Eppendorfgefäß durch 20-fach wiederholtes Auf- und Abpipettieren von 50 µl 50% Acetonitril/ 1% Ameisensäure. Die ZipTip-

Aufreinigung wurde zehn Mal wiederholt, so dass letztendlich 20 µg Peptid im ZipTip-Eluat vorlagen. Das ZipTip-Eluat wurde anschließend in einer Vakuumzentrifuge auf ca. 3-5 µl eingengt, die Probe in 25 µl Lösungsmittel A durch heftiges Vortexen resuspendiert und 5 Minuten bei 13 000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die vorbereitete Probe wurde schließlich im LC/MS analysiert (Kowalewski & Stevanović 2013).

## 2.6.2 Nanoflow LC-MS/MS

Die massenspektrometrische Analyse von eluierten MHC-Peptiden wurde an der LTQ Orbitrap XL Hybrid durchgeführt, welche mit einer Nanoelektrosprayquelle versehen ist. Die Orbitrap war im ersten Teil dieser Doktorarbeit an eine Nano-HPLC NanoLC 2D und anschließend an eine UltiMate 3000 RSLCnano UHPLC gekoppelt. Es wurde mit folgenden Einstellungen gemessen.

### **Einstellungen für die Messung mit NanoLC:**

Zu Beginn einer Messung wurden 5 µl der Probe aus dem Probenröhrchen in die 10 µl-Probenschleife injiziert und von dort aus für 30 Minuten mit einer Flussrate von 20 µl/min und mit 100%igem Lösungsmittel A auf die Vorsäule (C<sub>18</sub>, 5 µm, 300 µm i.d. x 5 mm, Dionex) geladen. Die Probe wurde dabei direkt an einer ESI-Quelle ionisiert. Die Peptide selber wurden auf einer Trennsäule (C<sub>18</sub>, 3 µm, 75 µm i.d. x 25 cm, Dionex) separiert. Dazu wurde ein Gradient von 0 bis 55% Lösungsmittel B 120 Minuten lang bei einer Flussrate von 300 nl/min gefahren. Die eluierten Peptide konnten mit Hilfe einer „Top 5“ CID-Methode analysiert werden, was bedeutet, die fünf intensivsten Ionen in dem Übersichtsscan nacheinander in der LTQ (*Linear Trap Quadrupol*) fragmentiert und gemessen wurden. Eine Masse, die bereits fragmentiert wurde, konnte automatisch in den nächsten 90 s nicht mehr zum Fragmentieren ausgewählt werden. Auf diese Weise können sehr viele unterschiedliche Peptide fragmentiert, gemessen und dadurch identifiziert werden.

### **Einstellungen für die Messung Ultimate 3000:**

Auch hier wurden die Proben zuerst zur Aufkonzentrierung auf eine Vorsäule (C<sub>18</sub>, 5 µm, 100 µm i.d. x 2 cm, Dionex) mit 100% Lösungsmittel A bei einer Flussrate von 4 µl/min geladen. Die Peptid-Auftrennung erfolgte auf der Trennsäule (C<sub>18</sub>, 2 µm, 75 µm i.d. x 50 cm, Dionex) mit Hilfe eines Gradienten, der von 3 bis 40 % Lösungsmittel B\* mit einer Flussrate von 300 nl/min innerhalb 140 Minuten lief. Die Peptide wurden eluiert und massenspektrometrisch mit der „Top 5“-Methode analysiert.

Die Spektren der MHC Klasse I-Peptide wurden jedes Mal in einem Massenbereich von 400-800 m/z aufgenommen. Handelte es sich bei der Probe um MHC II-Liganden wurde der

vermessene Massenbereich von 400 bis 1500 m/z ausgedehnt (Kowalewski & Stevanović 2013).

### **2.6.3 Prozessieren der MS-Daten und interpretieren der MS-Daten**

Mit Hilfe der Software „Proteome Discoverer 1.1 bzw. 1.3“ wurden die vom Massenspektrometer ausgegebenen Rohdaten-Dateien (RAW-Files) prozessiert. Vereinfacht bedeutet das, die aufgenommenen Fragmentspektren werden mit einer Datenbank verglichen. In dieser Arbeit wurden Swissprot für humane Proteine (Taxonnummer 9606), H37Rv (1773) von UniProt Trembl für mykobakterielle Proteine und Vaccinia (10245) von Uniprot Trembl für Proteine aus Vaccinia verwendet. Die Toleranz für die Massengenauigkeit von 10 ppm wurde nicht überschritten. Zusätzlich wurden alle Peptid-Vorschläge verworfen, die 0,6 Da leichter bzw. schwerer waren als das eigentliche Ion. Die anschließenden Filter sortierten alle weiteren Vorschläge aus, welche folgende Kriterien nicht erfüllten: 5 ppm Vorläufer-Massen Toleranz, die ersten drei vorgeschlagenen Peptide einer Masse und Peptide bis zu einem Ionenscore (IS) von 20 wurden überprüft. Ein niedriger IonScore basiert auf einer hohen Irrtumswahrscheinlichkeit und/oder einer geringen Zahl an Übereinstimmungen zwischen dem experimentellen und dem hypothetischen Fragmentspektrum (Kowalewski 2011). Der Filter für MHC Klasse I-Peptide wählte alle Peptide mit folgenden Kriterien aus: Peptide mit einer Ladung von 2 und einer Länge von acht bis 12 Aminosäuren. Die restlichen Peptide wurden vor weiteren Auswertungen ausgeschlossen. Die übrig gebliebenen Peptide wurden anschließend manuell auf ein HLA-Motiv überprüft. Die Peptide ohne ein ersichtliches Motiv wurden verworfen und die übrigen Peptide wurden einer manuellen Überprüfung der zugehörigen Fragmentspektren unterzogen (Verifizierung).

Die Auswertung von MHC Klasse II-Liganden lief mit folgenden Filtern: Ladung 2 bis 4 und die Peptidlänge von 12 bis 20 Aminosäuren. Die restlichen Parameter wie Rang und Ion Score waren die gleiche wie bei Auswertung mit MHC Klasse I-Liganden.

Um die von Mascot vorgeschlagenen Peptidsequenzen zu verifizieren, wurden diese einzeln begutachtet. Ein Spektrum wurde anhand der Motive und Sequenzvorschläge aller Datenbanken verglichen. Ein Peptidvorschlag wurde als richtig eingestuft, wenn folgende Kriterien erfüllt wurden: mindestens eine durchgängige y- oder b-Ionen-Reihe, keine unerklärten Peaks mit hoher Intensität oder hoher Masse und eine plausible Intensitätsverteilung der Peaks. Die Ionen brechen bevorzugt vor bzw. nach bestimmten Aminosäuren. So entstehen gewöhnlich nach Prolin (P), Aspartat (D) und Glutamat (E)

Fragment-Ionen. Bei unannotierten Peaks wurde versucht diese durch interne Fragmente, ubiquitäre Verunreinigungen (wie z.B. PEG oder PPG) oder als Verschleppung bzw. Überlagerung zu erklären. Mit dem Programm „ProteinProspector“ und der Option „MS-Product“ (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>) ist die *in silico*-Fragmentierung beliebiger Peptidsequenzen möglich, wobei auch interne Fragmente generiert werden. War dies möglich, galt der Peak als annotiert (Kowalewski & Stevanović 2013; Kowalewski 2011).

## **2.7 Zell-Analytische Methoden**

### **2.7.1 Vorbereitung der Platten und Zellen für einen IFN- $\gamma$ ELISPOT**

Die ELISPOT-Platten wurden unter sterilen Bedingungen vorbereitet. Der anti-IFN- $\gamma$  Erstantikörper 1-D1K wurde in PBS auf 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verdünnt und mit 100  $\mu\text{l}$  pro Well ausplattiert. Die Beschichtung erfolgte entweder für 1 oder 2 Nächte bei 4°C oder für 2 Stunden bei 37°C. Vor dem Ausplattieren der Zellen wurden die Platten zweimal mit 200  $\mu\text{l}/\text{Well}$  PBS gewaschen. Anschließend wurden die beschichteten Membranen mit 50  $\mu\text{l}$  Kultiviermedium pro Well für eine Stunde im Brutschrank geblockt.

Am Tag 12 wurden die Zellen geerntet, gezählt und 0,3–0,5 $\cdot 10^6$  Zellen in 100  $\mu\text{l}$  Kultiviermedium in ein Well gegeben. Die Wells der ELISPOT-Platte wurden vorher mit 50  $\mu\text{l}$  Kultiviermedium blockiert, somit betrug das Volumen 150  $\mu\text{l}$ . Die zu testenden Peptide und die PHA-Kontrolle wurden einzeln in Kultiviermedium verdünnt und zum Ende auf die ELISPOT-Platten pipettiert (50  $\mu\text{l}/\text{Well}$ ), das Endvolumen pro Well war somit 200  $\mu\text{l}$ . Pro Peptid und Spender wurden Duplikate angesetzt, für jeden Spender wurden zusätzlich eine Medium- und eine PHA-Kontrolle eingesetzt. Die Endkonzentration pro Peptid und für PHA betrug 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Die beladenen ELISPOT-Platten wurden für 24 – 26 Stunden im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag wie in 2.7.2 beschrieben entwickelt.

### **2.7.2 Entwickeln des ELISPOTS**

Es ist anzumerken, dass das Entwickeln der ELISPOT-Platten unter nicht sterilen Bedingungen durchgeführt wurde. Ein Waschvorgang bedeutet im nachfolgenden immer die Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Wasch-Puffer oder Wasser pro Well, Entfernen der Waschsubstanz sowie

kurzes Ausklopfen auf Zellstoffpapier. Weiterhin wurde während der Entwicklung der ELISPOT-Platten immer darauf geachtet, dass die Membranen nicht eintrocknen.

Nach der 24 - 26 stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen durch Ausklopfen der ELISPOT-Platte verworfen. Sogleich wurde die Platte zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, um verbleibende Zellen zu lysieren. Im Anschluss wurden die Platten viermal mit Tween-haltigem Waschpuffer (PBS/Tween) nochmal gewaschen. Der Sekundärantikörper (7-B6-1 Biotin, 1 mg/ml) wurde in PBS/BSA auf eine Konzentration von 0,3 µg/ml verdünnt und 100 µl pro Well zugegeben. Die Platten wurden für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Platten viermal mit PBS/Tween gewaschen um den restlichen Antikörper zu entfernen. ExtrAvidin Alkalische Phosphatase wurde 1:1000 in PBS/BSA verdünnt. Pro Well wurden 100 µl der Enzymlösung zugegeben und die Platten für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächster Schritt wurden die Platten dreimal mit PBS/Tween sowie dreimal mit PBS gewaschen, gut ausgeklopft und pro Well 100 µl der Färbelösung (eine Tablette BCIP/NBT in 10 ml destilliertem Wasser) zugegeben. Die Platten wurden unter Lichtausschluss entwickelt. Nach 7-8 Minuten (bzw. Sichtkontrolle) wurden die Platten gründlich mit vollentionisiertem Wasser ab gespült, der Plastikschutz der Platten entfernt und die Platten zum Trocknen über Nacht auf Zellstoff dunkel aufbewahrt. Am folgenden Tag wurden die Wells der Platten mit einem ELISPOT-Reader aufgenommen (ELISPOTReader CTL mit Software Immuno Capture 6.1) und die Spots mittels einem Ausleseprogramm (ImmunoSpot 4.0 Academic) gezählt.

### **2.7.3 Extra- und intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS)**

Mit Peptid amplifizierte Zellen wurden resuspendiert, gezählt und in 96-Well-Platten in 100 µl Kultiviermedium ausplattiert. Pro zu testendem Peptid wurden Duplikate mit jeweils  $0,5 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^6$  Zellen ausplattiert. Pro Spender wurden zwei Wells für Kontrollen (Medium und PMA/Ionomycin) mit jeweils  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen belegt. Die Peptide (1 µg/ml) und die PMA/Ionomycin-Kontrolle (PMA 10 µg/ml und Ionomycin 1 µM) wurden jeweils in 50 µl pro Test gelöst. Da das Endvolumen von 200 µl pro Well betrug, wurde die vierfache Konzentration der einzelnen Komponenten eingesetzt. Zur Akkumulation der zellulären Proteine wurde Brefeldin A in 50 µl Volumen in der Konzentration 10 µg/ml gelöst und alle Komponenten (100 µl Zell-Suspension + 50 µl Peptid + 50 µl Brefeldin A) nacheinander in die Wells gegeben. Zu der Mediumkontrolle wurde nur Brefeldin A pipettiert. Im Anschluss wurden die Zellen für mindestens sechs bis höchstens 16 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Peptid-Re-Stimulation erfolgte die eigentliche Färbung der Zellen.

Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C, für zwei Minuten und 1800 rpm. Die Inkubationszeit der einzelnen Färbeschritte betrug 20 Minuten auf Eis bzw. bei 4°C und im Dunkeln, soweit nicht anders beschrieben. Ein Waschvorgang bedeutet immer ein Zugabe der Waschlösung, ein Abzentrifugieren der Zellen, Ausschütten der Flüssigkeit, sehr kurzes und vorsichtiges Vortexen der Platten sowie Auffüllen der Wells mit Puffer oder Antikörper- bzw. Färbelösung.

Zur Analyse der Marker wurden die Zellen zweimal mit 200 µl PBSE pro Well gewaschen. Zuerst erfolgte eine Lebend-Tot-Färbung (LIFE/DEAD Aqua). Das Reagenz wurde in der Endkonzentration 1:400 in PBSE verdünnt und jeweils 50 µl in die Wells gegeben. Die Zellen wurden gut resuspendiert und für 20 Minuten inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Antikörper gegen extrazelluläre Oberflächenmarker wie CD4 oder CD8 in PFEA (Tabelle 2.3) verdünnt. Nach Ablauf der 20 Minuten mit LIFE/DEAD Aqua wurden die Wells mit PBSE auf ein Volumen von 200 µl pro Well aufgefüllt, die Platte abzentrifugiert und noch einmal mit 200 µl/Well PFEA gewaschen. Darauf wurden die Zellen mit CD4- und CD8-Antikörpern gefärbt und nach abgeschlossener Einwirkzeit zweimal mit PFEA gewaschen. Nach der Färbung von extrazellulären Markern wurden 100 µl/Well der Permeabilisierungslösung Cytotfix/Cytoperm auf die Zellen gegeben und für weitere 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Antikörper gegen intrazelluläre Zytokine wurden wie in Tabelle 2.3 beschrieben in *Permwash* verdünnt. Nach Ablauf der Permeabilisierung wurden die Wells mit 100 µl *Permwash* aufgefüllt und zweimal mit 200 µl *Permwash* pro Well gewaschen. Nach dem letztem Waschschrift wurden 50 µl/Well der Antikörperlösung gegen intrazelluläre Antigene auf die zu färbenden Zellen pipettiert und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Wells mit *Permwash* auf 200 µl aufgefüllt und weitere dreimal mit 200 µl *Permwash* pro Well gewaschen. Sollten die Zellen sofort durchflusszytometrisch analysiert werden, wurden sie in 200 µl PFEA pro Well aufgenommen und gut resuspendiert. Für die Analyse zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Zellen mit 200 µl FACS-Fix (PFEA + 1% Formaldehyd) pro Well fixiert. Die Messung erfolgte am FACS-Canto II von Becton Dickinson.

#### **2.7.4 IFN $\gamma$ -ELISA**

Zur Ermittlung des PPD (*purified protein derivate*)-Status von T-Zell-Spendern wurde ein ELISA durchgeführt. Dazu wurden die frisch isolierten PBMCs in 300 µl T-Zell-Medium (TZM) gelöst und in 24 Well-Platten ausplattiert. Pro Test wurden  $3 \cdot 10^6$  Zellen verwendet. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit Medium (Negativ-Kontrolle), 1 µg/ml PPD (Statens

Serum Institut) und 1 µg/ml PHA (Positiv-Kontrolle) inkubiert. Am nächsten Tag wurden 150 µl Überstand abgenommen und für den IFN $\gamma$ -ELISA verwendet.

Die *Nunc Maxisorb*-Platten wurden mit 100 µl/Well IFN $\gamma$  *Capture*-Antikörper, gelöst in PBS, über Nacht bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag wurde der Platteninhalt ausgeschüttet, sorgfältig abgeklopft und mit 100 µl/Well 10% BSA-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach dem Blockieren wurde die Platte wieder entleert und dreimal mit 0,05% Tween-Lösung gewaschen, was bedeutete: Die Platte wurde über Kopf ausgeschüttet und sogleich in eine Wanne mit 0,05% Tween-Lösung eingetaucht, nochmals über Kopf ausgeschüttet und auf Zellstoff ausgeklopft. Danach wurden die Proben und der IFN $\gamma$ -Standard in einem Volumen von 50 µl/Well in die Platte pipettiert. Die Proben wurden unverdünnt und in Dubletten verwendet. 200 ng/ml des IFN $\gamma$ -Standards wurden im T-Zell-Medium zur Herstellung einer Verdünnungsreihe gelöst. Hierbei wurde der vorherige Wert um Faktor 1:3 bis zu achtzehnmal verdünnt (200 ng/ml; 66,6 ng/ml, 22,2 ng/ml, 7,41 ng/ml, 2,5 ng/ml, 0,82 ng/ml, 0,27 ng/ml, 0,091 ng/ml, 0,03 ng/ml, 0,01 ng/ml). Die Platte mit den Proben und dem Standard wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend wurde wieder ausgeschüttet und 4mal gewaschen. Als nächstes wurde der Biotin-gekoppelte anti-IFN $\gamma$  Antikörper auf die Platte gegeben (50 µl/Well), welcher vorher in 5% BSA gelöst wurde. Dieser wurde auch für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nachdem der Sekundär-Antikörper inkubierte, wurde die Platte sogleich geleert und fünfmal gewaschen. Anschließend kam Streptavidin-HRP in 2,5% BSA zum Einsatz. 50 µl wurden in jedes Well gegeben. Die Platte stand nochmal für eine Stunde bei 37°C und nach Inkubation wurde 6 mal gewaschen. Die Farbreaktion wurde mit Hilfe von TMB-Solution B und TMB-Substrat, welche im Verhältnis 1:1 gemischt wurden, ausgelöst. Die Farbreaktion wurde mit 1 M Phosphorsäure abgestoppt. Die Messung von sezerniertem IFN $\gamma$  erfolgte bei 450 nm im ELISA-Reader.

### **2.7.5 Anfärben von spezifischen T-Zellen mit HLA-Tetrameren**

Die zu analysierenden Zellen wurden in eine 96-Well-Platte ( $0,5 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^6$  PBMCs pro Well) ausplattiert und 2mal mit PBS-EDTA gewaschen. Ein Waschschrift bedeutet mit 150 µl/Well Waschpuffer auffüllen, bei 4°C zwei Minuten bei 1800 rpm abzentrifugieren und den Überstand vorsichtig abkippen. Danach folgte nochmal ein Waschschrift mit 200 µl Waschpuffer und Zentrifugation. Als erstes wurden die Zellen einer Lebend-Tot-Färbung unterzogen. LIFE/DEAD Aqua-Reagenz wurde in PBS 1:400 verdünnt, 50 µl/Well auf die Zellen gegeben und 20 Minuten auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit *Tetramer Staining Puffer* (TSB) gewaschen und mit

dem HLA-Tetramer gefärbt. Dazu wurden 0,375 µl Tetramerlösung in 60 µl pro Well TSB angesetzt, mit Vortexer gemischt und fünf Minuten bei 13000 rpm (Minifuge) und 4°C zentrifugiert. 50 µl/Well der Tetramerverdünnung wurden auf die gewaschenen Zellen geben und für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen mit Antikörpern gegen extrazelluläre Marker (Tab. 2.3) wie in 2.7.3 gefärbt. Nach dem Tetramer-Färbevorgang wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und in Antikörperlösung in 50 µl/Well resuspendiert. Die Zellen wurden nochmals 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert und zuletzt 2mal mit FACS-Puffer gewaschen. Für die anschließende FACS-Analyse wurden die T-Zellen in 150 µl FACS-Puffer oder in Fix-Solution resuspendiert.

### **2.7.6 VITAL-FR-Zytotoxizitätstest**

Die Entscheidung einen VITAL-Assay für zytotoxische Versuche zu nutzen lag an der geringen Zellzahl einzelner T-Zell-Populationen und vorheriger Monitoring-Versuche zur Identifizierung Tetramer-spezifischer, IFN $\gamma$ -sezernierender Klone. Ein weiterer Grund ist die begrenzte Teilungsrate der T-Zell-Klone. Zusätzlich können die Klone nach einiger Zeit ihre Spezifität verlieren, was eine Expansion in Zellkultur über einen längeren Zeitraum unmöglich macht. Es wurde für die Detektion zytotoxischer Aktivität eine modifizierte Variante des von Hermans beschriebenen VITAL-assays eingesetzt (Hermans et al. 2004). Der VITAL-FR-Assay sollte in der Lage sein, bis zu drei zytotoxische T-Lymphozyten detektieren zu können, wenngleich diese Sensitivität von den Beschreibern bisher erst für stark immunogene virale Epitope gezeigt werden konnte (Stanke et al. 2010; Dingler 2011).

Für die fluoreszente Zellmarkierung wurden je  $10^6$  Zellen dreimal mit PBS gewaschen, in 500 µl PBS resuspendiert, mit der gewünschten bzw. auszutestenden Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs (CFSE und FarRed) versetzt und sofort mit Vortexer gemischt. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml FCS und erneuter Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur gestoppt. Anschließend wurden die Zellen vor weiterer Verwendung zweimal mit Medium gewaschen (Dingler 2011).

Wenige Tage vor Beginn des Tests wurden alle Tetramer-positiven Zellen gezählt, um die Anzahl spezifischer Effektoren zu bestimmen. Als Target-Zellen wurden  $2-5 \cdot 10^6$  THP-1 mit BCG in einer MOI5 vor der Färbung infiziert. Dafür wurden sie in IMDM gewaschen und in IMDM plus 10% FCS mit BCG (MOI5) gemischt und für drei Tage zur Infektion inkubiert. Weitere THP-1-Zellen wurden zweimal mit IMDM gewaschen, gezählt und in zwei 15-ml Röhren mit  $2 \cdot 10^6$  Zellen in je 1 ml IMDM + 5% FCS versetzt. Eines der Röhren wurde

über Nacht bzw. mindestens für vier Stunden vor der eigentlichen Färbung mit 10 µg/ml Peptid beladen (37°C, 7,5% CO<sub>2</sub>). Am folgenden Tag wurden die infizierten und Peptid-beladenen THP-1-Zellen wie oben beschrieben mit FarRed und CFSE gefärbt, wobei die nicht beladenen Zellen (Kontrolle) mit FarRed (2,5 µM) und mit Zielpeptid beladene oder infizierte Zellen mit CFSE (3 µM) gefärbt wurden. Anschließend wurden die gefärbten Zellen gezählt, in T-Zell-Medium resuspendiert und so vereinigt, dass sich für jede Farbe eine Gesamt-Zelldichte von 4200 Zielzellen (*targets*, hier THP-1) auf 100 µl ergab. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl pro Well in einer 96-Well-Platte mit rundem Boden vorgelegt. Die Effektorzellen wurden gezählt und eine Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor von 3 hergestellt. Dabei wurde wie folgt verfahren: In die erste Spalte einer 96-Well-Platte wurde eine Suspension von Effektorzellen (optimal mit der Zellkonzentration 527000/ml) als Duplikate pipettiert. Nun wurden jeweils 30 µl Zellsuspension mehrmals resuspendiert und in die benachbarte Reihe überführt, bis nur noch eine Reihe ohne Zellen verblieb. Von der resultierenden Platte wurden jeweils 60 µl zu den Zielzellen gegeben. Damit ergaben sich Effektor-zu-Zielzell-Verhältnisse von ungefähr 30:1, 10:1, 3.3:1, 1,1:1, 1:3.3, 1:10, 1:30, 0:1. Schließlich wurde je Well IL-2 in der Endkonzentration von 10 U/ml in 20 µl T-Zell-Medium zugegeben, und im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen direkt durchflusszytometrisch analysiert und für jedes Well der Quotient aus den Anzahlen detektierter CFSE-positiver Zellen *target n* und Far-Red-positiver Zellen *control n* gebildet.

$$lysis_{E:T} = 100 \% - \frac{\left(\frac{n_{target}}{n_{control}}\right)_{E:T}}{\left(\frac{n_{target}}{n_{control}}\right)_{0:1}}$$

Dieser wurde wiederum durch den Mittelwert des Quotienten in Abwesenheit von Effektor-Zellen dividiert, um die spezifische Überlebensrate und daraus die spezifische Lyse als Differenz zu 100% zu bestimmen (Dingler 2011).

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Infektion der B-LCL mit MVA

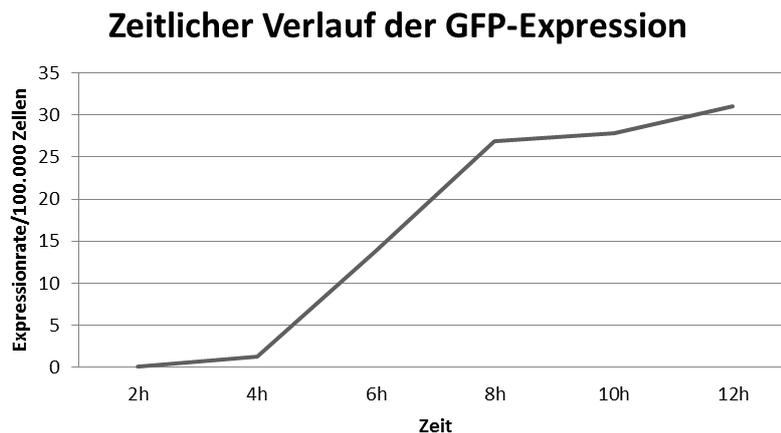
Mit dem Vorhaben natürlich prozessierte MHC-Liganden mykobakteriellen Ursprungs zu isolieren, wurden hierfür zuerst die immortalisierte EBV-LCL (JY) mit zwei transgenen Viren aus Oxford infiziert (Abbildung 1.8). Diese Viren sind lebende Vektoren und kodieren entweder ein (MVA-Ag85A bzw. MVA85A) oder vier mykobakterielle Proteine (MVA-TBF), die eine T-Zell-Antwort auslösen (Wiker & Harboe 1992; Denis et al. 1997; Malin et al. 2000; Smith et al. 2000; Lewinsohn et al. 2007; Hervas-Stubbs et al. 2006; Kassa et al. 2012; Wilkinson et al. 2005). Bei MVA85A handelt es sich um ein neu entwickeltes *Subunit*-Vakzin, welches zur Verstärkung der Immunität gegenüber Mtb nach der BCG-Impfung verabreicht werden soll. MVA-85A befindet sich zurzeit noch in der klinischen Erprobung (McShane et al. 2004; Hawkrigde et al. 2008). Der Ansatz zur Identifikation von natürlich prozessierten Liganden mit Hilfe von B-LCL und transgenen MVA ist von Vorteil, da große Mengen an Zellen infiziert werden können und somit mehr mykobakterielle Peptide von mehr Zellen präsentiert werden. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit mykobakterielle Liganden zu isolieren. Der Nachteil ist, dass der MVA-Vektor nur ein bzw. vier mykobakterielle Proteine kodiert und nur eine Zelllinie für diese Versuchsreihe verwendet wurde. Folglich können nur Liganden von wenigen Antigenen mit dem HLA-Motiv dieser Zelllinie eluiert werden.

#### 3.1.1 Etablierung der Infektion mit MVA-GFP

Vor dem eigentlichen Versuch wurde die optimale Infektionsstrategie ermittelt. Die Parameter die verändert und ausgetestet wurden, waren die MOI und die Dauer der gesamten Infektion. Hierzu wurde die B-LCL vorerst mit MVA-GFP infiziert. Das Infektionsprotokoll konnte an das Protokoll des Herstellers von MVA (Universität Oxford) angepasst werden. Kurz zusammengefasst sieht das Infektionsprotokoll wie folgt aus: die vorgewaschen Zellen und das Virus wurden in einem kleinen Volumen in PBS aufgenommen, 30 – 60 Minuten unter sanften Schütteln inkubiert und anschließend nach Gabe von Zellmedium für mindestens drei Stunden weiter inkubiert.

Zu Optimierung der Infektion mit MVA wurden 100000 JY-Zellen jeweils mit MOI2, MOI4 oder MOI8 infiziert und nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h und 12 h wurde die GFP-Expression am Zytometer (FACS Canto) ermittelt. Wie die Abbildung 3.1 zeigt, steigt die Expression des GFP in den ersten vier Stunden langsam und dann bis zur achten Stunde schneller an. Nach

acht Stunden verläuft die Expressionskurve von GFP wieder flacher. Diese Kinetik langsames Ansteigen der Expression in den ersten Stunden, dann schnelles und wieder langsames Ansteigen, lässt sich in ähnlicher Weise bei allen Infektionen mit verschiedenen MOI (MOI2, MOI4 und MOI8) verfolgen. Jedoch wurde die stärkste GFP-Fluoreszenz in den Zellen nach der Infektion mit MOI8 gemessen.

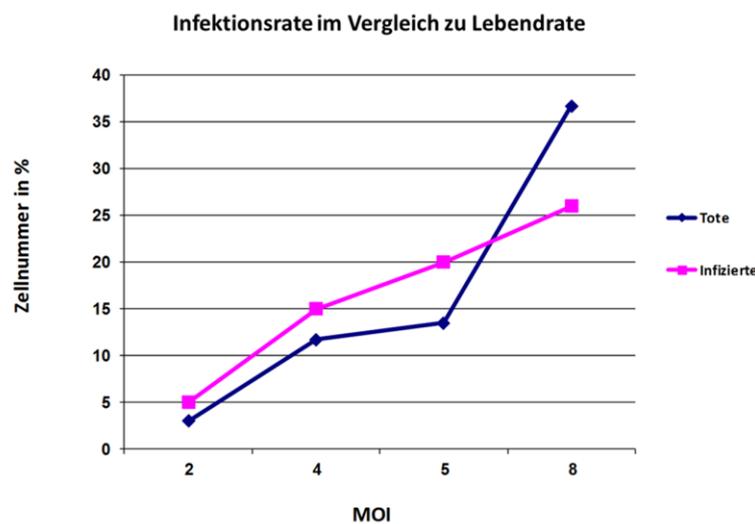


**Abbildung 3.1: Zeitlicher Verlauf der GFP-Expression nach der Infektion von B-LCL mit MVA GFP.**

Exemplarisch ist die GFP-Expression nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h und 12 h dargestellt. 100.000 B-LCL/Test wurden in 50 µl PBS mit MOI8 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Zellmedium resuspendiert und jede zweite Stunde wurde die GFP-Expression am FACS-Calibur gemessen. Die GFP-Expression steigt nach den ersten vier Stunden leicht und in den nächsten vier Stunden stärker an. In den letzten vier Stunden ist der Anstieg wieder ähnlich stark wie in den ersten vier Stunden.

Da ausschließlich lebende Zellen MHC-Peptide prozessieren, wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit dem Amin Aqua-Live-Dead durchgeführt. Grundsätzlich lässt sich zusammenfassen, dass die Infektion mit einer höheren MOI schädlicher für die Zellen ist (Abbildung 3.2). Zu sehen ist der Anstieg an GFP-positiven Zellen und die Anzahl an toten Zellen im Verhältnis zueinander nach frühestens 10 Stunden der Infektion. Die Anzahl an lebenden Zellen sinkt bzw. Anzahl an toten Zellen steigt nach der Infektion mit höherer Virusmenge. Daneben konnte beobachtet werden (keine Abbildung), dass die sinkenden Lebendzellzahlen auch von der Vitalität der Zellen vor ihrer Infektion abhingen. Fazit: eine ältere und dicht besiedelte Kultur hatte nach der Infektion mit MVA mehr tote Zellen als eine Kultur, die kürzlich aufgetaut und weniger dicht besiedelt war. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Zellen in der *log*-Phase sich schwerer infizieren ließen als die Zellen in der stationären Phase. Die Abhängigkeit der Lebendzellzahl von der MOI und dem

Zeitverlauf gleichzeitig zu messen wurde vernachlässigt. Denn laut vorherigen Versuchen steigt die GFP-Expressionsrate in den ersten 8-12 h bis zu einem Plateau, womit es hier nicht relevant wäre, die Lebendmessung in den ersten Stunden (1-8 h) im Verhältnis zu verschiedenen MOI durchzuführen. Für diese Arbeit ist die starke Expression von MVA-kodierten Proteinen und daraus resultierend deren MHC-Präsentation mehr vordergründig. Da die Expression von mykobakteriellen Antigenen, die der von GFP mit hoher Wahrscheinlichkeit ähnelt, sollte die Expressionsrate von mykobakteriellen Antigenen auch erst nach 10 h höher sein als in den vorherigen Stunden.



**Abbildung 3.2: Infektionsrate im Verhältnis zu infizierten und toten Zellen.**

Dargestellt ist die Infektionsrate nach verschiedenen Infektionen der B-LCL mit MOI2, MOI4, MOI5 und MOI8 nach frühestens 10 h. 100000 B-LCL pro Test wurden in 50 µl PBS mit unterschiedlicher MOI infiziert. Pink: infizierte bzw. GFP-exprimierende und lebende Zellen. Blau: tote Zellen.

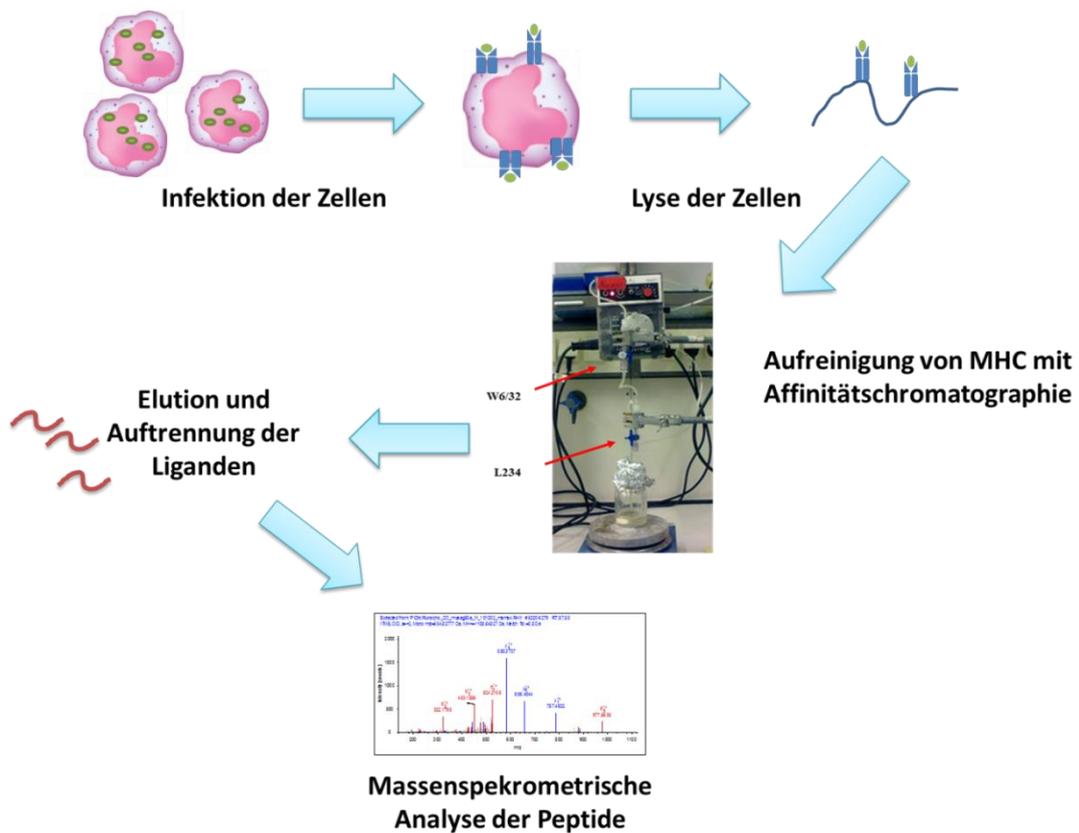
Trotz der Tatsache, dass es sich hier um einen Replikations-unfähigen Virus handelt, geht die Anzahl an lebenden Zellen zurück. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Infektion ein stressreiches Ereignis ist und bei diesem Prozess viele Zellen sterben. Weiterhin besteht die Frage, ob während der Infektion Stress-Signale durch die Zellen ins Medium abgegeben werden, die als zusätzliche Stressfaktoren auf die Zellen wirken. Zusätzlich verharren Zellen und Virus in der ersten Stunde in einem sehr kleinen Volumen PBS. Der daraus resultierender Nährstoffmangel bzw. Platzmangel wäre ein Grund für die schlechte Vitalität der Zellen. Der Platzmangel hat noch einen weiteren Nachteil, den Sauerstoffmangel. Da die Zellen in einem kleinen Volumen (1 ml auf  $10^8$  Zellen) gehalten werden, kann es dazu

kommen, dass die untersten Zellschichten in dem Behälter für die Infektion (meist 15 ml-Röhrchen) nicht genug mit Sauerstoff versorgt werden. Durch ein leichtes Schütteln der Zellen wurde versucht dies zu unterbinden.

Nach mehreren Infektionsversuchen mit verschiedenen MOI und Berücksichtigung der Expression von GFP in Abhängigkeit der Zeit wurde im Rahmen dieser Arbeit entschieden, mit MOI5 zu infizieren und die Zellen frühestens nach 12 Stunden zu ernten. Die Infektionsrate mit MOI5 betrug zwischen 10-25% (keine Abbildung) abhängig von verschiedenen Zellchargen. Die Entscheidung MOI5 als angemessen zu erachten, lag an der Infektionsrate und der akzeptablen Anzahl an toten Zellen nach einer Infektion. Zusätzlich bestand die Idee mindestens  $10^8$  Zellen zu infizieren und dies mindestens zweimal mit jeder erhaltener Virus-Charge.

### **3.1.2 Infektion der B-LCL mit MVA-Ag85A bzw. MVA-TBF**

Mit dem Ziel der Isolierung von natürlich prozessierten Peptiden wurde folgender Arbeitsablauf (Abbildung 3.3) verwendet. Am Anfang steht die Infektion von Zellen mit MVA-Virus oder im anderen Ansatz die Infektion mit H37Rv. Die infizierten Zellen werden lysiert und das Zelllysate soweit aufgetrennt, bis in der Lösung nur gelöste Proteine und Peptide vorliegen. Die gelösten vorliegenden MHC-Peptid-Komplexe werden mit an die Säulen gekoppelten pan-spezifischen MHC Klasse I- (W6.32) bzw. pan-spezifischen HLA-DR- (L234) Antikörpern isoliert und in saurem Milieu von der Säule eluiert. Die Auftrennung von MHC-Molekülen und deren Peptiden erfolgt über die Zentrifugation des Lysats durch einen Filter. Anschließend werden die eluierten Peptide in der LC-MS gemessen und deren Sequenz mit Hilfe von Datenbanken und dem manuellen Abgleich von Fragmentenspektren ermittelt.



**Abbildung 3.3: Arbeitsablauf zur Isolierung von mykobakteriellen HLA-Liganden.**

Dargestellt ist der Arbeitsablauf (*Workflow*), welcher im Rahmen dieser Arbeit zur Aufbereitung und Gewinnung von natürlich prozessierten Peptiden genutzt wurde.

Die B-LCL wurden zur Isolierung von mykobakteriellen MHC-Liganden mit MVA-Ag85A und MVA-TBF infiziert. MVA-Ag85A kodiert das mykobakterielle Protein Ag85 und MVA-TBF das Ag85A, das TB9.8, das 10.4 und Acr2 (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1: Kodierte mykobakterielle Antigene von verwendeten MVA-Vektoren.**

Namens-kürzel <sup>1</sup>	Protein <sup>1</sup>	Funktion <sup>1</sup>	Rv-Nummer <sup>1</sup>	Gen-Name <sup>1</sup>	Protein-länge <sup>1</sup>
<b>Ag85A (Antigen 85A)</b>	secreted antigen 85-a FbpA (Mykolylyl Transferase 85A)	Mykolylyltransferase Aktivität, notwendig für Biogenese von <i>Cord Factor</i> im Komplex, verantwortlich für die hohe Affinität an Fibronektin	Rv3804c (MT3911, MTV026.09c)	<i>fbpA</i>	338
<b>TB9.8</b>	ESAT-6 like protein EsxG	Unbekannt	Rv0287 (MTV035.15)	<i>esxG</i>	97
<b>TB10.4</b>	Low molecular weight protein antigen 7 EsxH	unbekannt, möglicher Virulenzfaktor	Rv0288 (MT0301, MTV035.16)	<i>esxH</i>	96
<b>Acr2 (hrpA, hsp20)</b>	heat-stress-induced ribosome-binding protein A	mögliche Chaperonaktivität bei Hitzestress	Rv0251c (MTV034.17c)	<i>hsp</i>	159

<sup>1</sup> Protein- und Genname, Funktion und Proteinlänge aus der TubercuList (<http://tuberculist.epfl.ch/index.html>) (Lew et al. 2011; Lew et al. 2013).

Bei Ag85A handelt es sich um ein Protein des Antigen 85A-Komplexes: bestehend aus Ag85A, Ag85B und Ag85C. Der Komplex ist in vielen mykobakteriellen Stämmen konserviert und für die hohe Affinität der Mykobakterien gegenüber Fibronektin verantwortlich. Ag85A selber ist eine Mykolylyl-Transferase 85A, auch Fibronektin-bindendes Protein A genannt und notwendig für die Biosynthese von Trehalose Dimycolate (*Cord Faktor*) (Belisle et al. 1997). In Mtb- und BCG-Zellkulturüberständen ist Ag85A ein stark exprimiertes Protein (Wiker & Harboe 1992). TB9.8, auch ESAT-6 like Protein, wurde identifiziert als ein Protein des Kulturüberstands von H37Rv (Rosenkrands et al. 2000; Mattow et al. 2003). Die Funktion von TB9.8 ist noch nicht beschrieben worden. TB10.4 ist ein Antigen, welches im *esx* Gencluster 3 kodiert wird. Es übt eine mögliche Virulenzfunktion aus (Kato-Maeda et al. 2001). In dem attenuierten Labor-Stamm H37Ra ist die Expression von TB10.4 herunter reguliert, wobei die Funktion von TB10.4 noch nicht zugeordnet wurde (Rindi et al. 1999). TB10.4 induziert in BGC-Geimpften wie auch in mit Mtb Infizierten eine IFN $\gamma$ -vermittelte Immunantwort (Skjøt et al. 2002). Das Protein Acr2 gehört zu den Hitzeschock-Proteinen der *acr*-Gruppe. Es wird von Mtb nach einem Stress-Impuls exprimiert wie z.B. nach dem Kontakt mit Reaktiven Sauerstoff-Spezies der Makrophagen. Dies resultiert aus der Phagozytose der Bakterien durch diesen Zelltyp (Schnappinger et al. 2003; Wilkinson et al. 2005).

Anfänglich wurden die B-LCL in zwei Hälften getrennt, wobei die eine Hälfte mit MVA-TBF (bzw. MVA-Ag85A) und die andere nicht infiziert wurden. Die Proben wurden danach wie üblich getrennt lysiert und mit Nikotinsäure (Nic) und deuterierter Nikotinsäure (dNic) chemisch markiert. Diese Strategie ermöglicht die massenspektrometrische Analyse von

zwei unterschiedlichen Proben in einer Messung, die vorher in gleichem Verhältnis gemischt werden (Meyer et al. 2008b). Die infizierte Probe wurde mit dNic und die unbehandelte Probe mit Nic markiert. Die Peptide, die als Pärchen in einem MS-Übersichtsspektrum mit einem Massenunterschied von 4 Da auftreten, sind hier Eigenpeptide und kommen in beiden Ansätzen vor (infiziert vs. nicht-infiziert). Die Einzelpeptide ohne einen zusätzlichen Doppelgänger sind in diesem Ansatz präsentierte mykobakterielle oder virale Peptide. Diese Methode wurde nur einmal ausgeführt, da die Annotation von Spektren in diesem Ansatz nur mit einem bzw. vier mykobakteriellen Proteinen notwendig war. Somit kamen nur wenige Peptide in Erwägung, was die Identifizierung von mykobakteriellen Peptiden vereinfachte und die Modifizierung unnötig machte.

### 3.1.3 Identifizierung von mykobakteriellen und viralen Liganden nach der Infektion mit MVA85A und MVA-TBF

Es wurde dreimal mit dem Virus MVA-TBF je  $10^8$  Zellen und fünfmal mit MVA-Ag85A je  $10^8$  oder  $5 \cdot 10^8$  Zellen mit je unterschiedlichen MVA-Ag85A Chargen infiziert. Die Peptid-MHC-Komplexe wurden mit Hilfe einer Antikörper-gekoppelten Säule aufgereinigt (Abbildung 3.3) und die Peptidsequenz mit MS identifiziert.

Mit dieser Methode konnten vier Mykobakterien-stammende Peptide isoliert werden (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2: Mykobakterielle Liganden isoliert nach der Infektion der B-LCL mit MVA TBF und MVA-Ag85A**

Sequenz	HLA Motiv	Accession Nummer <sup>a</sup>	Gen <sup>b</sup>	Epitop Lokalisation <sup>c</sup>	Protein	Andere Namen
<b>HVKPTGSAV</b>	A*02:01	Rv3804c (MT3911, MTV026.09c)	fbpA	157-165 (338)	Mykolyyl-Transferase 85A, Fibronektin-bindendes Protein A	Antigen 85A, Ag85A
<b>IYHPQQFVY</b>	C*07	Rv3804c (MT3911, MTV026.09c)	fbpA	180-188 (338)	Mykolyyl-Transferase 85A, Fibronektin-bindendes Protein A	Antigen 85A, Ag85A
<b>RVRGAVTGM</b>	A*02:01	Rv3804c (MT3911, MTV026.09c)	fbpA	6-14 (338)	Mykolyyl-Transferase 85A, Fibronektin-bindendes Protein A	Antigen 85A, Ag85A
<b>LLDAHIPQL</b>	A*02:01	Rv028 (MTV035.157)	esxG	3-11 (97)	Esat-6 like Protein ESXG (konserviertes hypothetisches Protein TB9.8)	TB9.8

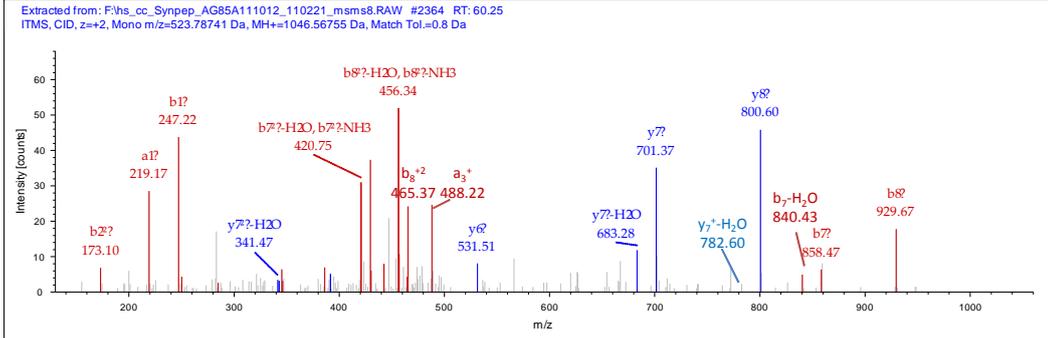
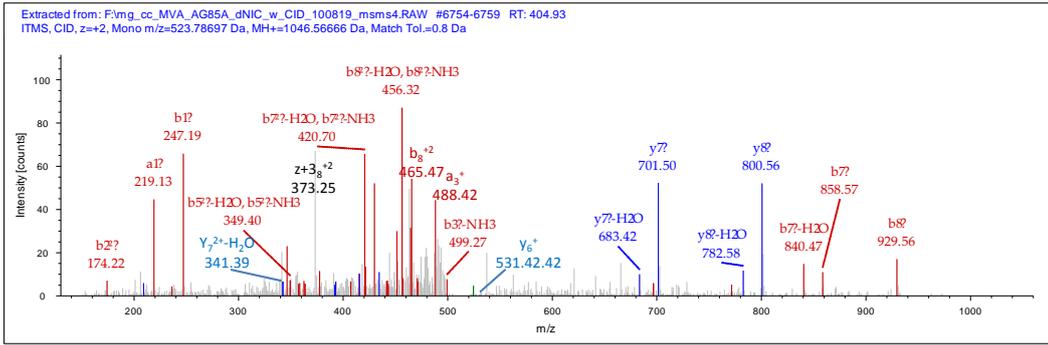
<sup>a</sup> Accession Nummer nach MYCTU (*Mycobacterium tuberculosis* [1773]), Stamm H37Rv (ATCC 25618), Sanger ID.

<sup>b</sup> Gen Name nach MYCTU [1773], Stamm H37Rv (ATCC 25618).

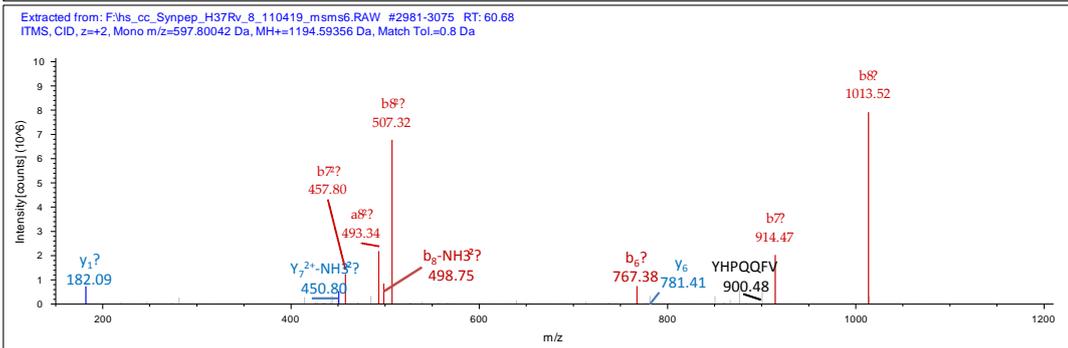
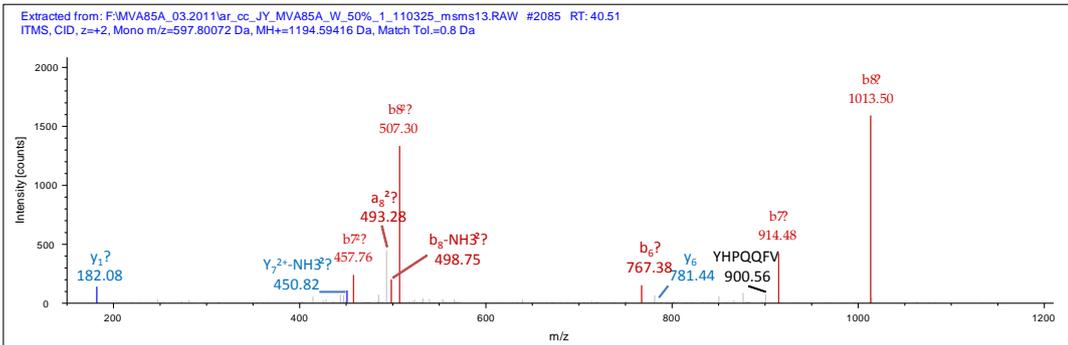
<sup>c</sup> Aminosäureposition in Protein nach MYCTU (ATCC 25618). In Klammern, die Länge des ganzen Proteins in Aminosäuren.

Drei der Peptide haben ein HLA-A\*02:01- und ein Peptid ein HLA-C\*07-Motiv. Es wurden drei Liganden aus Antigen 85A isoliert (HVKPTGSAV; IYHPQQFVY; RVRGAVTGM). Das vierte Peptid stammte aus dem Protein TB9.8 (LLDAHIPQL). Die MS-Spektren der mykobakteriellen Peptid-Kandidaten wurden mit dem synthetisch hergestelltem Gegenstück bestätigt (Abbildung 3.4).

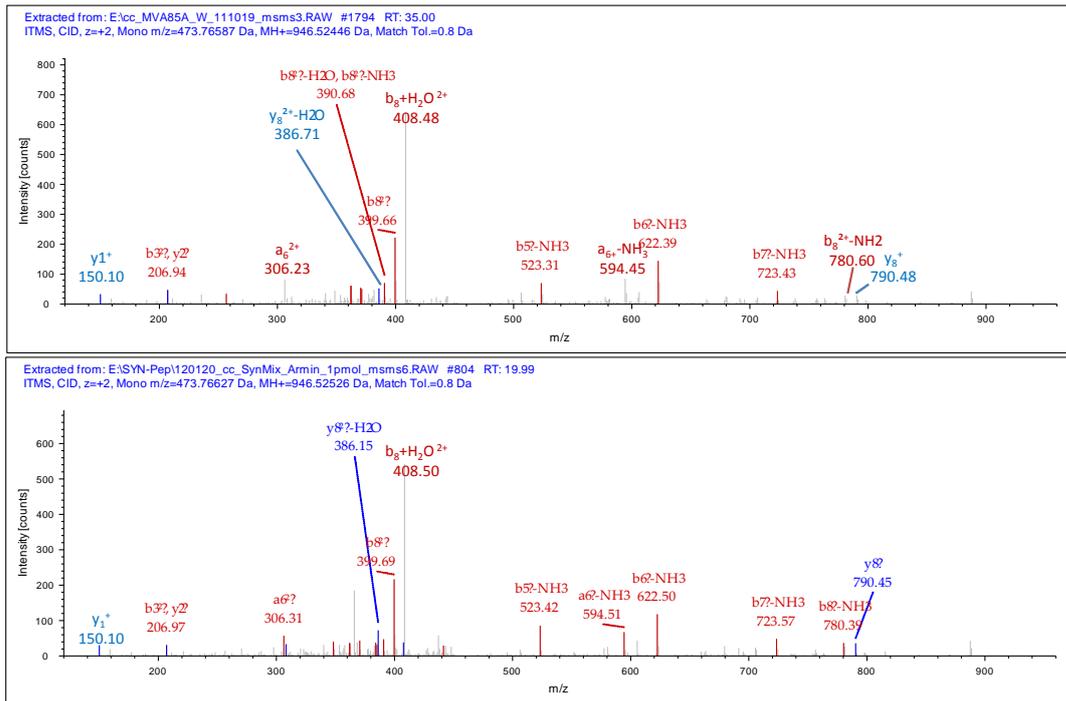
**A: Ag85A<sub>157-165</sub> HVKPTGSAV**



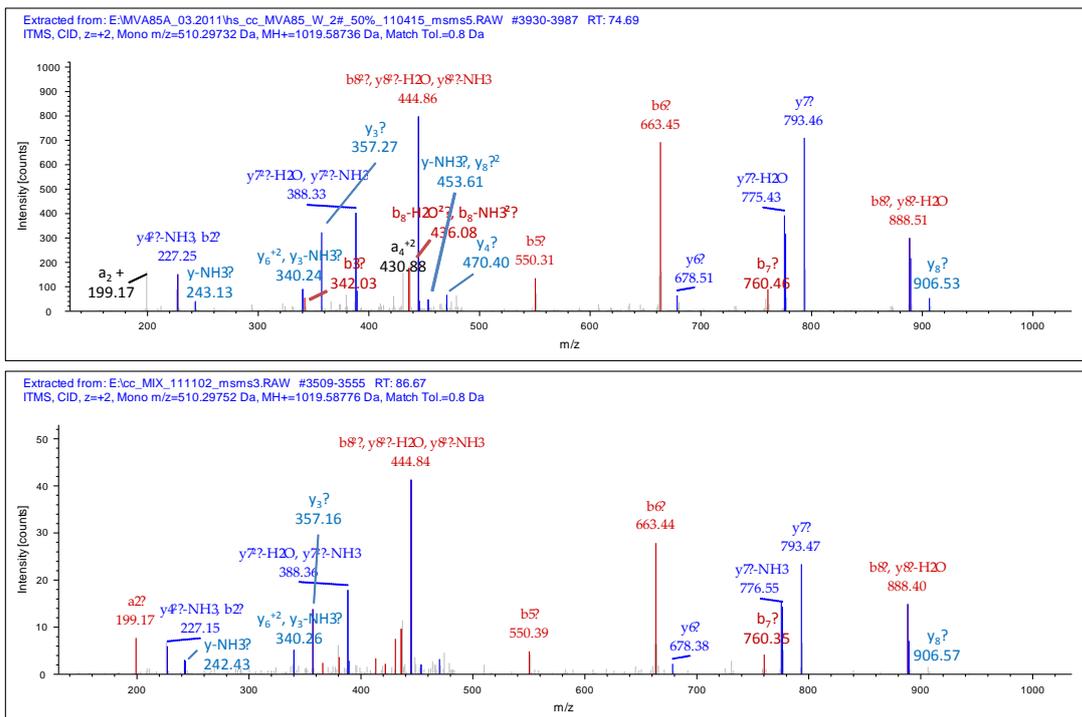
**B: Ag85A<sub>180-188</sub> IYHPQQFVY**



### C: Ag85A<sub>6-14</sub> RVRGAVTGM



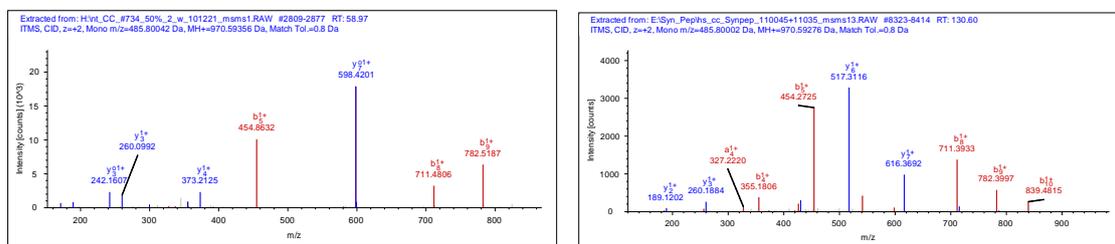
### D: TB9.8<sub>3-11</sub> LLDAHIPQL



**Abbildung 3.4: Fragmentspektren von identifizierten *M. tuberculosis* HLA-Liganden aus B-LCL infiziert mit MVA-Ag85A oder MVA-TBF.**

Vergleich von Fragmentspektren identifizierter Peptide, welche nach der Infektion der B-LCL mit MVA-TBF oder MVA-Ag85A isoliert wurden. Oberes Spektrum zeigt das natürlich isolierte Peptid. Unteres Spektrum: das Fragmentspektrum vom synthetischen Gegenstück. A: D<sub>4</sub>NIC-HVK<sub>Gua</sub>PTGSAV das Eluat der infizierten Probe wurde chemisch mit deuterierter Nikotinsäure (109 Da, D<sub>4</sub>NIC) und Guanin (Gua) wie in Lemmel et al. 2004 und Weinzierl et al. 2007 beschrieben, markiert.

Der Vergleich beider Spektren von natürlich isoliertem und synthetisch hergestelltem Peptid dient der Validierung der Annotation von isolierten Peptiden. In diesem Beispiel konnten drei mögliche Sequenzen, nämlich ein humanes, virales oder mykobakterielles Protein mittels des Programms Proteome Discoverer auf ein Fragmentspektrum annotiert werden. Ist ein Peptid nicht richtig annotiert, so hat das Fragment-Spektrum des synthetischen Gegenstücks eine andere Ionenverteilung als das Spektrum des isolierten Peptids. Die Abbildung 3.5 zeigt ein falsch-annotiertes Peptid, die Ionen und das Ionenmuster sind unterschiedlich. Der Vergleich mit dem Spektrum des synthetisch hergestellten Peptids bestätigt bzw. verneint letztendlich das annotierte Spektrum des natürlich prozessierten Peptids.



**Abbildung 3.5: Peptidspektren eines Peptid-Kandidaten mit negativer Validierung.**

Es sind zwei Spektren eines Kandidaten dargestellt: links Spektrum mit annotierter mykobakterieller Sequenz aus infizierter Probe. Rechts: Spektrum von synthetisch hergestelltem Peptid mit gleicher Sequenz wie links. Keine Übereinstimmung der Peaks ist zu sehen, somit ist das natürlich prozessierte Peptid nicht mykobakteriellen Ursprungs und wurde falsch vom Programm annotiert.

Das erste identifizierte Peptid war HVKPTGSAV (Abbildung 3.4, A) und gehört zu Protein Ag85A. Aus der gleichen Probe wurde zusätzlich LLDAHIPQL (Abbildung 3.4, D) aus TB9.8 identifiziert. Zuletzt wurden die zwei Peptide IYHPQQFVY (Abbildung 3.4, B) und RVRGAVTGM (Abbildung 3.4, C) aus Ag85A isoliert. Alle drei Peptide aus Ag85A konnten nach mehreren Infektionen mit unterschiedlichen Virenchargen und Zell-Chargen eluiert werden. Das HLA-C\*07-Peptid IYHPQQFVY wurde am häufigsten isoliert. Es konnte nach fast jeder Infektion identifiziert werden und die Fragmentspektren hatten eine hohe Intensität, was auf eine hohe Präsentation dieses Peptids deuten könnte. Der HLA-Ligand aus TB9.8 wurde ebenfalls mehrmals isoliert, jedoch nur nach der Infektion mit MVA-TBF. Die Spektren des Peptids LLDAHIPQL hatten auch eine hohe Intensität, was ebenso auf eine hohe Präsentationsrate erahnen lässt.

Der generelle Ansatz der Identifikation von Epitopen ist die reverse Immunologie. Man wählt ein immunogenes Protein seiner Wahl, lässt die Peptide eines erwünschten HLA-Moleküls *in silico* vorhersagen und testet anschließend die Kandidaten in einem immunologischen Test seiner Wahl. LLDAHIPQL ist ein bereits publiziertes Peptid (Lewinsohn et al. 2007). Es wurde mit Hilfe von einer überlappenden Peptid-Datenbank von vorher bekannten mykobakteriellen Antigenen identifiziert. Die IFN $\gamma$ -Antwort wurde im ELISPOT mit T-Zellen gesunder, latent Infizierter und Probanden mit aktiver Tuberkulose gemessen. In dieser Arbeit wurde LLDAHIPQL als ein natürlich prozessierter und wirklich präsentierter HLA-Ligand bestätigt. Keine weiteren Peptide des Proteins TB9.8 wurden eluiert. Die restlichen drei identifizierten Peptide stammen von dem Antigen 85A. Die beiden Peptide HVKPTGS AV und IYHPQQFVY sind bisher nicht publizierte HLA-Liganden und wurden erstmals in dieser Arbeit als natürlich präsentierte Liganden aus Ag85A identifiziert. Das Epitop RVRGAVTGM wurde vorher durch Computer-Vorhersage identifiziert (<http://www.iedb.org/epId/93801>) und konnte auch hier als ein natürlich präsentierter Ligand bestätigt werden.

Neben den vier mykobakteriellen Liganden konnten 16 Peptide viralen Ursprungs eluiert werden, 14 mit einem HLA-A\*02:01-Motiv und zwei mit einem HLA-B\*07:02-Motiv (Tabelle 3.3). Alle Peptide wurden schon vor dieser Arbeit durch die *in silico*-Vorhersage, Epitop-Mapping oder massenspektrometrische Analyse identifiziert (Tabelle 3.3).

**Tabelle 3.3: Tabelle der identifizierten Vaccinia Liganden nach Infektion der B-LCL mit MVA-TBF und MVA-Ag85A von Meyer et. al. 2008.**

Sequenz	Gen <sup>a</sup>	Eintrag	Epitop Lokalisation <sup>c</sup>	Protein Name <sup>a</sup>	Referenz
<b>HLA-A*02:01:</b>					
<b>KLIHNPFL</b>	B19R	-	207-215 (353)	soluble and cell surface interferon-alpha/beta receptor	(Meyer et al. 2008a)
<b>KLFSDISAI</b>	MVA052R	E5R	107-115 (331)	putative 39.1k protein	(Johnson et al. 2009; Meyer et al. 2008a)
<b>SLKDVLVSV</b>	MVA075R	G5.5R	27-35 (63)	RNA polymerase subunit rpo7	(Johnson et al. 2009; Meyer et al. 2008a)
<b>TLLDHIRTA</b>	MVA189R	B22R	178-186 (188)	putative 21.7k protein	(Johnson et al. 2009; Meyer et al. 2008a)
<b>ALDEKFLFI</b>	A23R <sup>d</sup>	-	273-281 (382)	Intermediate transcription factor 3 large subunit	(Johnson et al. 2009; Meyer et al. 2008a)
<b>KITSYKFESV</b>	putative B8R <sup>e</sup>	-	18-27 (272)	Interferon gamma receptor (IFNGR1)	(Meyer et al. 2008a)
<b>IVIEAIHTV</b>	MVA161R	A48R	187-195 (204)	Thymidylate kinase	(Assarsson et al. 2007; Meyer et al. 2008a; Johnson et al. 2009; Ishizuka et al. 2009)
<b>KLFTHDIML</b>	MVA109L	D12L	62-70 (287)	mRNA capping enzyme	(Meyer et al. 2008a; Johnson et al. 2009; Ishizuka et al. 2009)
<b>RVYEALYV</b>	MVA109L	D12L	251-259 (287)	mRNA capping enzyme	(Pasquetto et al. 2005; Assarsson et al. 2007; Meyer et al. 2008a; Kotturi et al. 2009; Ishizuka et al. 2009)
<b>KVDDTFYV</b>	MVA018L	C7L	74-82 (150)	C7L host range protein	(Terajima et al. 2003; Oseroff et al. 2005; Snyder et al. 2004; Smith et al. 2005; Stone et al. 2005; Ostrout et al. 2007; Meyer et al. 2008a; Terajima et al. 2008; Kastenmuller et al. 2007; Kotturi et al. 2009; Ishizuka et al. 2009)
<b>FLTSVINRV</b>	MVA042L	F12L	404-412 (635)	putative 73.1k protein	(Oseroff et al. 2005; Meyer et al. 2008a; Johnson et al. 2009; Kotturi et al. 2009; Ishizuka et al. 2009)
<b>GLNDYLHSV</b>	putative O1L		247-255 (666)	Hypothetical protein	(Oseroff et al. 2005; Meyer et al. 2008a; Kotturi et al. 2009; Ishizuka et al. 2009)
<b>ILDDONLYKV</b>	MVA074R	G5R	18-26 (434)	putative 49.8k protein	(Oseroff et al. 2005; Smith et al. 2005; Pasquetto et al. 2005; Assarsson et al. 2007; Terajima et al. 2008; Johnson et al. 2009; Kotturi et al. 2009; Ishizuka et al. 2009)
<b>YHIGNIKTV</b>	MVA146R	A35R	34-42 (176)	putative 20k protein	(Johnson et al. 2009)
<b>HLA-B*07:02:</b>					
<b>MPAYIRNTL</b>	MVA090R	J6R	303-311 (1286)	RNA polymerase subunit rpo147	(Oseroff et al. 2005; Terajima et al. 2008; Meyer et al. 2008a; Tang et al. 2008)
<b>RPMSLRSTII</b>	putative O1L	-	335-344 (666)	Hypothetical protein	(Oseroff et al. 2005; Terajima et al. 2008; Meyer et al. 2008a)

<sup>a</sup> Nomenklatur nach Vaccinia Virus Stamm Ankara (Locus U94848, Version U94848.1) (Antoine et al. 1998).

In dieser Arbeit wurden die meisten MS-Spektren der 16 Peptide in verschiedenen MS-Läufen eines Eluats gesichtet, welches für mehrere Messungen geteilt wurde. Grundsätzlich kann man aussagen, dass die gleichen Peptide nach verschiedenen Infektionen mit verschiedenen Zell- und Viren-Chargen eluiert wurden. Die Literatur-Recherche zeigt, dass alle Peptide, die im Rahmen dieser Arbeit isoliert werden konnten, ebenso von anderen Gruppen massenspektrometrisch identifiziert wurden (Tabelle 3.3). Das ist eine Bestätigung, dass es hier bei den eluierten Peptiden tatsächlich um natürliche Liganden handelt. Sie wurden unabhängig von Zellen- und Viren-Chargen gleichermaßen von mehreren Gruppen massenspektrometrisch identifiziert (Meyer et al. 2008a; Johnson et al. 2009).

Die meisten HLA-Liganden, die von JY isoliert wurden, waren humane Peptide. So findet man in einem LC-MS/MS-Lauf nach einer Prozessierung mit Proteome Discoverer als Beispiel 873 annotierte Peptide humanen Ursprungs, 25 Peptide viralen Ursprungs und ein Peptid mykobakteriellen Ursprungs. Das MVA-Ag85A kodiert nur ein, das MVA-TBF nur vier mykobakterielle Antigene und die übrigen sind virale Proteine. Somit ist es nicht verwunderlich, dass überwiegend Liganden humanen und dann viralen Ursprungs annotiert wurden. Mit der Affinitätschromatographie konnten im Rahmen dieser Arbeit natürlich prozessierte Liganden mykobakteriell Ursprungs identifiziert werden. Drei stammen vom Antigen 85A und eins von TB9.8. Leider konnten keine HLA-Liganden aus den Proteinen TB10.4 und Acr2 eluiert werden, obwohl laut der SYFPHEITHI-Vorhersage für T-Zell-Epitope ([www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)) mehrere Peptide zumindest mit einem HLA-A\*02-Motiv dieser beiden Proteine theoretisch prozessiert werden konnten. Mögliche Erklärung würde sich aus dem Aufbau des DNA-Konstrukts des MVA-TBF ergeben. Laut persönlichem Kontakt mit Helen Fletcher aus Oxford befindet sich direkt nach dem Promoter, der Transgen Region, die DNA kodierend für Ag85A. Nach Ag85A befindet sich TB9.8, dann Acr2 und zuletzt TB10.4. Somit wird theoretisch zuerst Ag85A, dann TB9.8, Acr2 und zuletzt TB10.4 exprimiert. Da in dieser Arbeit nur die Peptide von Ag85A und TB9.8 isoliert werden konnte, stellt sich die Frage ob die Infektion von 16 Stunden zu kurz war. Somit konnten die letzten zwei Proteine nicht exprimiert und dementsprechend prozessiert werden. Zusätzlich könnte man annehmen, die Struktur der zwei Proteine wäre über den Infektions-Zeitraum weniger stabil. Dies könnte zur Folge haben, dass diese Antigene schneller abgebaut und dementsprechend schneller präsentiert und um dann von anderen Peptiden ersetzt werden. Diese Theorien konnten auch nicht bestätigt bzw. entkräftet werden, da kein MVA-TBF für weitere Infektionen zur Verfügung stand.

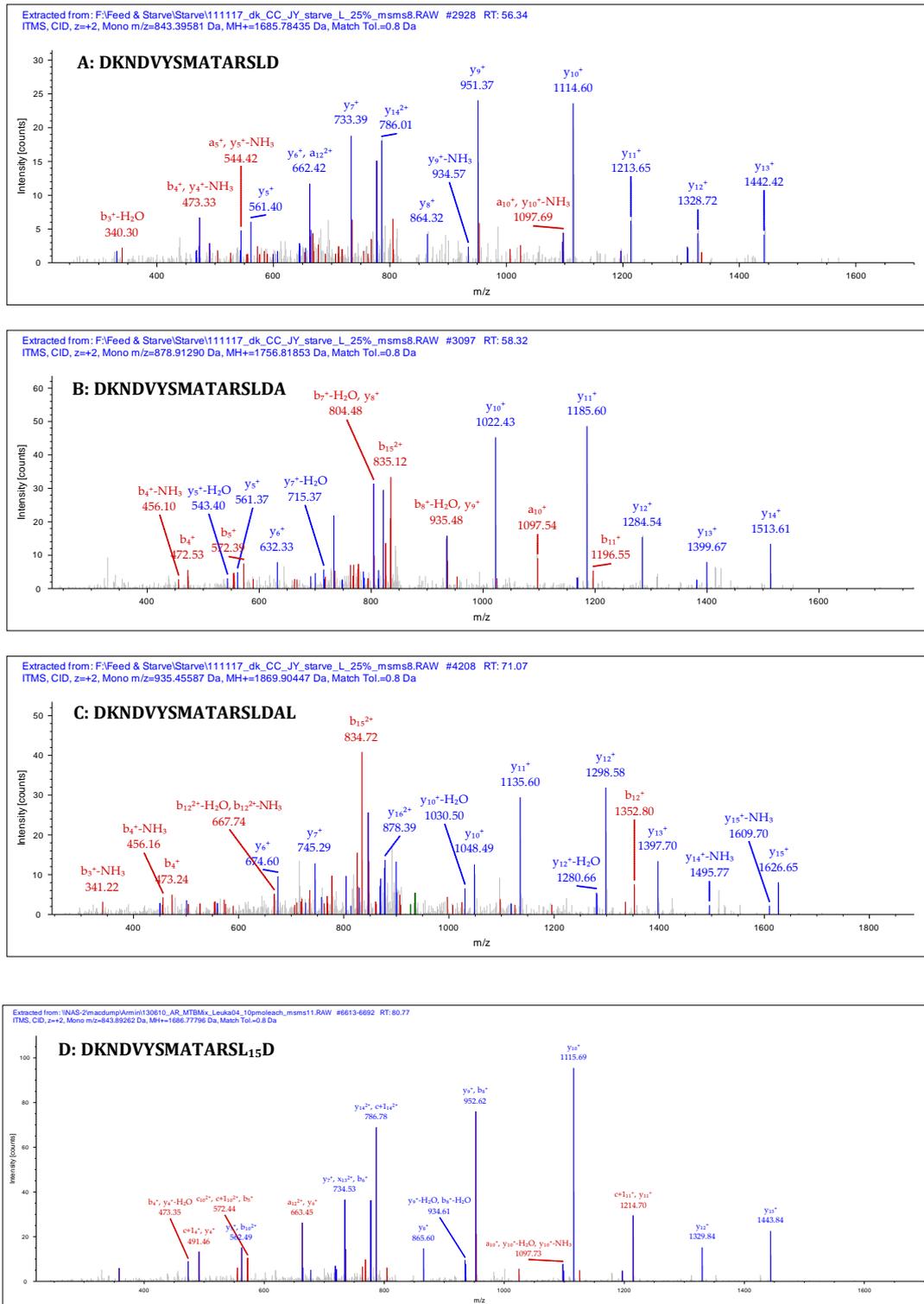
Die Mehrzahl an isolierten Liganden nach der Infektion mit MVA zeigt das vorherrschende HLA-A\*02-Motiv. Es wurden drei mykobakterielle und 14 virale Peptide mit dem HLA-A\*02-Motiv identifiziert. HLA-B\*07 hat im Vergleich zu HLA-A\*02 ein unflexibleres Peptid-Motiv. HLA-B\*07 braucht an der zweiten Stelle Prolin und in neunter Position Leucin als prominenteste Ankeraminosäuren ([www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)). HLA-A\*02 dagegen akzeptiert Peptide als Liganden mit den Ankeraminosäuren Leucin und Methionin in Position zwei und Valin bzw. Leucin in Position neun. Dementsprechend ist die Wahrscheinlichkeit 1:4 größer, dass Peptide mit dem HLA-A\*02-Motiv als mit dem HLA-B\*07-Motiv prozessiert werden. Vor allem kleine Proteine wie das TB9.8 welches nur aus 97 Aminosäuren besteht, haben eher die Möglichkeit zu HLA-A\*02-Peptiden prozessiert zu werden als zu HLA-B\*07-Peptiden. Laut SYFPEITHI-Vorhersageprogramm gibt es kein Peptid dieses Proteins mit einem starken HLA-B\*07 Motiv. Für das Protein Acr2 gäbe es theoretisch ein Peptid mit einem HLA-B\*07-Motiv, DPGQPVSRL, mit einem Score von 25. Für TB10.4, auch ein Protein von 96 Aminosäuren, gäbe es hypothetisch kein Peptid mit einem guten HLA-B\*07-Motiv.

### ***3.1.4 Elution von MHC Klasse II restringierten Peptiden***

Da der immunologische Schutz vor Tuberkulose vielmehr von einer CD4-vermittelten Zellantwort abhängt (Mogues et al. 2001), war das Bestreben natürlich prozessierte MHC Klasse II-Peptide mykobakteriellen Ursprungs zu isolieren. Die JY-Zellen sind eine immortalisierte B-lymphoblastoide Zelllinie, die MHC Klasse II-Moleküle exprimiert. Jedoch ist der Ansatz der Infektion mit Virus ungeeignet, da die Viren nach der Infektion der Zellen ins Zytosol gelangen und von dort aus den MHC Klasse I-Prozessierungsweg durchwandern (C. A. Janeway et al. 2005). So können eigentlich virale Peptide nur auf MHC Klasse I-Molekülen präsentiert werden. Es musste ein Ausweg angewandt werden um virale Proteine in die Kompartimente des MHC Klasse II-Prozessierungsweg einzuschleusen, z.B. Autophagie. Die Autophagie ist ein Mechanismus zur Degradation von langlebigen Proteinen und Organellen. Das abzubauen Material wird markiert, abgebaut und wieder zur Synthese von neuen Proteinen verwertet (Levine & Klionsky 2004). Die Autophagie kann auch nach einer Infektion mit intrazellulären Pathogenen auftreten (Shoji-Kawata & Levine 2009). Auf diesem Weg können Virus-infizierte Zellen den Erreger markieren und zum Schutz vor weiteren Schäden verdauen. Die in den Autophagosomen enthaltenen Proteine wandern durch das MIIC Kompartiment zur MHC Klasse II-Präsentation.

In dieser Arbeit konnten jedoch keine viralen und generell keine mykobakteriellen MHC Klasse II-Peptide nach einer Infektion isoliert werden. Somit wurde keine Autophagie während der Infektion der B-LCL Zellen selbstständig induziert. Die Autophagie folgt nach einem Stressestimulus wie dem Nährstoffmangel. Dieser Stressestimulus wurde ausgenutzt um die Autophagie absichtlich nach der Viruszugabe durch herbeigeführten Nährstoffmangel in den Zellen auszulösen. Zum Austesten der Theorie wurden vorgewaschene JY-Zellen ( $10^8$ ) mit MVA-wt (Wildtyp) mit einer MOI8 in PBS infiziert. Nach 1 h Inkubation der Zellen unter schwachem Schütteln wurde Zellmedium mit 1% Penicillin/Streptomycin und mit 1% FCS anstatt 10% zugegeben und für weitere 23 h inkubiert. Durch den Nährstoffmangel in infizierten Zellen konnte anschließend ein virales MHC Klasse II-Peptid mit den Längenvarianten DKNDVYSMATARSLD[A[L]] isoliert werden (Abbildung 3.6).

Dieses Peptid stammt aus einem Vaccinia-Hüllprotein (*Major EEV envelope protein*) (Meisinger-Henschel et al. 2007). Nach einem wiederholten Infektionsversuch konnte wieder das gleiche Peptid mit seinen Längenvarianten eluiert werden. Bei den drei identifizierten Peptiden handelt es sich um Längenvarianten eines HLA-Liganden. MHC Klasse II-Moleküle präsentieren wegen der offenen Enden des MHC Klasse II-Moleküls Peptide mit längerer Sequenz. So kann es passieren, dass ein Ligand in mehreren Längen präsentiert wird. Die ersten 15 Aminosäuren des eluierten DKNDVYSMATARSLD scheinen das Motiv zu enthalten und die letzten zwei Aminosäuren Alanin und Leucin müssten die Längenvarianten sein. Die kurze Sequenz DKNDVYSMATARSLD konnte mit dem synthetisch hergestellten Gegenstück validiert werden. Dieses Peptid wurde in unterschiedlichen Ansätzen und nach mehrmaligen Versuchen isoliert. Es liegt die Vermutung nah, dass es sich hier tatsächlich um ein natürlich prozessiertes MHC Klasse II-Peptid handelt, welches erstmals im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden konnte.



**Abbildung 3.6: Fragmentspektren der von MHC Klasse II eluierten Vaccinia-Peptiden.**

B-LCL (JY) wurden in PBS mit MOI8 infiziert und anschließend mit Nährstoff-armem Medium inkubiert. Die MHC-Peptid-Komplexe wurden über Affinitätschromatographie aufgereinigt und massenspektrometrisch analysiert. A-C: DKNDVYSMATARSLD[A[L]] und seine Längen-Varianten. D: DKNDVYSMATARSL<sub>15</sub>D, das synthetische Gegenstück mit einem isotopenmarkierten Leucin.

Leider konnten keine MHC Klasse II-Liganden aus MVA-Ag85A nach einmaliger Infektion mit  $10^8$  B-LCLs und anschließender Induzierung der Autophagie im Rahmen dieser Arbeit isoliert werden. Für weitere Infektions-Versuche stand bedauerlicherweise kein Virus mehr zur Verfügung.

### **3.2 Infektion mit Laborstamm H37Rv und Identifikation von mykobakteriellen Liganden**

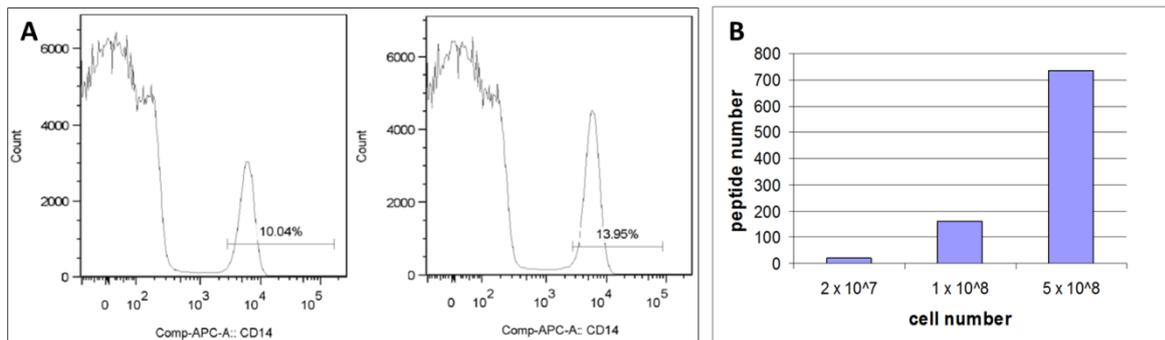
Neben der Infektion von B-LCL mit genetisch verändertem MVA-Virus, einem eher artifiziellen Modell der HLA-Präsentation von mykobakteriellen Peptiden, wurden zusätzlich Makrophagen mit H37Rv infiziert. H37Rv ist ein lebender und virulenter Laborstamm, welcher mehr als vier Proteine exprimiert. Bei den Zellen handelt es sich um Makrophagen, welche aus Monozyten mit GM-CSF ausdifferenziert wurden. Die Monozyten selber stammen aus peripherem Blut unterschiedlicher Spender in Form eines *Buffy Coats* oder einer Leukapherese. In diesem Modell sollten verschiedene mykobakterielle Proteine mit unterschiedlichsten HLA-Motiven präsentiert werden, welche im Anschluss aufgereinigt werden konnten.

Die Makrophagen wurden von Martin Busch für 1 bis 3 Tage mit dem pathogenen Laborstamm H37Rv (MOI5) in Ulm in einem S3-Labor infiziert, dann anschließend lysiert und nach bestandener Sterilkontrolle nach Tübingen zur Isolierung der MHC-Peptid-Komplexe transportiert. Die präsentierten Peptide wurden mit Affinitätschromatographie isoliert, aufgetrennt und in MS fragmentiert (Abbildung 3.3). Es wurden Zellen von neun Spendern infiziert (Tabelle 3.4), wobei von den ersten fünf Spendern die HLA-Typisierung nicht bekannt war. Das mögliche HLA-Motiv wurde mit Hilfe von eluierten Eigen-Peptiden und deren Ankeraminosäuren ermittelt ([www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)).

**Tabelle 3.4: Proben für die Infektion mit H37Rv und anschließender MHC-Präzipitation.**

<b>Nomenklatur</b>	<b>HLA-Typisierung</b>	<b>Quelle</b>
# 540	nicht bekannt	Buffy Coat
# 541	nicht bekannt	Buffy Coat
# 734	nicht bekannt	Buffy Coat
# 735	nicht bekannt	Buffy Coat
# 737	nicht bekannt	Buffy Coat
# 944	HLA-A*02:01, *03:01 HLA-B*07:02, *44:02 HLA-C*05:01, *07:02	Buffy Coat
# 947	HLA-A*01:01, *02:01 HLA-B*07:02, *08:01 HLA-C*07:01, *07:02	Buffy Coat
L 01	HLA-A*02, *31 HLA-B*41, *44 HLA-C*05, *07	Leukapherese
L 02	HLA-A*02, *24 HLA-B*07, *37 HLA-C*07	Leukapherese

Anfänglich wurden die Makrophagen in zwei Hälften getrennt (Probennummer: #540 und #541), wobei die eine Hälfte mit H37Rv infiziert wurde und die andere nicht. Die Proben wurden danach wie üblich getrennt lysiert und mit Nikotinsäure (Nic) und deuterierter Nikotinsäure (dNic) chemisch markiert. Diese Strategie der Markierung erlaubt die Analyse von zwei verschiedenen Proben in einer Messung (Meyer et al. 2008a). Leider konnten im Rahmen dieser Arbeit keine mykobakteriellen Liganden mit dieser Strategie identifiziert werden. Die geringe Zellzahl könnte der limitierende Faktor sein. Erfahrungsgemäß befinden sich in einem Buffy Coat durchschnittlich  $3\text{-}5 \cdot 10^8$  PBMCs, davon sind ca. 10-15% Monozyten (Abbildung 3.7 A) aus denen sich theoretisch Makrophagen entwickeln können. Wenn man die Rechnung vervollständigt, so isoliert man nach der Ficoll-Aufreinigung ca.  $5\text{-}7,5 \cdot 10^7$  Monozyten, aus denen Makrophagen für die Infektion ausdifferenziert werden können. Teilt man die isolierten Zellen in zwei Hälften so hat man anschließend  $2,5\text{-}3,75 \cdot 10^7$  Makrophagen für die Infektion übrig. Mit der Infektionsrate von circa 10-30% Prozent (persönlicher Austausch mit Arbeitsgruppe Steffen Stenger von der Universität Ulm, Medizinische Mikrobiologie) sinkt die Zahl an infizierten Zellen weiter, die theoretisch mykobakterielle Peptide präsentieren können. Die Tatsache, dass Mykobakterien die Expression von MHC-Molekülen und die Präsentation von mykobakteriellen Proteinen auf MHC hemmen, erschwerte zusätzlich das Vorhaben mykobakterielle HLA-Liganden zu identifizieren.



**Abbildung 3.7: Messung von CD14-positiven Zellen mittels FACS-Analyse und Anzahl von eluierten Peptiden im Verhältnis zu der Zellzahl.**

**A:** Beispielhaft sind die CD14-positiven Zellen, bzw. Monozyten, von zwei PBMC-Spendern dargestellt. Man erkennt eine 10-14% große Population an Monozyten. Die CD14<sup>+</sup> Zellen wurden in folgender Reihenfolge aussortiert: PBMCs, lebende Zellen, CD14-positive Zellen. Y-Achse: Counts=Zellzahl. X-Achse: CD14-Marker. **B:** Unterschiedliche Zellmengen an PBMCs wurden lysiert und die MHC-Peptid-Komplexe wurden mittels Affinitätschromatographie isoliert. Die Peptide wurden gegen die humane Swissprot Datenbank annotiert. Nach der Isolation von  $2 \times 10^7$  Zellen wurden weniger als 100 Peptide isoliert. Bei  $1 \times 10^8$  Zellen wurden mehr als 100 Peptide identifiziert und bei  $1 \times 10^8$  Zellen wurden über 600 Peptide identifiziert.

Betrachtet man die isolierten humanen Peptide in Abhängigkeit der lysierten Zellzahl (Analysen erstellt im eigenen Labor), so ist man in der Lage von  $2 \times 10^7$  Zellen Peptide mit mindestens 300 Kopien, die auf der Oberfläche präsentiert werden, zu isolieren. Wenn man jedoch  $1 \times 10^8$  Zellen zur Verfügung hat, so erhöht sich die Möglichkeit Peptide mit einer Kopienzahl von mindestens 60 zu isolieren. Bei  $5 \times 10^8$  Zellen ist man theoretisch in der Lage Peptide zu identifizieren, die einmalig auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Abbildung 3.7 B).

Wegen der geringen Zellzahl wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit verzichtet die Makrophagen in zwei Teile aufzuteilen und alle Zellen wurden anschließend für die Infektion mit H37Rv verwendet. Um die Elution von mykobakteriellen Liganden weiter zu erhöhen, wurden letztendlich Monozyten aus Leukapheresen isoliert (Tabelle 3.4). Eine Leukapherese entspricht sechs *Buffy Coats*, dementsprechend konnten aus L01  $4,33 \times 10^8$  und aus L02  $2,9 \times 10^8$  Makrophagen isoliert werden. Des Weiteren wurde der Versuch unternommen die HLA-Expression infizierter Makrophagen mit IFN $\gamma$ -Stimulation zu steigern. IFN $\gamma$  ist ein Zytokin mit vielen immunmodulatorischen Funktionen. Es wird von den T-Zellen freigegeben, inhibiert direkt das mykobakterielle Wachstum in den Makrophagen, da es die bakteriziden Fähigkeiten der Makrophagen aktiviert (Green et al.

2013). Zusätzlich induziert IFN $\gamma$  die verstärkte Expression von MHC in stimulierten Zellen. Dieses Zytokin kann direkt die Antigenpräsentation in Makrophagen aktivieren (Chan et al. 1992; Schroder et al. 2004). Die Makrophagen aus der Leukapherese L02 wurden mit 10 ng/ml IFN $\gamma$  für drei Tage vor der Infektion inkubiert. Das Ziel war die Aktivierung der Makrophagen und daraus resultierend die verstärkte Prozessierung und Präsentation von mykobakteriellen Peptiden.

Tabelle 3.5 zeigt die Zusammenfassung von Peptiden nach der Annotation mit der mykobakteriellen Datenbank und nach Anwendung von Ausschlusskriterien wie Ion Score, Rank, Ladung und Sequenzlänge (siehe 2.6.3). Wie schon vorher erwähnt war die Elution der ersten zwei Versuche (Proben #540 und #541) wenig erfolgreich. Keine 10 Sequenzen wurden in diesen beiden Proben zusammen annotiert. Mit der steigenden Zellzahl ist die Annotation von mykobakteriellen Peptiden größer. Bei den letzten zwei Proben (#944 und #947) ist die Zahl an Peptiden in einer Messung von 20% des gesamten Eluats größer als in den vorherigen in 50% des Eluats. Es handelt sich bei dieser Zusammenfassung um vorgeschlagene Peptidsequenzen des Programms Proteome Discoverer für den jeweiligen Organismus (hier: Mensch und Mtb) und ohne die HLA-Annotation. Trotz der Wahrscheinlichkeit die gleiche Menge an Monozyten nach einer *Buffy Coat*-Aufreinigung zu isolieren und der gleichen Infektionsrate ist die Ausbeute an Peptiden nicht immer die gleiche. Parameter wie die Lyse von Zellen und die Affinitätsaufreinigung können die Isolierung von Peptiden beeinflussen. Die erhöhte Zahl an Peptiden könnte auch die Folge der Optimierung am Massenspektrometer bzw. seines Messverfahrens sein. So wurden die ersten Proben kurz nach der Anschaffung der LQT Orbitrap XL gemessen und die letzten nach mehrmaliger Anpassung des Mess-Programms.

**Tabelle 3.5: Zusammenfassung der vorgeschlagenen H37Rv-Peptide aus infizierten *Buffy Coat*-Proben nach der Mascot-Prozessierung und Berücksichtigung von gewählten Filterkriterien wie Apm, Ion Score und Rank.**

Probenvolumen <sup>1</sup>	W36.2	L243
	# 540 <sup>2</sup>	
50 %	1	0
50 %	5	3
	#541 <sup>2</sup>	
50 %	3	3
50 %	0	k. M.
	# 734 <sup>2</sup>	
50 %	16	0
50 %	18	10
	# 735 <sup>2</sup>	
50 %	3	5
50 %	25	5
	# 737 <sup>2</sup>	
50 %	17	1
50 %	3	1
	# 944 <sup>2</sup>	
20 %	9	3
40 %	2	5
40%	10	6
	# 947 <sup>2</sup>	
20 %	58	2
40 %	20	0
40%	22	0

1. Probenvolumen: die eingesetzte Menge des Eluats für eine Messung in der LTQ Orbitrap XL. 2. Nummerierung der *Buffy Coats* verwendet zur Isolierung von mykobakteriellen Liganden. k. M. = keine Messdaten vorhanden. Die Proben sind verloren gegangen, wegen technischer Störung der LTQ Orbitrap XL

Nach der IFN $\gamma$ -Inkubation konnte keine Verbesserung der Ausbeute bzw. Erhöhung der Präsentation von mykobakteriellen Peptiden beobachtet werden. Im Grunde wurden keine Unterschiede in der Anzahl von eluierten Peptiden nach der IFN $\gamma$ -Vorbehandlung beobachtet, vergleicht man die humanen annotierten Peptide aus L01 und L02 (Tabelle 3.6). Die bessere Qualität der MS-Läufe und dementsprechend die größere Menge an identifizierten Peptiden wäre eher auf die erhöhte Zellzahl und die immerwährende Optimierung der massenspektrometrischen Messung zurückzuführen als auf die Vorstimulation mit IFN $\gamma$ . Weiterhin fällt auf, dass das Lysat auch nach der ersten Affinitätschromatographie weiterhin Peptide enthielt. Das könnte bedeuten die Antikörper, die bei der Aufreinigung benutzt wurden, waren von schlechter Qualität oder wurden in unzureichender Menge eingesetzt. Das gleiche Phänomen wurde auch nach der Affinitätsaufreinigung bei der zweiten Leukapherese (L02) beobachtet.

**Tabelle 3.6: Zusammenfassung von humanen und mykobakteriellen Peptiden der Leukapheresen Proben nach der Prozessierung und Berücksichtigung von gewählten Filterkriterien wie  $\Delta$ ppm, Ion Score und Rank.**

Messung	W6.32		L243	
<b>Leukapherese L01: Erste Affinitätsaufreinigung<sup>1</sup></b>				
	<i>Human</i>	<i>H37Rv</i>	<i>Human</i>	<i>H37Rv</i>
<b>30% ZipTip (1)<sup>3</sup></b>	339	13	151	9
<b>30 %ZipTip (1)<sup>3</sup></b>	94	7	44	1
<b>30 %ZipTip (1)<sup>3</sup></b>	600	46	137	5
<b>100% ZipTip (2)<sup>3</sup></b>	55	11	51	2
<b>Rest vom Eluat <sup>4</sup></b>	1159	84	k. M.	k. M.
<b>Leukapherese L01: Zweite Affinitätsaufreinigung<sup>2</sup></b>				
<b>20 % des Eluats <sup>4</sup></b>	2	16	72	3
<b>80 % des Eluats <sup>4</sup></b>	k. M.	k. M.	322	11
<b>Leukapherese L02: Erste Affinitätsaufreinigung<sup>1</sup></b>				
<b>100% ZipTip (1)<sup>3</sup></b>	336	63	188	34
<b>20% ZipTip (2)<sup>3</sup></b>	206	35	48	5
<b>80% ZipTip</b>	k. M.	k. M.	k. M.	k. M.
<b>Leukapherese L02: Zweite Affinitätsaufreinigung<sup>2</sup></b>				
<b>33 % von ZipTip (1)<sup>3</sup></b>	556	114	387	52
<b>66 % von ZipTip (1)<sup>3</sup></b>	1744	423	921	166

- 1 Erste Affinitätsaufreinigung. Die Lysate bzw. die MHC-Moleküle der Leukapheresen wurden insgesamt zweimal nacheinander mit Hilfe der Antikörper-gekoppelten Säulen aufgereinigt.
- 2 Zweite Affinitätsaufreinigung. Die zweite MHC-Aufreinigung des Lysats mit Affinitätschromatographie.
- 3 20, 30, 60, 80 bzw. 100 % ZipTip bedeutet die eingesetzte Menge einer ZipTip-Aufreinigung in einer Messung. Eine ZipTip-Aufreinigung enthielt theoretisch 20  $\mu$ g Peptid.
- 4 Das Eluat ohne die ZipTip-Aufreinigung wurde für die Messung verwendet.

Die Zahl in Klammern bedeutet die numerische Abfolge einzelner ZipTip-Aufreinigungen, die in einer LC-MS-Messung verwendet wurden. 1 = erste ZipTip-Aufreinigung. 2 = zweite ZipTip-Aufreinigung des gleichen Eluats.

k. M. = Keine Messdaten vorhanden. Die Proben sind verloren gegangen, wegen technischer Störung der LTQ Orbitrap XL

Letztendlich konnten vier mykobakterielle Liganden mit Hilfe der LC-MS-Methode isoliert werden (Tabelle 3.7, Abbildung 3.8). Die Peptid-Kandidaten wurden nach dem Vergleich von synthetischen Zwillingypeptiden verifiziert.

**Tabelle 3.7: Mykobakterielle Liganden eluiert von ausdifferenzierten Makrophagen nach der Infektion mit dem pathogenen Laborstamm H37Rv.**

Sequenz	HLA-Motiv	Accession Nummer <sup>a</sup>	Gen <sup>b</sup>	Epitop-Lokalisation <sup>c</sup>	Protein-Name	Funktion
<b>TVFDAIRAAK</b>	A*03	Rv3667 (MTV025.015)	acs	642-651 (651)	Acetyl-CoA Synthetase	katalytische Aktivität
<b>QLRYDGQIAV</b>	A*02	Rv0051 (MTCY21D4.14)	-	143-152 (560)	Transmembran Protein	Funktion unbekannt
<b>GDAVTLHRI</b>	n.a.	Rv1043c (MTCY10G2.06)	-	60-68 (341)	hypothetisches Protein	Funktion unbekannt
<b>RPGVPAAAA</b>	B*07	Rv1004c (MTCI237.20c)	-	96-104 (419)	Mögliches Membranprotein	Funktion unbekannt

<sup>a</sup> Accession Nummer nach MYCTU (*Mycobacterium tuberculosis* [1773]), Stamm H37Rv (ATCC 25618), Sanger ID.

<sup>b</sup> Gen-Name nach MYCTU [1773], Stamm H37Rv (ATCC 25618).

<sup>c</sup> Position der Aminosäuren im Protein nach MYCTU (ATCC 25618). In Klammern ist die komplette Anzahl an Aminosäuren des Proteins dargestellt.

n.a. = nicht annotiert

Bei diesen Peptiden handelt es sich um ein Peptid mit einem HLA-A\*02-Motiv und jeweils eines mit einem HLA-A\*03- und HLA-B\*07-Motiv. Einem Peptid konnte kein passendes HLA-Motiv zugeordnet werden. Die vier Peptide wurden bisher noch nicht beschrieben. Die dazugehörigen Proteine sind alle unterschiedlich, wobei nur bei einem (Rv3667) die genaue Funktion bekannt ist. Da die Infektion der Makrophagen höchstens drei Tage dauerte, müssten die vier isolierten Liganden zum frühen Protein-Spektrum der Mykobakterien gehören, die in den ersten Phasen nach der Infektion exprimiert werden.

Rv0051 könnte ein konserviertes Transmembranprotein sein, welches in Zellwand-vermittelte und zelluläre Prozesse verwickelt ist, wobei die eindeutige Funktion noch nicht bekannt ist. Die Arbeitsgruppe um Liu et. al. haben durch die wiederholte Suche von Genomsequenzen, Motiv-Abstammung und strukturellen Vergleich mit sequenzierten Glykosyltransferasen vorhergesagt, dass RV0051 in die Gruppe der GT-C-Superfamilie der Glykosyltransferasen gehören könnte (Liu & Mushegian 2003) (<http://tuberculist.epfl.ch/quicksearch.php?gene+name=RV0051&submit=Search>).

Rv1004c ist ein mögliches Transmembranprotein, dessen Funktion bisher unbekannt ist. Es enthält repetitive Sequenzen, welche Ähnlichkeiten mit Elastin und mögliche N-terminale Signalsequenzen haben (<http://www.sanger.ac.uk/>). Malen et al. lysierte H37Rv mit Beads (*bead beating*), nach anschließender Zentrifugation wurde die Proteinphase mit Triton X-114 aufgetrennt, präzipitiert und massenspektrometrisch analysiert. Das Rv1004c war eines der möglichen Transmembranproteine, die aus der lipidreichen Phase der

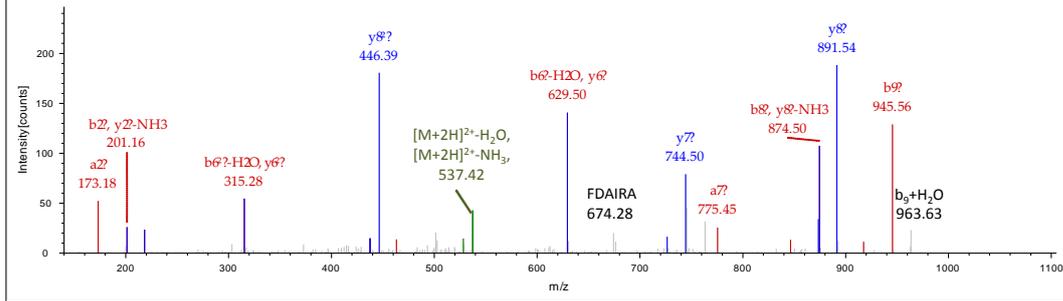
Triton X-114-Auftrennung zu finden war (Malen et al. 2010). Auch ein andere Gruppe konnte dieses Protein identifizieren (de Souza et al. 2011).

Rv1043c ist ein vorhergesagtes Protein ohne bekannte Funktion (Mazandu & Mulder 2012) (<http://tuberculist.epfl.ch/quicksearch.php?gene+name=Rv1043&submit=Search>).

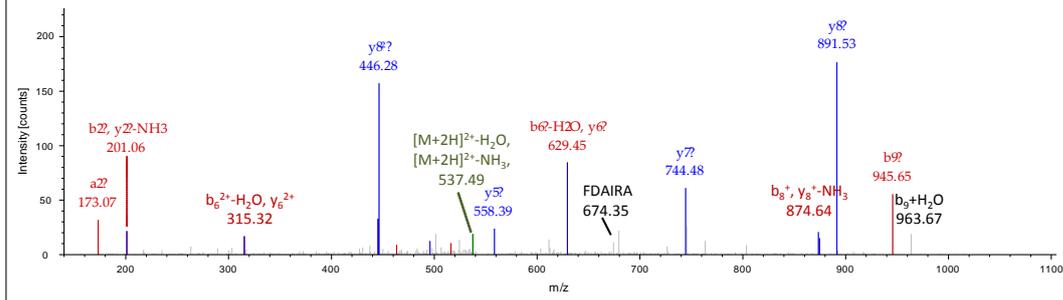
Das am besten charakterisierte Protein ist die Acetyl-CoA-Synthetase (Rv3667), aus der das isolierte Peptid TVFDAIRAAK stammt (de Souza et al. 2011). Rv3667 hat eine katalytische Aktivität im Lipidmetabolismus mit einer möglichen AMP-Binde-Domänenstruktur (<http://tuberculist.epfl.ch/quicksearch.php?gene+name=rv3667&submit=Search>) (<http://www.sanger.ac.uk/>). Die Acetyl-CoA-Synthetase wurde aus der Membranfraktion nach der Auftrennung des H37Rv-Lysats mit 1D-SDS-PAGE (*1 dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) und *Microcapillary liquid Chromatography-Nanospray*-Tandem Massenspektrometrie-Analyse isoliert (Gu et al. 2003). Mawuenyega et al. konnten auch Rv3667 in der Zellwand- und Zellmembran-Fraktion isolieren. Ebenso De Souza et al. konnten Rv3667, jedoch mit einer anderen Methodik, in der Membranproteinfraktion, aber nicht in der Kulturfiltrat-Fraktion, erfolgreich identifizieren. (Mawuenyega et al. 2005; de Souza et al. 2011) ([ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Mycobacterium/tuberculosis/functional\\_classes/tabbbed\\_list](ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Mycobacterium/tuberculosis/functional_classes/tabbbed_list)).

**A: Rv3667<sub>642-651</sub> TVFDAIRAAK**

Extracted from: E:\25082011\dk\_cc\_Leuka\_W\_2ug\_newGradient\_110825.ms.ms2.RAW #4856-4860 RT: 63.84  
 ITMS, CID, z=+2, Mono m/z=546.31354 Da, MH+=1091.61980 Da, Match Tol.=0.8 Da

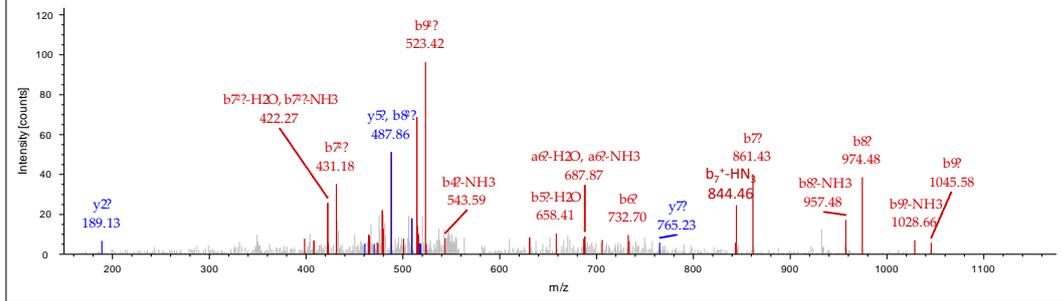


Extracted from: E:\nt\_cc\_synpepmix3\_110908.ms.ms5.RAW #2096-2100 RT: 56.44  
 ITMS, CID, z=+2, Mono m/z=546.31390 Da, MH+=1091.62053 Da, Match Tol.=0.8 Da

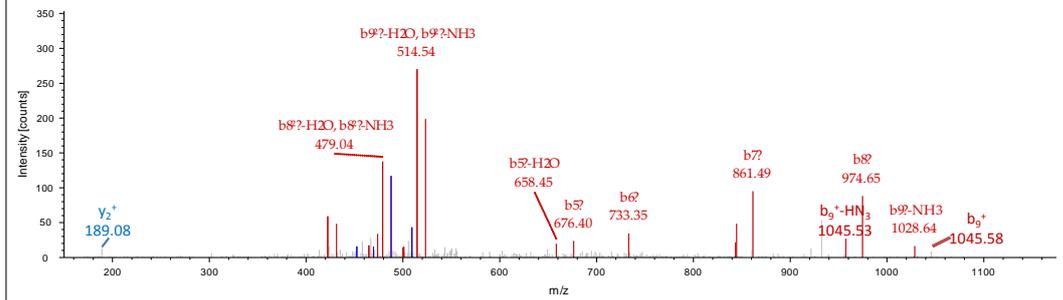


**A: Rv0051<sub>143-152</sub> QLRYDGQIAV**

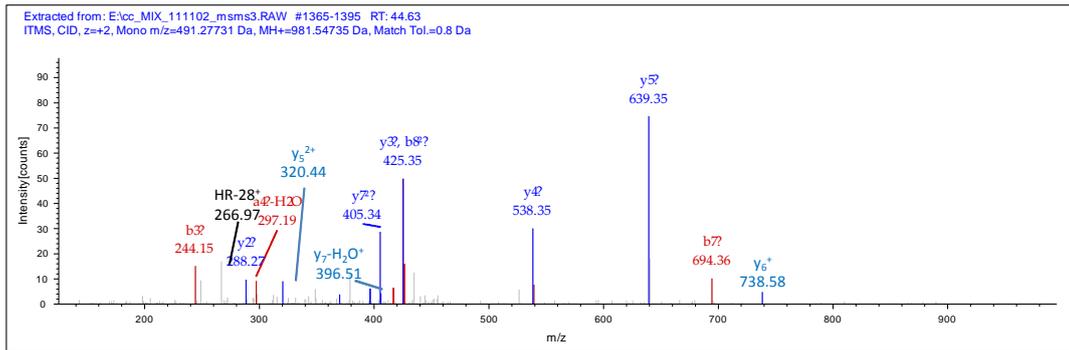
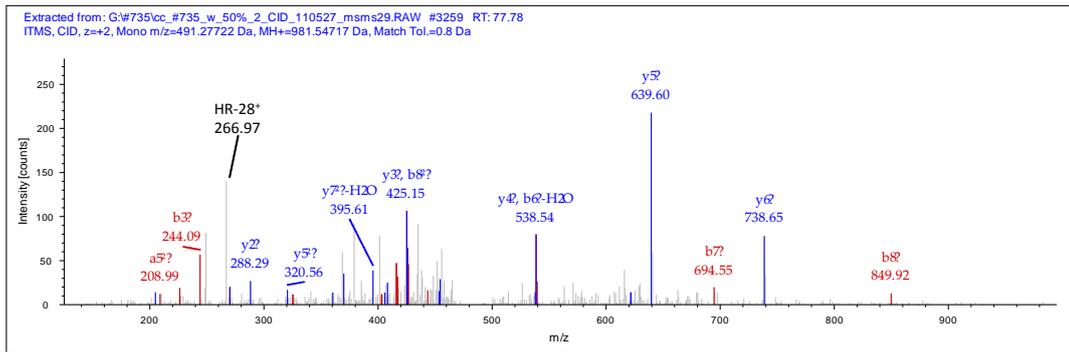
Extracted from: E:\runs111011\dk\_cc\_L01\_2Lauf\_W.ms.ms5.RAW #4276-4304 RT: 67.51  
 ITMS, CID, z=+2, Mono m/z=581.81367 Da, MH+=1162.62006 Da, Match Tol.=0.8 Da



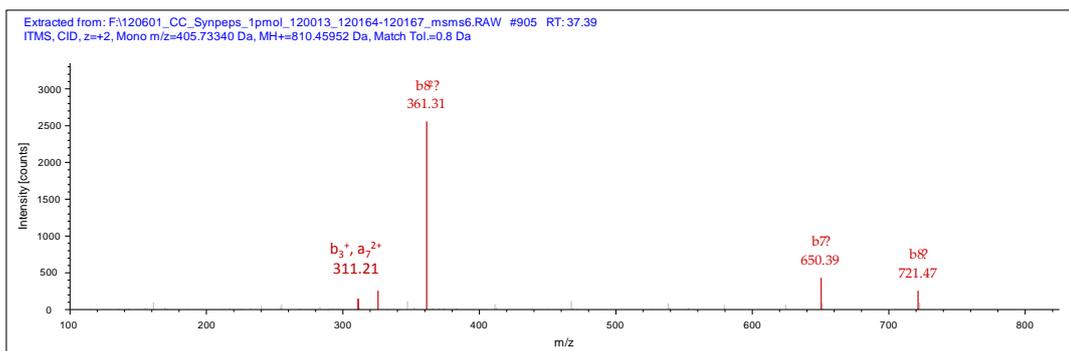
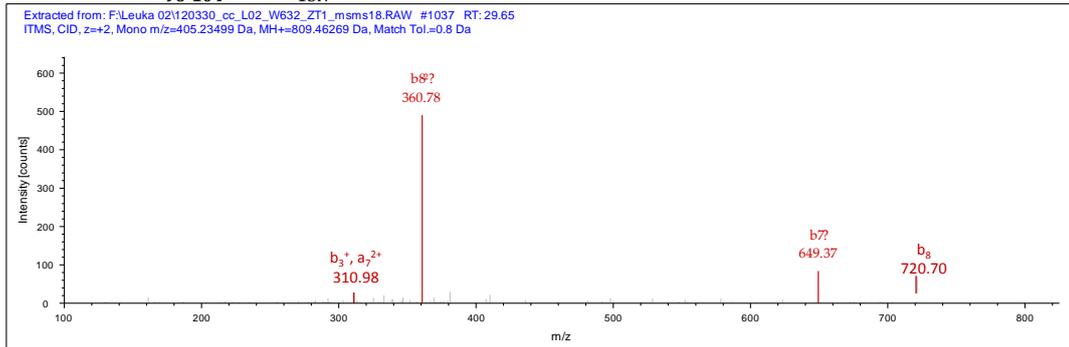
Extracted from: E:\syn\_peps\_090811\nt\_cc\_synpepmix1\_110908.ms.ms3.RAW #2180 RT: 59.99  
 ITMS, CID, z=+2, Mono m/z=581.81445 Da, MH+=1162.62163 Da, Match Tol.=0.8 Da



**C: Rv1043c<sub>60-68</sub> GDAVTLHRI**



**D: Rv1004c<sub>96-104</sub> RPGV<sub>15N</sub> PAAAA**



**Abbildung 3.8: Fragmentspektren von identifizierten *M. tuberculosis* HLA-Liganden aus Makrophagen infiziert mit dem pathogenen Laborstamm H37Rv.**

Vergleich von Fragmentspektren eluierter Peptide, welche nach der Infektion der Makrophagen mit Mtb (H37Rv) nach 3-5 Tagen isoliert wurden (oben). Unten: das entsprechende Fragmentspektrum vom Gegenstück. D: RPGV<sub>15N</sub>PAAAA, zum Synthetisieren wurde das schwere Valin (<sup>15</sup>N) verwendet, dementsprechend sind die Bruchstücke vor Valin alle um 1 Da schwerer als beim Originalpeptid.

Trotz der anfänglichen Schwierigkeiten wurden vier natürlich prozessierte mykobakterielle Peptide identifiziert. Die Sequenzen der Peptide sind bisher noch nicht beschrieben worden, somit handelt es sich bei diesen Peptiden um neu identifizierte HLA-Liganden. Interessanterweise gehören alle identifizierten Peptide zu MHC Klasse I-Liganden. Der mykobakterielle Infektionsweg geht über die Phagozytose der Erreger, die sich wiederum in den Vesikeln vermehren indem sie die Phagosomausreifung inhibieren. Denkbar ist, dass es sich bei der Inhibition der Phagosomausreifung um kein Alles-Oder-Nichts-Ereignis handelt und es dazu kommen kann, dass einige Bakterien tatsächlich verdaut und somit auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Jedoch unterlaufen normalerweise die phagozytierten Partikel den MHC Klasse II-Prozessierungsweg. Wie sind aber die eluierten MHC Klasse I-Liganden mykobakteriellen Ursprungs zu erklären?

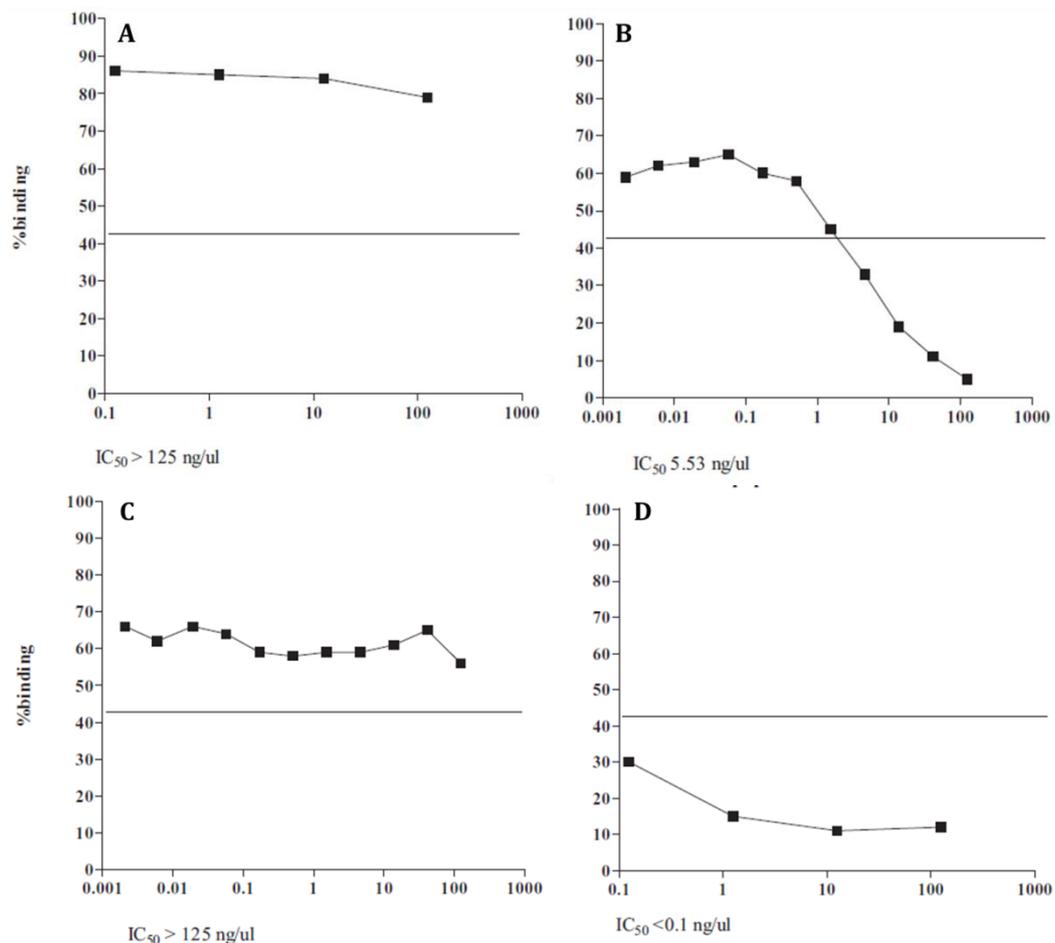
Ein mögliches Szenario *in vivo* wäre die Kreuz-Präsentation. Die mit BCG infizierten Zellen können in Apoptose gehen und die entstandenen apoptotischen Partikel (*apoptotic bodies*) werden von den DZs aufgenommen und auf MHC-Molekülen präsentiert (Farinacci et al. 2012b). Die in den apoptotischen Partikeln enthaltenen mykobakteriellen Proteine werden in den DZs prozessiert und kreuzpräsentiert (Mattow et al. 2003). Da Mtb zuweilen auch DZs infiziert, kann die Präsentation von MHC Klasse I-Liganden direkt von DZs kommen. Die Kreuz-Präsentation in den DZs wird durch verspätete Ansäuerung des Phagosoms bevorzugt (van Endert 2011). Bekanntlich inhibiert Mtb die Ausreifung des Phagosom zum Phagolysosom. Ein weiterer Mechanismus der Präsentation von extrazellulären Erregern auf MHC Klasse I-Molekülen wäre die Autophagie (Deretic 2010). Die phagozytierten Mykobakterien erreichen auf diesem Weg den MHC Klasse I-Prozessierungsweg. Mtb kann mitunter direkt aus dem Phagosom durch die Translokation in das Zytosol gelangen. Van der Wel konnte die Translokation ins Zytosol nach zwei Tagen der Infektion beobachten (van der Wel et al. 2007). Ein Prozess, welcher die Proteine CFP-10 und ESX-1 benötigt. Die Flucht aus dem Phagosom kann auch durch die Porenbildung in der phagosomalen Membran geschehen. Im Zytosol angekommen, hat Mtb Zugang zu neuen Nahrungsquellen (van der Wel et al. 2007; de Jonge et al. 2007). Die Präsentation der MHC Klasse I-Liganden wäre hier eher das Ergebnis der Autophagie oder des Translokation der Mykobakterien vom Phagosom ins Zytosol.

Paradoxerweise wurden im Rahmen dieser Arbeit keine MHC Klasse II-Liganden von H37Rv identifiziert. Auch nach der Vorinkubation der Makrophagen mit IFN $\gamma$  konnten keine MHC Klasse II-Liganden isoliert werden. Wie schon erwähnt, unterlaufen die phagozytierten Partikel den MHC Klasse II-Prozessierungsweg, demnach wurde eher die Isolierung der MHC Klasse II-Peptide erwartet. Das Fehlen mykobakterieller MHC Klasse II-Peptide kann

nicht durch die fehlerhafte Aufreinigung des Lysats erklärt werden, da viele Selbst-Peptide isoliert werden konnten (Tabelle 3.4 und 3.5). Somit müssen die fehlenden MHC Klasse II-Liganden die Folge der Inhibition von Phagosomareifung sein. Mtb greift zum eigenen Schutz in die Synthese von Phagosom und Lysosom sowie den lysosomalen Verdau und die Präsentation von verdauten Proteinen ein (Chackerian et al. 2002; Ernst 2012). Dieser Prozess ist entscheidend für die Mykobakterien in den ersten Tagen der Infektion für das eigene Überleben. Um unentdeckt zu bleiben, inhibiert Mtb die Synthese von MHC Klasse II-Molekülen (Pai et al. 2003; Harding & Boom 2010). Andere Experimente zeigen die Inhibition der MHC Klasse II-Prozessierung durch das Protein 19 kD Lipoprotein. Dieser Vorgang findet circa einen Tag nach der Infektion statt und benötigt den Rezeptor TLR2 (Noss et al. 2001b; Pai et al. 2003).

### **3.3 Bindekapazität der eluierten HLA-A\*02-Liganden an das HLA-A\*02-Molekül**

Die mykobakteriellen HLA-A\*02-Liganden wurden zur weiteren Charakterisierung einem Monomer-Bindeassay unterzogen. In diesem Test werden die Fähigkeit und die Affinität eines Peptids zur Bindung an ein HLA-Molekül ermittelt, wobei das rekombinante HLA-A\*02-Molekül in einer 96-Well-Platte bei 20°C und für 48 h mit  $\beta$ -Mikroglobulin, Fluoreszenz-markierten Peptiden, Proteaseinhibitoren und zu testenden Peptiden inkubiert wurde. Das getestete Peptid konkurriert mit dem fluoreszierenden Peptid um die Bindungsstellen des MHC-Moleküls (kompetitiver Test). Das Test-Peptid wurde in unterschiedlicher Konzentration eingesetzt um eine konzentrationsabhängige Kurve zu erhalten. Die HLA-Peptid-Komplexe wurden dann durch Gelfiltration von ungebundenen Peptiden aufgetrennt und die Bindekapazität wurde anhand der absinkenden Fluoreszenz ermittelt. Die Affinität errechnet sich durch die verbleibende Fluoreszenz, d.h. je niedriger die mittlere Peptidkonzentration ( $IC_{50}$ ), die benötigt wird, um eine halbmaximale Bindung der MHC-Moleküle zu erreichen, desto höher ist die Bindungsaffinität. Diese Arbeit wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Tom Ottenhoff, Annemiek Geluk und ihren Team durchgeführt (Geluk et al. 2000; Geluk et al. 2011). Die Analyse der Bindekapazität wurde mit den Peptiden HVKPTGSAV, QLRYDGQIAV, RVRGAVTGM und LLDAHIPQL durchgeführt.



**Abbildung 3.9: Bindung von mykobakteriellen Peptiden an rekombinante HLA-A\*02-Moleküle.**

Die mykobakteriellen Peptide HVKPTGSAV (A), QLRYDGQIAV (B), RVRGAVTGM (C) und LLDIHIPQL (D) wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mit rekombinanten HLA-A\*02-Molekülen,  $\beta$ -Mikroglobulin und fluoreszierendem Peptid (Hepatitis B Virus Core Peptid, AS 47–56) gemischt, um die Bindekapazität der mykobakteriellen Peptide zu ermitteln.  $IC_{50}$ : Die mittlere Peptidkonzentration, die benötigt wird, um eine halbmaximale Bindung der MHC-Moleküle zu erreichen. Y-Achse: Bindekapazität in %. X-Achse: die verwendete Peptid-Konzentration in  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Die Versuche und die Abbildung wurden freundlicherweise von Annemiek Geluk und ihrem Team von der Universität Leiden durchgeführt bzw. bereitgestellt.

Wie man in Abbildung 3.9 erkennt, sind zwei der vier getesteten Peptide kaum bzw. gar nicht und zwei andere sehr gut in der Lage, an das HLA-A\*02-Molekül zu binden. HVKPTGSAV (A) und das RVRGAVTGM (C) zeigen keine Affinität zum MHC-Molekül. Das Vorsageprogramm SYFPEITHI berechnete auch einen niedrigen Score dieser beider Peptide (16 und 15), was eine niedrige Affinität zum HLA-A\*02-Molekül bedeutet. Dieser Sachverhalt konnte mit dem durchgeführten Test bestätigt werden. Die Kurve, stellvertretend für die eingesetzten Konzentrationen, verläuft annähernd parallel zur X-Achse, was bedeutet, dass auch große Peptidmengen kaum mit fluoreszierendem Peptid

um die MHC Molekül-Bindestelle konkurrieren. Die Peptide QLRYDGQIAV (B) und LLDAHIPQL (D) haben im Vergleich dazu eine starke Affinität zu HLA-A\*02, wobei LLDAHIPQL am stärksten an das HLA-Molekül bindet. Wie dargestellt verdrängt das Peptid QLRYDGQIAV (B) mit der Konzentration von 5,53 ng/ml die Hälfte des fluoreszierenden Signals. LLDAHIPQL (D) hat jedoch von den hier getesteten Peptiden die stärkste Affinität zum HLA-Molekül. Schon mit der geringsten Konzentration, 0,1 ng/ml, bleibt nur noch 30 % der Fluoreszenz übrig. Mit der Konzentration von 1 ng/ml werden fast 90% der HLA-A\*02-Moleküle vom LLDAHIPQL besetzt.

Von dem Peptid GDAVTLHRI wurde der HLA-A\*02-Bindeassay aus Zeitgründen nicht durchgeführt. Für die restlichen Peptide mit HLA-C\*0-7 (IYHPQQFVY), HLA-B\*07-(RPGVPAAAA) und HLA-A\*03- (TVFDAIRAK) Motiv konnte kein HLA-Affinitätsassay wegen fehlender rekombinanten schweren  $\alpha$ -Ketten in dem Labor von A. Geluk durchgeführt werden. Von dem HLA-A\*03-Ligand kann nur eine indirekte Aussage über seine Bindefähigkeit an das HLA-A\*03-Molekül gemacht werden. Da die Herstellung eines TVFDAIRAAK-Tetramers gelang, wird angenommen, dass TVFDAIRAAK gut an HLA-A\*03 bindet. Über die Höhe der Affinität kann jedoch keine Aussage getroffen werden.

### **3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Isolierung von mykobakteriellen HLA-Liganden**

Mit der immer besser werdenden massenspektrometrischen Technik wird die Analyse von komplexen Proben immer leichter und schneller. Die Wahrscheinlichkeit natürlich prozessierte Liganden pathogenen Ursprungs zu identifizieren, steigt mit dieser Methode, auch wenn das Pathogen den MHC-Prozessierungsweg zu inhibieren weiß. Mit dieser Technik konnten im Rahmen dieser Arbeit acht mykobakterielle Liganden isoliert werden. Bei sechs Peptiden handelt es sich um neue identifizierte Liganden. Die weiteren zwei Peptide sind schon bekannt und wurden mit Hilfe von Vorhersage und Epitop-Mapping identifiziert. In dieser Arbeit konnten sie als natürlich prozessierte und präsentierte HLA-Liganden identifiziert werden. Zusätzlich konnten mit der Induktion der Autophagie und nachfolgender massenspektrometrischer Analyse erstmals drei MHC Klasse II-Peptide von MVA identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um einen Liganden und seine zwei Längenvarianten.

Durch die Etablierung der Infektion als Folge einer Kombination von verschiedenen Parametern wie Zellzahl, Zeit und Status des Mykobakterium-Stamms (attenuiert vs. pathogen vs. Hitze-inaktiviert) und optimaler Aufreinigung der MHC-Peptid-Komplexe kann die Anzahl an isolierten Peptiden noch weiter gesteigert werden. Zusätzlich ist die Massenspektrometrie ein effektives Werkzeug zur Identifizierung von post-translationalen Veränderungen der Peptide bzw. deren Proteine (Mester et al. 2011). Somit können auch post-translationale Modifikationen, die relevante Zellvorgänge anregen, durch Massenspektrometrie identifiziert werden. Eine weitere Anwendung der Massenspektrometrie ist die differentielle Markierung von unterschiedlichen Proben zur vereinfachten Identifizierung von fremden HLA-Liganden (Meyer et al. 2008a). So kann in nächster Zukunft immer schneller und effektiver die Charakterisierung vom natürlich prozessierten HLA-Ligandom vorangehen. Die Liganden ermöglichen den Einsatz dieser als potentielle Kandidaten für eine prophylaktische oder therapeutische Impfung. Wegen der geringen möglichen Nebenwirkungen fänden die HLA-Liganden ein breites Einsatzgebiet in der Immunologie.

### **3.5 Immunogenität der eluierten Peptide**

#### **3.5.1 Testen der eluierten Liganden auf eine Immunreaktion bei gesunden Spendern**

In der Theorie sollten HLA-präsentierte Peptide fremden Ursprungs eine Immunantwort auslösen können. Nachdem in dem ersten Teil dieser Arbeit natürlich prozessierte Peptide mykobakteriellen Ursprungs isoliert wurden, konnte die immunologische Relevanz dieser Liganden bestimmt werden. Die dazugehörigen T-Gedächtnis-Zellen sollten nach der Aktivierung durch die Peptide Zytokine sezernieren und in der Lage sein die Antigen-präsentierenden Zellen zu lysieren.

Es sollten PBMCs gesunder Spender mit einer BCG-Impfung und passender HLA-Typisierung auf spezifische Gedächtnis-T-Zellen untersucht werden. Um die T-Zellen gegen ein spezifisches mykobakterielles Epitop nachweisen zu können wurden sie vor dem Epitop-Screening durch eine peptidspezifische Amplifikation über 12 Tage *in vitro* vermehrt.

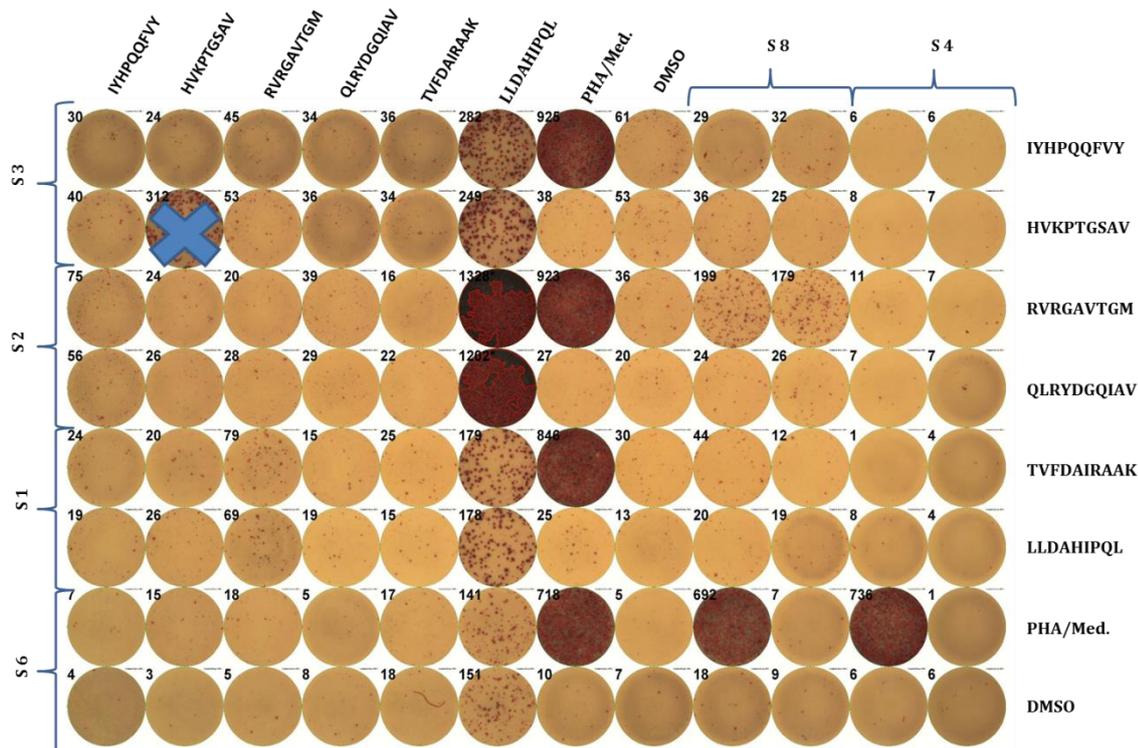
Insgesamt wurden 11 Spender gefunden, die eine BCG-Impfung erhalten hatten und mindestens ein HLA-Molekül für die Testung von identifizierten Peptiden exprimieren (Tabelle 3.8). Den meisten BCG-geimpften Spendern wurde zusätzlich Blut für den QuantiFERON®-Tb-Test abgenommen. Dieser Test ist ausgelegt für die Messung einer IFN $\gamma$ -Reaktion von spezifischen Gedächtnis-T-Zellen auf Mtb-Antigene, die ausschließlich in pathogenen Mtb-Stämmen exprimiert werden. Somit werden nur latent oder aktiv Infizierte, aber nicht die BCG-Geimpften erfasst (siehe 2.6.6). Daneben wurde bei den meisten BCG-Spendern noch zusätzlich deren PPD-Status in einem IFN $\gamma$ -ELISA überprüft. Die Idee dahinter war die Identifizierung von latent infizierten Probanden unter den anonymen *Buffy Coat*-Spendern. Keiner der BCG-Geimpften hatte eine latente Infektion mit Mtb und nur zwei der getesteten BCG-Spender zeigten eine Immunreaktion auf die Stimulation mit PPD. Zwei unbekannte Spender mit PPD-positivem und ESAT-6 negativem Status wurden in die Kohorte aufgenommen, um die Ligand-Kandidaten im ELISPOT auszutesten. Zwei der Spender (S10 und S15) mit einem unbekanntem Impf-Status wurden auch in die Probanden-Liste aufgenommen. Trotz des negativen PPD Status war ihre Reaktion auf zwei der getesteten Peptide stark. Deswegen wurde von diesen beiden Spendern angenommen, sie seien geimpft.

**Tabelle 3.8: Spender für immunologische Tests.**

Spender Nr.	HLA-Typisierung	BCG-Impfung	PPD-Status	QuantiFERON Test
S 1	HLA-A*02, A*03, B*07, Cw*07	+	-	-
S 2	HLA-A*02	+	-	-
S 3	HLA-A*02, C*07	+	+	-
S 4	HLA-A*02	+	n.t.	n.t.
S 5	HLA-A*02, A*03, B*07	+	-	-
S 6	HLA-A*02, Cw*07	+	-	-
S 7	HLA-A*03, B*07	+	+	-
S 8	HLA-A*02	+	-	-
S 9	HLA-A*02	+	n.t.	n.t.
S 10	HLA-A*02, Cw*07	?	-	-
S 11	HLA-A*02, A*03	+	-	-
S 12	HLA-A*02, B*07, Cw*07,	+	n.t.	-
S 13	HLA-A*03	?	+	n.t.
S 14	HLA-A*02, A*03	?	+	n.t.
S 15	HLA-A*02, A*03; B*07	?	-	n.t.

- = negativer Impf-, PPD- bzw. QuantiFERON Tets-Status
- + = positiver Impf-, PPD- bzw. QuantiFERON Tets-Status
- n.t. = nicht getestet
- ? = unbekannter Impfstatus

Alle ELISPOT-Ergebnisse sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst. Wie zu erkennen lösen die Peptide HVKPTGSAV, IYHPQQFVY, QLRYDGQIAV, GDAVTLHRI und RPGVPAAAA keine Immunreaktion in PPD-positiven bzw. BCG-geimpften Spendern in Form einer IFN $\gamma$ -Sekretion aus. Drei der HLA-Liganden (LLDAHIPQL, RVRGAVTGM und TVFDAIRAAK) induzieren IFN $\gamma$ -Sekretion (Abbildung 3.10).



**Abbildung 3.10: Beispiel eines ELISPOT-Ergebnisses.**

PBMCs aus sechs Spendern wurden über 12 Tage mit den obengenannten Peptiden als Pool stimuliert. Am Tag 13 erfolgte eine einmalige Restimulation mit den gleichen Peptiden, jedoch einzeln in den jeweiligen aufgezeigten Wells und in Doppelbestimmung. PHA diene als Positiv-Kontrolle. Med. = Medium. DMSO und Medium dienten als Negativkontrollen. S1, S2, S3, S4, S6 und S8 sind Spender mit einer BCG-Impfung.

**Tabelle 3.9: Zusammenfassung der *Screening*-Ergebnisse im ELISPOT mit den eluierten HLA-Liganden.**

Spender	Ligand-Kandidaten							
	HVKPTGSAV	IYHPQQFVY	RVRGAVTGM	LLDAHIPQL	TVFDAIRAAK	QLRYDGQIAV	GDAVTLHRI	RPGVPAAAA
<b>S 1</b>	-	-	+	++	-	-	-	-
<b>S 2</b>	-	x	-	+++	x	-	-	x
<b>S 3</b>	-	-	-	+++	x	-	-	x
<b>S 4</b>	-	x	-	-	x	-	-	x
<b>S 5</b>	-	x	-	-	+	-	-	-
<b>S 6</b>	-	-	-	++	x	-	-	x
<b>S 7</b>	x	x	x	x	x	x	-	-
<b>S 8</b>	-	x	++	-	x	-	-	x
<b>S 9</b>	-	-	-	+	x	-	-	x
<b>S 10</b>	-	x	-	+	-	-	-	x
<b>S 11</b>	-	-	+	++	-	-	-	-
<b>S 12</b>	x	x	x	x	-	x	-	x
<b>S 13</b>	-	x	-	-	-	-	-	x
<b>S 14</b>	-	-	+	++	-	-	-	-
<b>S15</b>	-	x	-	+++	-	-	-	-

Den Immunantworten wurde folgendes Beurteilungsschema auferlegt. Schwache Reaktion (+) bedeutet weniger als 100 Spots auf  $3 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^5$  PBMCs. 100-200 Spots auf  $3 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^5$  T-Zellen bedeutete mittlere Reaktion (++) . Starke Reaktion auf das Peptid bedeutet mehr als 200 Spots auf  $3 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^5$  PBMCs (+++).

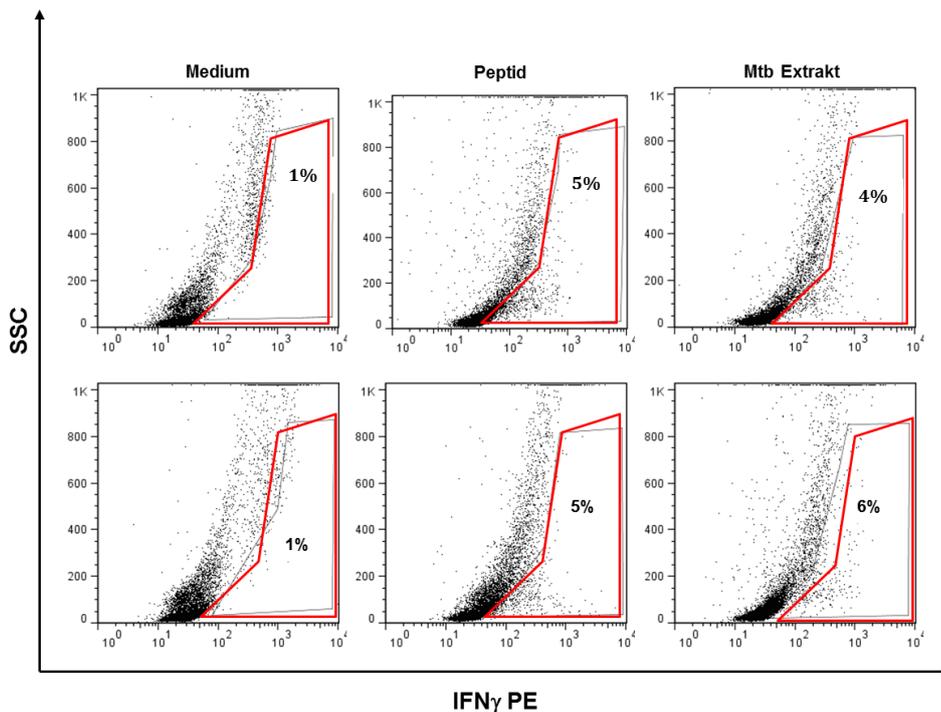
- = Keine Reaktion auf das getestete Peptid..

x = kein passendes HLA-Motiv für die Testung der identifizierten Peptide

### **3.5.1.1 TVFDAIRAAK induziert eine IFN $\gamma$ -Antwort**

Einer der sieben getesteten Spender, mit HLA-A\*03-Typisierung, zeigt eine schwache Reaktion auf TVFDAIRAAK (Tabelle 3.9). TVFDAIRAAK ist das Peptid der Acetyl-CoA Synthetase. Es wurde von mit H37Rv infizierten Makrophagen eluiert und ist das einzige Peptid dieser Gruppe, welches eine Immunreaktion in Gedächtnis-T-Zellen auslöst.

Daneben konnte in Ulm auch eine Reaktion in zwei von drei PPD-positiven Spendern beobachtet werden. Die PBMCs wurden nach dem gleichen Protokoll von Martin Busch stimuliert. Am Tag 13 erfolgte noch eine 6-stündige Restimulation mit TVFDAIRAAK in Anwesenheit von Brefeldin A. Die reaktiven Zellen wurden anschließend mit einer intrazellulären IFN $\gamma$ -Färbung sichtbar gemacht. Wie man in Abbildung 3.11 erkennt sind 5% der PBMCs IFN $\gamma$ -positiv. Die Reaktion ist von gleicher Stärke wie die Reaktion der Positiv-Kontrolle (Mtb-Extrakt). Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit durch T-Zell-spezifische Immunantwort TVFDAIRAAK als natürlich prozessierter HLA-Ligand und als T-Zell-Epitop identifiziert werden, was den Schluss zulässt, dass es sich bei der Acetyl-CoA-Synthetase um ein durch diese Arbeit erstmalig identifiziertes Antigen handelt.



**Abbildung 3.11: Intrazelluläre Färbung von PBMCs von PPD-positiven Spendern nach Stimulation mit TVFDAIRAAK.**

Die PBMCs von PPD-positiven Spendern wurden über 12 Tage stimuliert. Am Tag 13 wurden die PBMCs nochmals 6 h mit Brefeldin A und Peptid restimuliert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit IFN $\gamma$ -PE nach einem Membran-permeabilisierenden Schritt. Medium diente als Negativ- und die Stimulation mit Mtb-Extrakt als Positivkontrolle. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Martin Busch und Steffen Stenger von der Universität Ulm, Abteilung für Medizinische Medizin, bereitgestellt.

### 3.5.1.2 RVRGAVTGM induziert eine IFN $\gamma$ Antwort

Der andere HLA-Ligand mit einer aktivierenden Reaktion auf Gedächtnis-T-Zellen ist RVRGAVTGM (Tabelle 3.9, Abbildung 3.10). RVRGAVTGM stammt von dem Antigen 85A und wurde von B-LCLs eluiert, die mit MVA-TBF bzw. MVA-Ag85A infiziert wurden. Fünf der 13 HLA-A\*02-Spender ( $\sim 30\%$ ) reagieren mit einer schwachen (weniger als 100 IFN $\gamma$ -Spots auf  $3 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^5$  T-Zellen) bis mittleren (100–200 IFN $\gamma$ -Spots auf  $3 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^5$  T-Zellen) IFN $\gamma$ -Sekretion nach 13 Tagen Amplifikation mit diesem Peptid. Die PBMCs von drei dieser Spender zeigen ebenfalls eine Reaktion auf die Stimulation mit LLDAHIPQL (siehe Tabelle 3.9).

RVRGAVTGM ist ein HLA-A\*02-Ligand aus Ag85A und fällt mit seiner niedrigen Score (15 Punkte) im SYFPEITHI-Epitop-Vorsage Programm auf ([www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)). Zusätzlich zeichnet es sich mit einer niedrigen bzw. nicht nachweisbaren Bindekapazität an das HLA-A\*02-Molekül aus (siehe Kapitel 3.4). Die eigenen Versuche, das

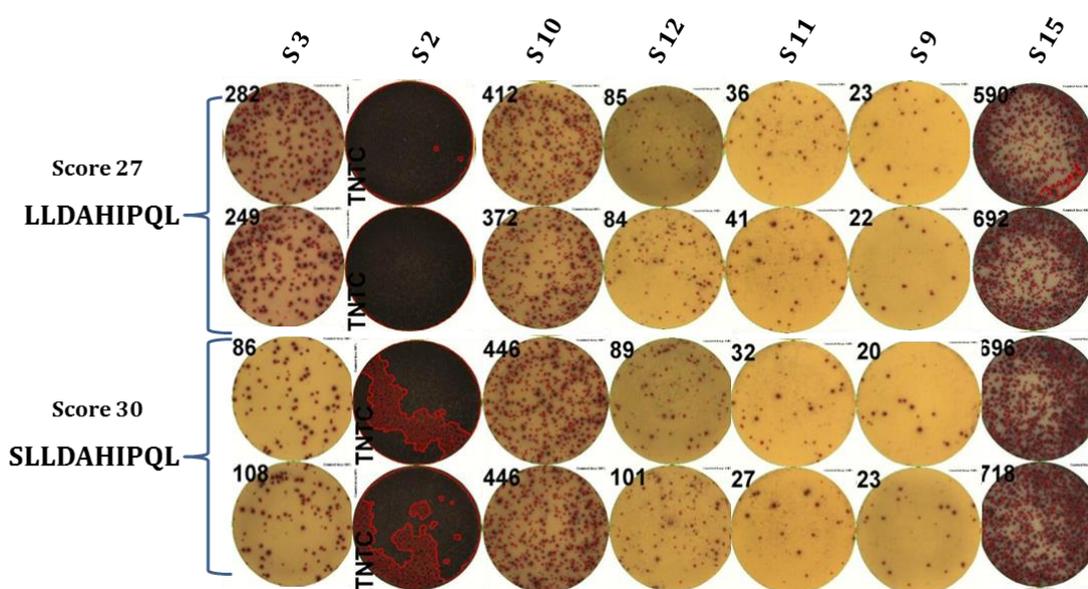
HLA-A\*02:01-Tetramer mit RVRGAVTGM herzustellen scheiterten. Anfangs ist dieses Peptid nicht der perfekte Kandidat, wenn man die Strategie der reversen Immunologie zur Identifizierung von Liganden durch Vorhersage und MHC-Bindungsassays anwendet. Eigentlich handelt es sich hier sogar um ein Epitop, das eine IFN $\gamma$ -Immunantwort auslöst. Da dieses Epitop von B-LCLs isoliert wurde, konnte es auch ein HLA-B\*07 oder HLA-C\*07 Ligand sein. Jedoch wurde eine Immunreaktion der Spender-Zellen (S8) auf dieses Peptid beobachtet. S8 exprimiert nur HLA-A\*02, jedoch kein HLA-B\*07 bzw. HLA-C\*07, somit sollte RVRGAVTGM HLA-A\*02-restringiert sein. Grundsätzlich konnte in dieser Arbeit RVRGAVTGM als natürlich prozessierter HLA-Ligand mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse und als Epitop durch T-Zell-spezifische Immunantwort identifiziert werden.

### **3.5.1.3 LLDAHIQPL induziert eine IFN $\gamma$ -Antwort**

Der HLA-Ligand, welcher am stärksten und am häufigsten eine IFN $\gamma$ -Sekretion in einem ELISPOT-Assay induziert, ist das Peptid des Proteins TB9.8. Es wurde schon vorher beschrieben, dass es eine Immunreaktion in PBMCs von Personen mit einer aktiven oder latenten Infektion mit Mtb auslöst (Lewinsohn et al. 2007). Auch im Rahmen dieser Arbeit kann die Aktivierung von Gedächtnis-T-Zellen von Spendern mit einer BCG-Impfung bzw. PPD-positivem Status mit dem Peptid LLDAHIPQL beobachtet werden (Tabelle 3.9). Im Gegensatz zu den anderen zwei Liganden scheint LLDAHIPQL ein stark immunogenes Peptid zu sein. Neun der 13 Spender-T-Zellen mit HLA-A\*02-Typisierung reagierten mit einer IFN $\gamma$ -Sekretion auf das Peptid, das sind ca. 70% der Spender. Bei vier Spendern handelt es sich um eine starke Immunreaktion (mehr als 200 IFN $\gamma$ -Spots auf  $3 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^5$  T-Zellen). Drei der T-Zell-Spender reagieren mittelmäßig (100–200 IFN $\gamma$ -Spots auf  $3 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^5$  T-Zellen) auf das Peptid und die restlichen mit einer schwachen (weniger als 100 IFN $\gamma$ -Spots auf  $3 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^5$  T-Zellen) IFN $\gamma$ -Sekretion. Wie vorher erwähnt reagieren die PBMCs von vier Spendern zusätzlich schwach auf das Ag85A-Peptid RVRGAVTGM.

Das Peptid aus TB9.8 ist sehr affin zum HLA-A\*02-Molekül und induziert eine Immunreaktion in den Gedächtnis-T-Zellen von neun Spendern. In der Datenbank SYFPEITHI erreicht LLDAHIPQL einen *Score* von 27. Diese Bewertungs-Punktzahl vermittelt einen Eindruck der Affinität eines Peptids zu einem HLA-Molekül anhand seiner Ankeraminoacidsäuren. Jedoch gibt es eine Längenvariante von LLDAHIPQL, welche einen noch höheren *Score* erreicht, und zwar SLLDAHIPQL (*Score* 30). SLLDAHIPQL ist laut der *in silico*-Vorhersage für HLA-A\*02 theoretisch das am stärksten bindende Peptid des

Proteins TB9.8 ([www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)). Nachdem SLLDAHIPQL synthetisch hergestellt wurde, wurde es auch in ELISPOT-Versuchen auf seine Fähigkeit IFN $\gamma$ -Sekretion auszulösen untersucht. In Abbildung 3.12 ist SLLDAHIPQL auch fähig eine Immunreaktion in den Gedächtnis-T-Zellen von BCG-geimpften und PPD-positiven Spendern auszulösen. Die Reaktion scheint ähnlich stark wie bei LLDAHIPQL zu sein, wobei es Spender spezifische Unterschiede gibt (S3).



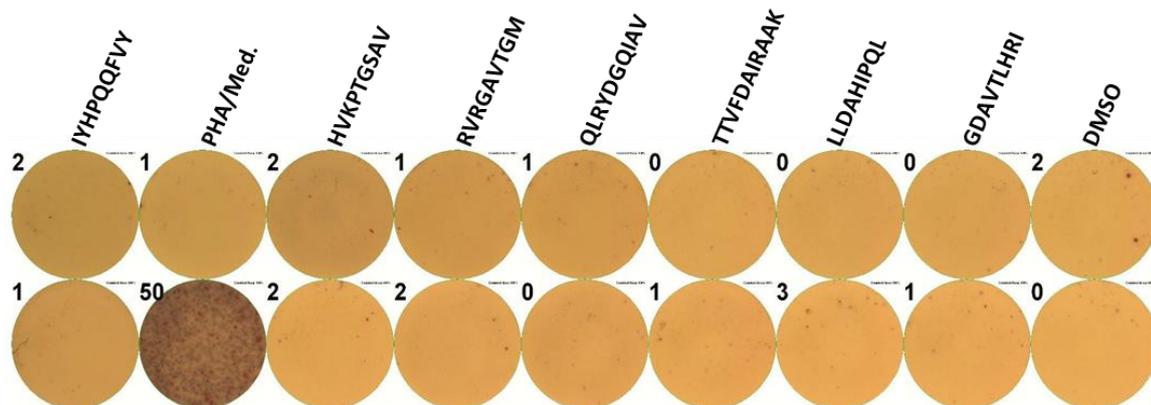
**Abbildung 3.12: ELISPOT-Ergebnisse nach der Stimulation mit dem Peptid LLDAHIPQL und seiner Längervariante SLLDAHIPQL.**

PBMCs von sieben Spendern wurden über 12 Tage mit den obengenannten Peptiden stimuliert. Am Tag 13 erfolgte eine Restimulation mit den gleichen Peptiden in Doppelansätzen. PHA diente als Positivkontrolle. Med. = Medium. DMSO und Medium dienten als Negativkontrollen. Score 27 bzw. 30 wurden vom SYFPEITHI-Vorhersageprogramm für das jeweilige Peptid vergeben. Wie zu erkennen sind die Immunreaktion der T-Gedächtniszellen ähnlich stark.

### 3.5.2 Testen der HLA-Liganden auf Reaktion bei gesunden und nicht-geimpften Spendern

Um auszuschließen, dass die IFN $\gamma$ -Antworten auf die getesteten Peptide keine unspezifischen Reaktionen sind, wurden die PBMCs von Negativ-Spendern im ELISPOT untersucht. Bei den Negativ-Spendern handelt es sich um Personen ohne BCG-Impfung, mit negativem PPD-Status und negativem Resultat des QuantiFERON®-Tb-Tests. Somit soll auch ausgeschlossen werden, dass die ausgesuchten Probanden im Laufe ihres Lebens Kontakt

mit Mtb hatten. PBMCs von zwei Spendern mit HLA-A\*02- und A\*03-Typisierung wurden über 13 Tage mit Peptiden amplifiziert und die IFN $\gamma$ -Sekretion im ELISPOT beobachtet. Keiner der getesteten HLA-Liganden aus Mtb induziert eine Immunreaktion in den Zellen von nicht geimpften und gesunden Spendern (Abbildung 3.13). Somit handelt es sich bei den Reaktionen auf mykobakterielle Epitope um spezifische Reaktion auf mykobakterielle Antigene.



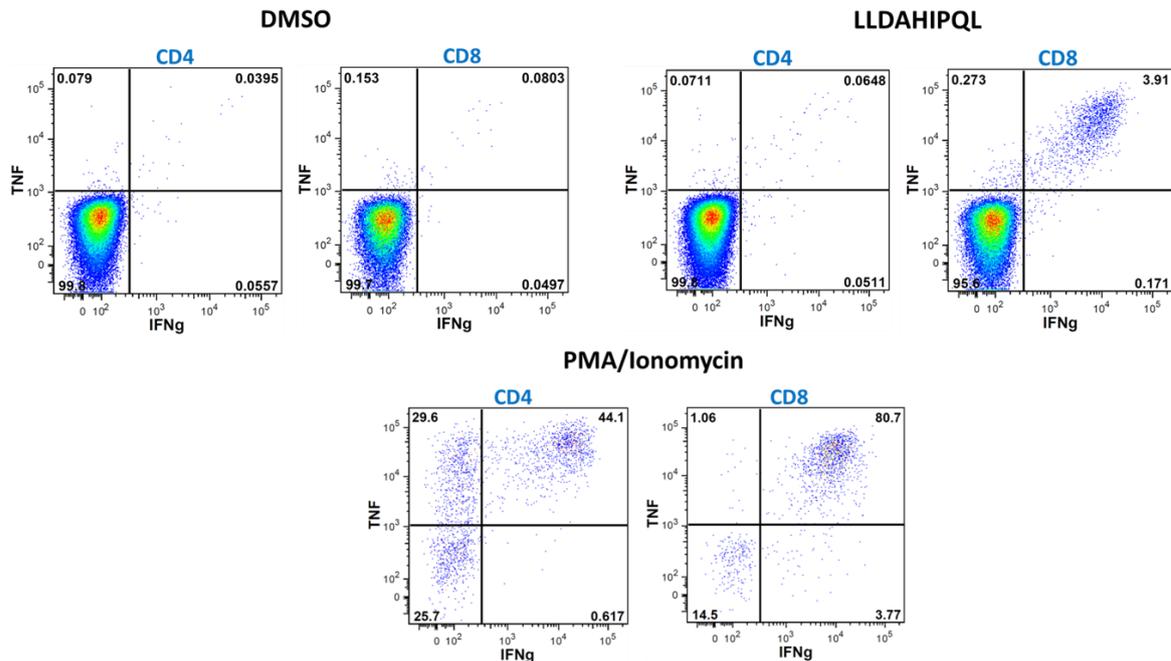
**Abbildung 3.13: Beispiel eines ELISPOT-Ergebnisses mit einem Negativ-Spender.**

PBMCs vom Negativ-Spender wurde über 12 Tage mit den obengenannten Peptiden als Pool stimuliert. Am Tag 13 erfolgte Restimulation mit den gleichen Peptiden, jedoch einzeln in den jeweiligen aufgezeigten Wells und in Doppelansätzen. PHA diente als Positivkontrolle. Med. = Medium. DMSO und Medium dienten hier als Negativkontrollen. Negativ-Spender bedeutet: Personen ohne BCG-Impfung und ohne vorherigen Kontakt mit Mtb.

### 3.5.3 Charakterisierung der beobachteten Immunreaktionen

Bei den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten HLA-Liganden handelt es sich um MHC Klasse I-Peptide. Um sicher zu stellen, dass es sich bei den oben gesehenen Immunreaktionen um eine CD8 T-Zell-Antwort handelt, wurden die PBMCs von ausgewählten Spendern (S1, S2, S3, S5 und S8) nach 13 Tagen Peptid-Stimulation einer intrazellulären FACS-Färbung auf IFN $\gamma$  unterzogen. Bei den zu testenden Peptiden handelte es sich um LLDAHIPQL, RVRGAVTGM und TVFDAIRAAK.

Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, handelt es sich bei der T-Zellantwort nach Stimulation mit LLDAHIPQL um eine CD8-vermittelte T-Zell-Antwort. Knapp 4% der lebenden PBMCs sind IFN $\gamma$ - und CD8-positiv. Keine der CD4-positiven Zellen produziert nach der Stimulation mit LLDAHIPLQ IFN $\gamma$ .



**Abbildung 3.14: Intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung nach der Stimulation mit LLD4HIPQL.**

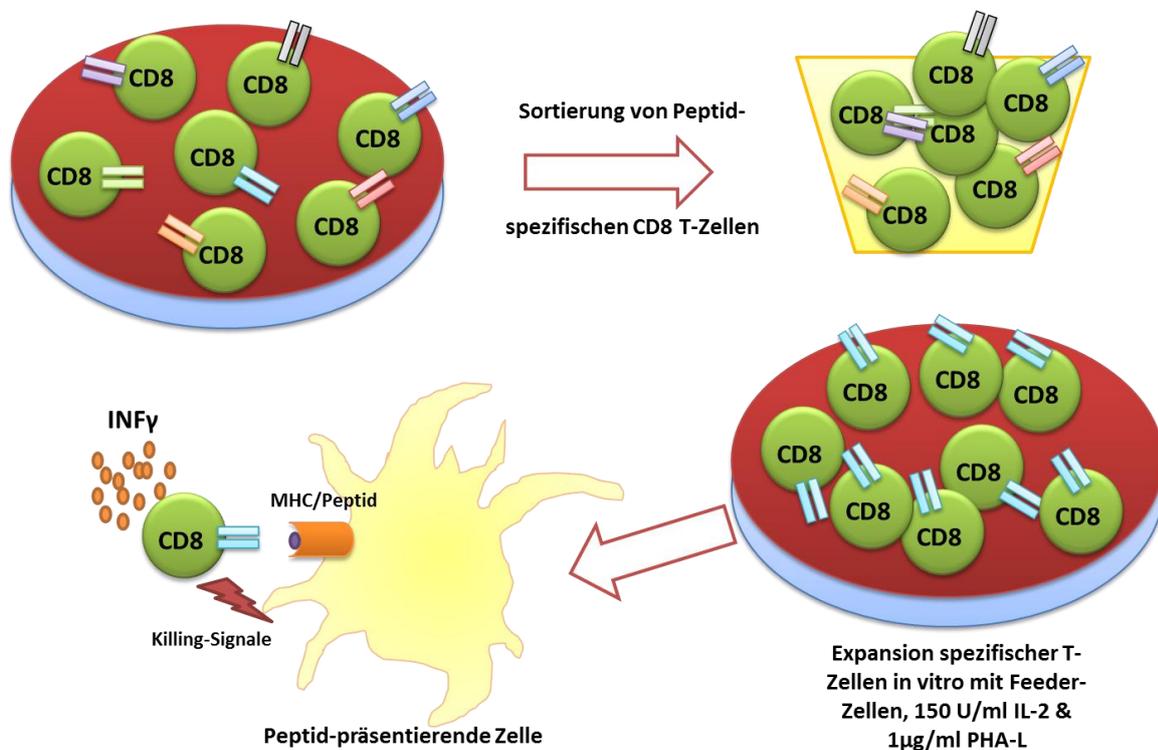
PBMCs des Spenders (S2) wurden über 12 Tage mit dem Peptid LLD4HIPQL stimuliert. Am Tag 13 erfolgte Restimulation mit dem gleichen Peptid in Anwesenheit von Brefeldin A. Die PBMCs wurden mit den extrazellulären Markern CD4 und CD8 angefärbt. Dann wurden die Zellen permeabilisiert und zuletzt mit IFN $\gamma$  gefärbt. Die T-Zellen wurden wie folgt sortiert: PBMCs und dann lebende Zellen. PMA/Ionomycin diente als Positivkontrolle, DMSO als Negativkontrolle. Wie in der Abbildung zu erkennen, handelt es sich bei der Immunantwort um eine CD8-restringierte Antwort.

Die Reaktionen von RVRGAVTGM und TVFDAIRAAK wurden auch durch ICS untersucht. Jedoch war die Frequenz der IFN $\gamma$ -positiven Zellen nach der Amplifikation so niedrig, dass keine IFN $\gamma$ -positiven Zellen im FACS zu messen waren (Daten nicht gezeigt). Generell konnten IFN $\gamma$ -positive Zellen gegen LLD4HIPQL nur bei Spender S2 beobachtet werden. Die anderen Spender enthielten weniger an spezifischen Gedächtnis-T-Zellen, die IFN $\gamma$  produzieren und visuell erfasst werden konnten. Das Epitop SLLD4HIPQL wurde in diesem Testsystem nicht untersucht. Da es aber ähnliche ELISPOT-Ergebnisse lieferte, könnte man annehmen, dass es auch in den ICS-Versuchen gleiche Resultate erzielen würde.

### 3.6 Biologische Funktionalität des Epitops LLDAHIPQL

Mit dem Grundgedanken, dass eines der isolierten Epitope als zukünftiger Kandidat für eine Vakzinierung dienen könnte, wurde die biologische Relevanz dieser Epitope untersucht. Die Idee war Epitop-spezifische Klone bzw. Zelllinien zu gewinnen. Anschließend sollte ihre Fähigkeit Zytokine zu sezernieren und die Epitop-präsentierenden Zellen zu erkennen und zu lysieren untersucht werden.

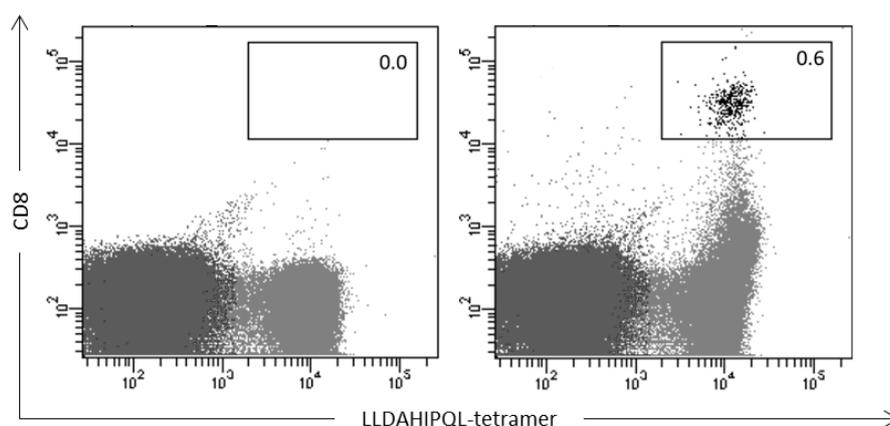
Die Isolation von Epitop-spezifischen Klonen bzw. Populationen wurde mittels durchflusszytometrischer Sortierung nach einer CD8- und Tetramer-Färbung durchgeführt (Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der Isolierung Epitop-spezifischer CD8-Zelllinien und deren biologische Relevanz auf Epitop-präsentierende Zellen.**

Die T-Zellen werden nach dem Standard-ELISPOT Protokoll mit dem Peptid der Wahl stimuliert. Am Tag 13 erfolgt die Sortierung von Tetramer-spezifischen CD8-T-Zellen mit Hilfe von MACS oder Durchflusszytometrie. Die isolierten Zellen werden mit Hilfe von Feeder-Zellen, IL-2 und PHA-L amplifiziert. Die Bestimmung der Funktionalität der Zell-Populationen erfolgt anhand der Zytokin-Expression und/oder der Lyse von Peptid-präsentierenden Zellen. Die Grafik wurde zum Teil von C. Kyzirakos übernommen (Kyzirakos Christina 2013).

Vor der Isolation von Tetramer-spezifischen Zellen wurde mit Hilfe von PE-konjugierten HLA-Tetrameren die Frequenz von CD8 T-Zellen ermittelt. Nach 13 Tagen Amplifikation mit dem Ligand LLDAHPQL wurden PBMCs von Spender 2 (S2) mit LLDAHIPQL-Tetramer angefärbt. 0,6% der PBMCs sind CD8 T-Zellen und haben eine LLDAHIPQL-Spezifität (siehe Abbildung 3.16). Keine Tetramer-positiven T-Zellen konnten nach der Stimulation mit dem RVRGAVTGM ermittelt werden. Das Peptid RVRGAVTGM wurde hier als Negativ-Peptid gewählt, da der Spender S2 keine Zytokinantwort nach der Stimulation mit diesem Peptid gezeigt hat (Tabelle 3.9).



**Abbildung 3.16: Ermittlung der Frequenz von LLDAHIPQL-spezifischen Zellen mit Hilfe eines LLDAHIPQL-Tetramers.**

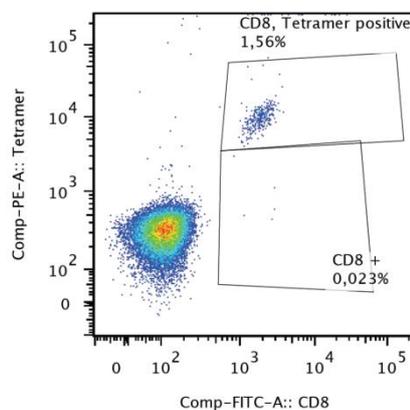
Der Spender (S2) wurde über 12 Tage mit dem Peptid LLDAHIPQL amplifiziert. Die PBMCs wurden zuerst mit extrazellulärem Antikörper gegen CD8 und dann mit Tetramer angefärbt. Das *Gate* wurde zuerst auf PBMCs und dann auf lebende Zellen gelegt. Linker *Dot Plot*: Zellen wurden mit RVRGAVTGM als Negativ-Peptid stimuliert. Rechter *Dot Plot*: Zellen wurden mit LLDAHIPQL stimuliert.

Zur Isolierung der LLDAHIPQL-spezifischer T-Zelllinien wurden die PBMCs von S2 mit dem Peptid LLDAHIPQL amplifiziert und am Tag 13 mit LLDAHIPQL-Tetramer und mit anti-CD8-Antikörper angefärbt. Auf diesem Wege wurden 20 96-Well-Platten mit dem Zell-Sorter FACS Aria gewonnen. 10 Platten enthielten je eine Zelle pro Well und 10 Platten je drei Zellen pro Well. Die restlichen Zellen (1000 Zellen) wurden in einem 15 ml-Röhrchen gesammelt und komplett auf eine 96-Well-Platte verteilt (ca. 10 Zellen pro Well).

Leider konnten keine TVFDAIRAAK- und RVRGAVTGM-spezifischen Zelllinien generiert werden. Von dem Peptid RVRGAVTGM konnte kein Tetramer hergestellt werden und für eine IFN $\gamma$ -*Capture*-Sortierung waren die Zellen in nicht ausreichender Anzahl vorhanden, da

schon in der intrazellulären Färbung keine CD8 und IFN $\gamma$  positiven T-Zellen detektiert werden konnten. TVFDAIRAAK-spezifische Zellen konnten auch nicht generiert werden. Es konnten zwar Tetramere mit diesem Peptid hergestellt werden, jedoch gab es keine Spender mit einer starken T-Zell-Gedächtnis-Antwort um eine angemessene Anzahl an Tetramer-positiven Zellen zu gewinnen.

Die sich vermehrenden Tetramer-positiven Zellen wurden mit Peptid und IL-2 stimuliert und mittels Tetramer-Färbung auf ihre Peptidspezifität getestet (Abbildung 3.17). Das Peptid RVRGAVTGM diente wieder als Negativ-Peptid. 138 LLDAHIPQL-T-Zelllinien sind angewachsen. Die meisten waren aus dem *Bulk*, die wenigsten anwachsenden Klone wurden aus der Sortierung Eine-Zelle-pro-Well gewonnen. Die anwachsenden Tetramer-positiven T-Zellen wurden anschließend auf ihre Spezifität überprüft. Erfahrungsgemäß verlieren die Klon-Populationen nach längerer Kultivierung und Re-Stimulation mit IL-2 ihre Spezifität. Nach dem Tetramer-Screening wurden nur 17 LLDAHIPLQL-spezifische Zelllinien zur weiteren Aufzucht behalten und der Rest verworfen. Die meisten spezifischen Zellen wurden aus den Platten mit drei Zellen pro Well beobachtet.

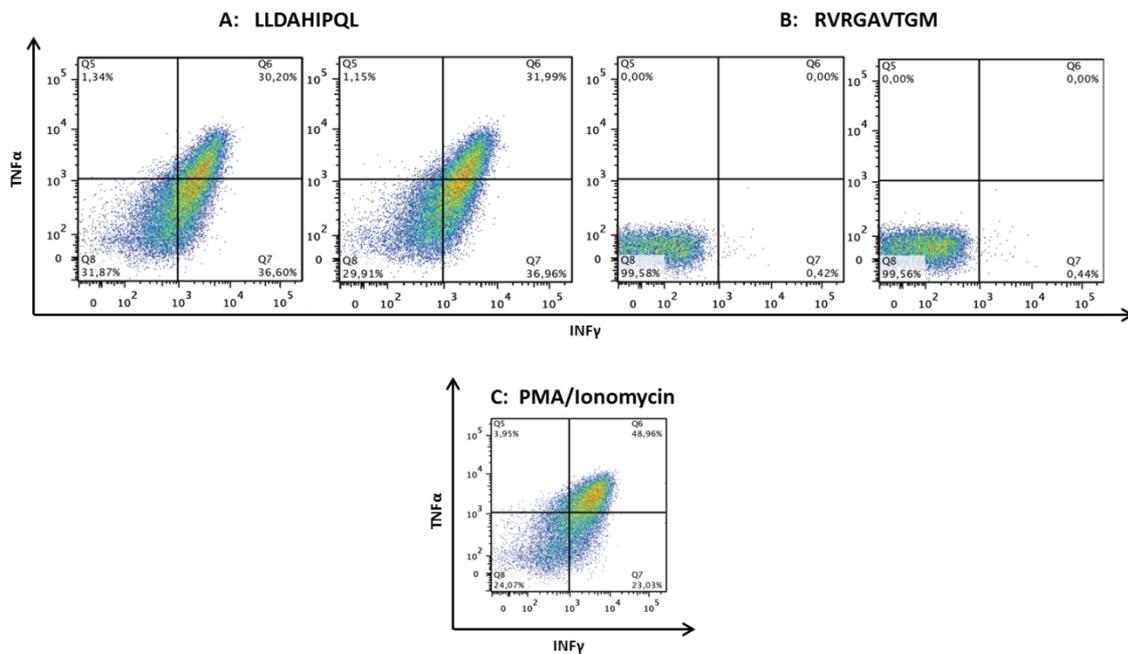


**Abbildung 3.17: Darstellung einer LLDAHIPQL-Tetramer-spezifischen CD8-Zelllinie.**

Beispielhaft ist eine Tetramer-positive Zelllinie nach der LLDAHIPQL-Tetramer Färbung dargestellt. Y-Achse Tetramer-positive Zellen. X-Achse: CD8 positive T-Zellen. Das *Gate* wurde in folgender Reihenfolge gesetzt: PBMCs, Lebend-Zellen, CD8 positive Zellen. Zu erkennen ist eine Population (1,56%) von Tetramer- und CD8-positiven Zellen nach der FACS-Sortierung.

Die getesteten Tetramer-positiven CD8-Zellen wurden dann weiteren Tests unterzogen. Das Interesse bestand darin, ob die Tetramer-positiven CD8-Zellen ihre immunologische

Funktion ausüben können indem sie zum Beispiel IFN $\gamma$ , andere Zytokine und stimulatorische Faktoren exprimieren. CD107a ist ein Degranulations-Marker, welcher auf CD8 T-Zellen nach deren Aktivierung exprimiert wird und mit einer zytotoxischer Aktivität assoziiert ist (Betts et al. 2003; Betts & Koup 2004). MIP-1 $\beta$  ist ein Immunmediator, welcher auf T-Lymphozyten chemotaktisch wirkt (Taub et al. 1993; Schall et al. 1993). 14 der Klon- Populationen wurden auf Grund der geringen Zellzahl nur auf die Sekretion von TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Expression untersucht. Die anderen drei Zelllinien untersuchte man, wegen einer größeren Zellzahl, neben der Sekretion von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  auch auf IL-2, MIP-1 $\beta$  und CD107a. In Abbildung 3.18 ist ein Beispiel für die intrazelluläre Färbung einer Tetramer-positiven Zelllinie zu sehen. Als Negativ-Peptid wurde wieder RVRGAVTGM benutzt da der Spender (S2) keine T-Gedächtnis-T-Zellen gegen diesen Ligand hat (siehe Tabelle 3.9). Wie zu erkennen ist, ist LLDAHIPQL in der Lage die TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Expression nach erneuter Stimulation auszulösen. Ob die Zellen noch weitere Zytokine, wie IL-2, den Degranulationsmarker CD107a und das Chemokin MIP-1 $\beta$  produzieren können, ist unklar. Vor der eigentlichen FACS-Färbung wurde die Zellzahl mit Augenmaß bestimmt, letztendlich war die Anzahl an ausgesuchten Zellen gering und diese konnten im FACS nach der Färbung von CD107a, IL-2 und MIP-1 $\beta$  nicht detektiert werden. Auch möglich wäre es, dass ein großer Verlust der Zellen während der intrazellulären Färbung aufgetreten ist, die in der FACS-Analyse keiner eindeutigen Population zugeordnet werden konnten. Generell wurden keine 100.000 Zellen in diesem Assay gezählt.



**Abbildung 3.18: Beispiel einer intrazellulären Färbung einer LLDAHIPQL-spezifischen Zelllinie nach Stimulation.**

Die Zellen wurden über Nacht mit dem Peptid LLDAHIPQL in Anwesenheit von Brefeldin A stimuliert. Anschließend erfolgte eine intrazelluläre Färbung auf INF $\gamma$  und TNF $\alpha$  nach einem Permeabilisationsschritt. Die Zellen wurden in Doppelbestimmung gemessen. A: zeigt die Stimulation der Zellen mit LLDAHIPQL. B: Zellen, die mit dem Peptid RVRGAVTGM als Negativ-Kontrolle stimuliert wurden. PMA/Ionomycin diente als Positiv-Kontrolle (C).

Neben der FACS-vermittelten Sortierung von Tetramer-spezifischen Zellen wurde zudem auch der Versuch unternommen LLDAHIPQL-spezifische CD8 T-Zellen mit magnetunterstützter Zellseparation (MACS: *magnetic activated cell sorting*) zu isolieren. Anbei wurden zuerst alle CD8 T-Zellen über positive Selektion an die MACS-Säulen gebunden und eluiert. Anschließend konnte man aus diesem Pool wiederum über positive Selektion Tetramer-positiv CD8 Zellen isolieren. Die Spenderzellen wurden vor der MACS-Separation über 13 Tage mit Peptid amplifiziert.

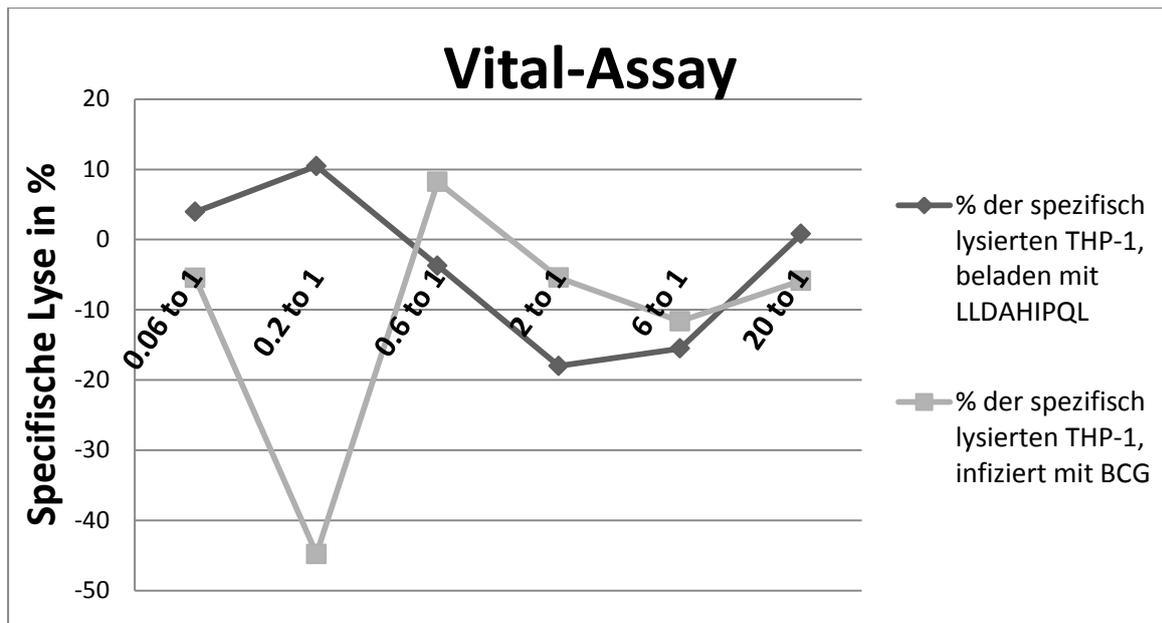
Die isolierten Zellen wurden mehrere Wochen als Pool mit PHA-L und IL-2 restimuliert. Wie bei den nach der FACS Sortierung gewonnenen Zellen wurden auch diese mit Tetramer gefärbt um ihre Spezifität zu überprüfen. Bedauerlicherweise waren keine LLDAHIPQL-spezifischen Zellen in der Kultur vorhanden (Daten nicht gezeigt). Letztendlich konnten keine weiteren Untersuchungen zur biologischen Relevanz der MACS-sortierten Zelllinie gemacht werden.

### 3.6.1 Untersuchung der Zytotoxizität von LLDAHIPQL-spezifischen CD8 T-Zellen gegen peptidbeladenen bzw. Epitop-präsentierenden Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die LLDAHIPQL-spezifischen Zellen immunologisch relevante Zytokine wie IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  nach erneuter Stimulation mit dem Epitop sekretieren, bestand das Interesse zu untersuchen, ob die LLDAHIPQL-spezifischen CD8 T-Zellen peptidbeladenen Zellen bzw. infizierte Zellen lysieren können. Als Zielzellen (*Targets*) wurden THP-1 ausgewählt. Dabei handelt es sich wie bei Makrophagen um eine Monozytenzelllinie, die jedoch immortalisiert ist. Wegen der geringen Zellzahl wurde eine modifizierte Version des *Vital Assay* von Hermans durchgeführt (Hermans et al. 2004). In Vorexperimenten wurde die optimale Farbstoffkonzentration bestimmt. Für unbehandelte Zellen wurde Far Red in einer Konzentration von 2,5  $\mu$ M und für Peptid-beladene bzw. für infizierte Zellen von 0,5  $\mu$ M CFSE eingestellt (nicht gezeigt). Die Peptidbeladung erfolgte einen Tag vor dem eigentlichen Experiment mit 10  $\mu$ g/ml Peptid. Die Infektion von THP-1 mit BCG wurde dem Protokoll aus Ulm angepasst, was bedeutete die Zellen wurden mit dem Impfstamm BCG mit MOI5 über drei Tage inkubiert. Der BCG-Stamm wurde anstatt H37Rv benutzt da für die Arbeit mit H37Rv ein S3-Labor nötig ist.

Der *Vital Assay* konnte leider mit dem oben gezeigten Zelllinie CK8 (Abbildung 3.18) wegen der geringen Zellzahl nicht durchgeführt werden. Bedauerlicherweise haben alle Populationen nach mehreren Stimulationszyklen ihre Proliferation eingestellt, möglicherweise aufgrund von Überreizung durch wöchentliche Restimulationen mit IL-2. Es wurden keine  $1 \cdot 10^5$  Zellen gezählt.

Bei einer anderen Zelllinie, CK17, konnte eine halbe Million Zellen isoliert werden, die in dem Assay mit dem höchsten *Effektor zu Target* Verhältnis von 20:1 verwendet wurden. Eine Hälfte der Zellen wurde mit THP-1, die über Nacht Peptid-beladen wurden, inkubiert. Der andere Teil der Zellen mit wurde mit THP-1, die über drei Tage mit BCG infiziert waren, stimuliert. Nach 16 h Ko-Inkubation mit peptidbeladenen oder infizierten THP-1 konnte jedoch keine Zell-spezifische Lyse beobachtet werden (Abbildung 3.19). Generell gab es keine Korrelation der Lyse zum Effektor-zu-Target Verhältnis.



**Abbildung 3.19: Auswertung des Vital-Assay mit der Zelllinie CK17.**

Als Zielzellen dienten THP-1 beladen mit LLDHAIPQL (10 µg/ml über Nacht) und THP-1 infiziert mit BCG (MOI5, 3 Tage). Die Effektor-zu-Target Raten reichten von 20:1 bis 0,06:1. Nach Ko-Inkubation über Nacht konnte keine Ratio-abhängige Lyse der Zielzellen beobachtet werden.

Aus der Zelllinie CK14 konnten knapp eine Viertel Million Zellen gewonnen werden, welcher auch im *Vital-Assay* verwendet wurde. Auch bei CK14 wurde das höchste *Effektor-zu-Target* Verhältnis von 20:1 verwendet. Jedoch wurden hier die Zielzellen (*Targets*) nur über Nacht mit LLDHAIPQL beladen. Leider konnte auch diese Zellen keine Peptid-spezifische Zelllyse induzieren (keine Abbildung).

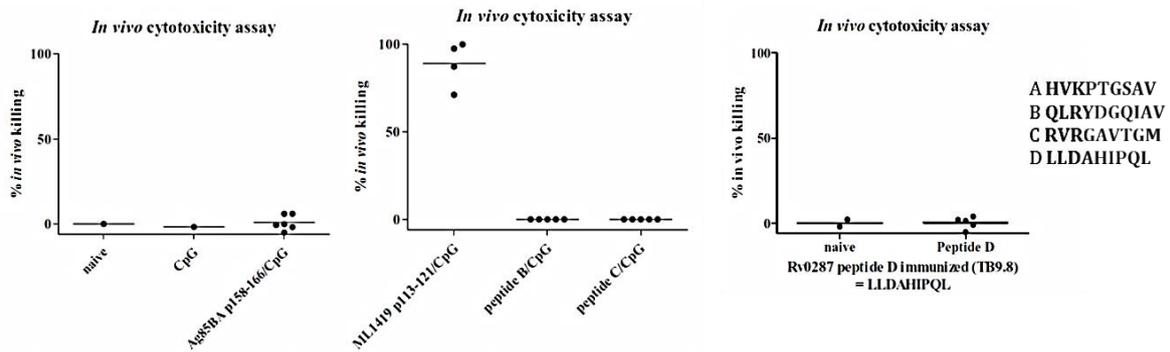
Dieses Phänomen des Funktions-Verlustes bei CD8-Klonen ist nicht unüblich, nach längerer Zeit der *in vitro* Restimulation verlieren die Zelllinien neben ihrer Spezifität auch ihre Funktionalität und reagieren auf keine Stimuli (Peptide) mehr (Beobachtungen aus dem Labor). Möglicherweise ist die fehlende Vermehrung die Folge der replikativen Seneszenz. Die replikative Seneszenz beschreibt die Tatsache, dass alle somatischen Zellen nach einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen aufhören zu proliferieren. Klonal expandierte T-Zellen hören nach 30 bis 40 Teilungen auf sich zu vermehren und dieser Arrest ist die Folge von immer kürzer werdenden Telomeren. Neben dem Verlust der Telomer-Längen tritt auch die verminderte Expression des Ko-Rezeptors CD28 ein (Vogt et al. 2003). Die T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung der Immunantwort nach dem Kontakt mit dem Antigen. CD28 ist ein Ko-Rezeptor, welcher die Zell-Proliferation, Anergie und Viabilität der T-Zellen reguliert (Collette et al. 1998). Falls die T-Zellen tatsächlich CD28 bzw. den TZR in

geringem Maße exprimieren, so kann die fehlende Peptid-spezifische Lyse der Zielzellen auf die fehlende Fähigkeit aktiviert zu werden, zurück zu führen sein.

### **3.6.2 *In vivo*-Untersuchungen der Zytotoxizität von Peptid-spezifischen T-Zellen in HLA-A\*02-transgenen Mäusen**

Um die immunologische bzw. schützende Wirkung der eluierten Peptide zu ermitteln, wurden die Peptide HLA-A\*02-transgenen Mäusen geimpft. Die Impf-Versuche wurden freundlicherweise in dem Medizinischen Institut an der Leiden Universität (LUMC) von Annemiek Geluk und ihrem Team durchgeführt. Die Mäuse wurden dreimal in zwei-Wochen-Intervallen mit jeweiligen HLA-A\*02-Nonanamer geimpft. Es wurde die zytotoxische Kapazität der T-Zellen aus geimpften Tieren untersucht, wie auch die T-Zellen geimpfter Tiere über eine intrazelluläre Färbung analysiert. Geimpft wurde mit dem Adjuvant CpG, einem DNA-Oligonukleotid, welches synthetisch hergestellt wird und einen relativ hohen Anteil an CpG-Motiven enthält.

Wie die Abbildung 3.20 erkennen lässt, konnte keine Lyse mit den hier identifizierten Peptiden beobachtet werden. Nach der sechs Wochen-Spanne mit dreimaliger Gabe einer Peptidimpfung mit dem Adjuvant CpG konnten keine Peptid-spezifischen T-Zellen in den jeweiligen Mäusen induziert werden, die wiederum peptidbeladene HLA-A\*02 Splenozyten lysieren können. Im Vergleich dazu erkennt man eine starke Lyse der Zielzellen, wenn man die Spender-Maus mit dem *M. leprae* Peptid ML1419 p113-121 mit CpG impft (Geluk et al. 2011). Eine 90-99% Lyse wurde beobachtet. CpG induziert allein keine Lyse, somit kann davon ausgegangen werden, dass alle zytotoxischen Effekte nicht auf das Adjuvant zurückzuführen sind.

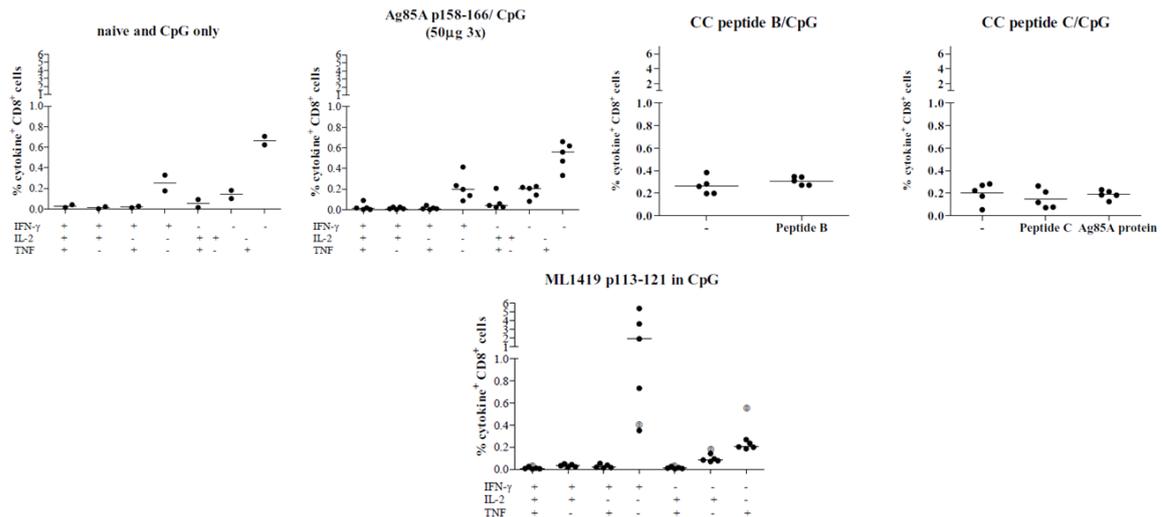


**Abbildung 3.20: Repräsentatives Ergebnis für die in vivo-Impf-Experimente mit HLA-A\*02-transgenen Mäusen.**

Die Mäuse wurden dreimal jede zweite Woche mit dem jeweiligen Peptid geimpft. Aus der Milz der Mäuse wurden anschließend T-Zellen isoliert und diese auf ihre Fähigkeit Peptid-beladene Splenozyten (HLA-A2tg) zu lysieren untersucht. Naive: T-Zellen aus Kontroll-Mäusen ohne jegliche Impfung. CpG: hier Adjuvant wurde mit dem Peptiden verabreicht. ML1419 p113-121/CpG diente in diesem Ansatz als Positiv-Peptid (Geluk et al. 2011). Die Versuche und die Abbildung wurden freundlicherweise von Annemiek Geluk und ihrem Team von der Universität Leiden durchgeführt bzw. bereitgestellt.

Als nächsten wurde überprüft ob die Impfung mit identifizierten HLA-A\*02-Peptiden spezifische Zytokin-produzierende Zellen induzieren kann. Die transgenen Mäuse wurden nach dem gleichen Protokoll wie vorher erwähnt geimpft. Nach der Impfung wurden den Tieren die Splenozyten abgenommen und *ex vivo* bzw. *in vitro* nach einer siebentägigen Restimulation mit dem jeweiligen Peptid einer intrazellulären Färbung unterzogen (Geluk et al. 2011).

Es konnten in diesem Versuch keine positiven Ergebnisse nach der Impfung mit den identifizierten HLA-A\*02-Peptiden beobachtet werden. Die Peptide HVKPTGSAV, QLRYDGQIAV oder RVRGAVTGM konnten keine Immunantwort in den vakzinieren Tieren in Form von IFN $\gamma$ -Produktion der Splenozyten auslösen. Im Vergleich dazu zeigt die intrazelluläre Färbung der Splenozyten, dass die Impfung mit dem *M. leprae*-Peptid ML1419 p113-121 IFN $\gamma$  produzierende Gedächtnis-T-Zellen induziert (Abbildung 3.21).

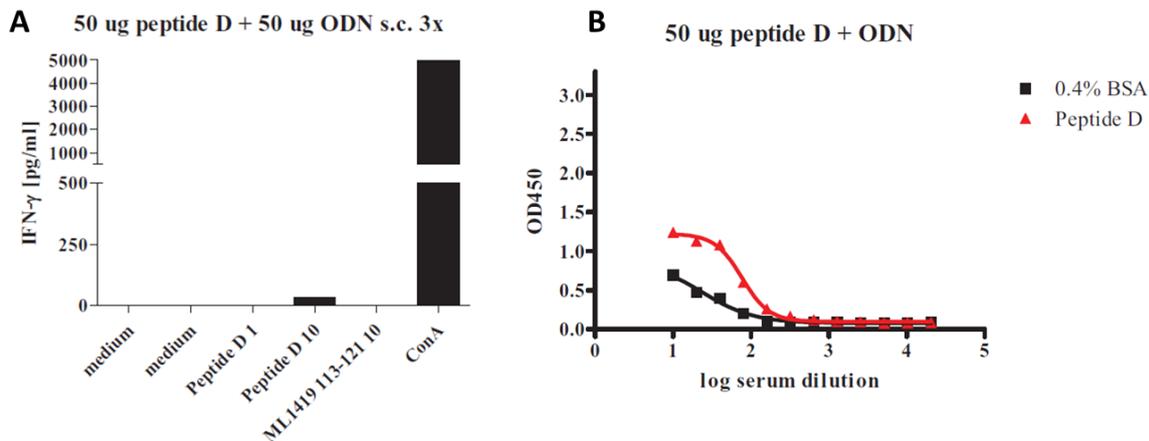


**Abbildung 3.21: Repräsentatives Ergebnis für die intrazelluläre Färbung der Zellen aus HLA A\*02-transgenen und Peptid-geimpften Mäusen.**

Die Mäuse wurden dreimal jede zweite Woche mit dem jeweiligen Peptid geimpft. Die PBMCs wurden auf ihre Fähigkeit verschiedene Zytokine (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-2) zu produzieren untersucht. Naive: T-Zellen aus Kontroll-Mäusen ohne jegliche Impfung. CpG: hier Adjuvant wurde mit dem Peptiden verabreicht. ML1419 p113-121/CpG diente in diesem Ansatz als Positiv-Peptid (Geluk et al. 2011). A: Ag85BA p158-166 ist das Peptid HVKPTGSAV. Peptid B: QLRYDGQIAV. Peptid C: RVRGAVTGM. Die Versuche und die Abbildung wurden freundlicherweise von Annemiek Geluk und ihrem Team von der Universität Leiden durchgeführt bzw. bereitgestellt.

Zusätzlich wurde untersucht ob die Splenozyten von mit LLDAHIPQL immunisierten Mäusen IFN $\gamma$  produzieren können. Nach weiteren 5 Tagen Restimulation der Zellen mit 1 und 10  $\mu$ g/ml Peptid konnte nur eine geringe IFN $\gamma$ -Sekretion im ELISA gemessen werden (Abbildung 3.22, A). Medium allein und das Peptid ML1419 113–121 als Negativ-Kontrollen induzieren keine IFN $\gamma$ -Produktion. ConA ein Mitogen (Positiv-Kontrolle) induziert eine sehr starke IFN $\gamma$ -Sekretion in den Splenozyten.

Weiterhin konnten Annemiek Geluk und ihr Team nach der Immunisierung von dem *M. leprae*-Peptid ML1419 p113-121 in den transgenen HLA-A\*02-Mäusen einen Antikörper-Titer gegen dieses Peptid beobachten (Geluk et al. 2011). Da dies auch der Fall für LLDAHIPQL sein könnte, wurde der Antikörper-Titer gegen LLDAHIPQL mit Hilfe eines Serum-ELISA bestimmt. Als Kontrolle diente in diesem Ansatz 0,4% BSA, gelöst in PBS. Es wurden keine nennenswerten Titer in den mit LLDAHIPQL vakzinierten Mäusen detektiert (Abbildung 3.22, B).



**Abbildung 3.22: Analyse der IFN $\gamma$ -Sekretion und Titer-Bestimmung von LLDAHIPQL-spezifischen Antikörpern der HLA-A\*02-transgenen Mäusen geimpft mit LLDAHIPQL.**

**A:** die Splenozyten der geimpften Mäuse wurden isoliert und über weitere 5 Tage mit LLDAHIPQL in den Konzentrationen 1 und 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  inkubiert. Das Mitogen Con A diente als Positiv- und das *M. leprae*-Peptid ML1419 113–121 als Negativ-Kontrolle. **B:** der Antikörper-Titer gegen das Peptid LLDAHIPQL wurde ermittelt. Als Affinitätskontrolle diente 0.4% BSA gelöst in PBS.

Bedauerlicherweise konnte keines der getesteten Peptide, die im Rahmen dieser Arbeit als natürlich prozessierte Liganden identifiziert wurden, eine spezifische Immunantwort in den HLA-A\*02 transgenen Mäusen induzieren. Es konnte keine Zytokin- bzw. Antikörper-Produktion oder eine Lyse von Peptid-beladenen Splenozyten beobachtet werden. Erwartungsgemäß wurde vermutet, dass zumindest LLDAHIPQL eine Immunantwort im Maus-Modell auslösen kann, nachdem dieses Peptid in mehr als der Hälfte der getesteten humanen PBMCs *in vitro* eine spezifische Antwort auslöst. Leider wurde hier nur ein Adjuvanz verwendet, womöglich konnte LLDAHIPQL nicht sein immunogenes Potential zusammen mit CpG ausnutzen. Oder die Präsentation mit dem transgenen MHC ist nicht optimal wie im humanen System, so dass entsprechend kein *Priming* der spezifischen T-Zellen in den Mäusen erfolgen konnte. Trotz der fehlenden Induktion der Immunantwort induziert LLDAHIPQL nach der Restimulation in humanen PBMCs eine spezifische Antwort und ist ein guter Kandidat für weitere Impf-Studien im humanen Modell.

Dass das Peptid RVRGAVTGM keine Immunantwort in transgenen Mäusen auslöst, ist nicht verwunderlich. Schon vorher konnte gezeigt werden, dass dieses Peptid nicht das HLA-A\*02-Molekül bindet (Abbildung 3.9), was bedeuten würde, RVRGAVTGM kann keine gebundenen Peptide im HLA-A\*02-Molekül-Komplex verdrängen und dessen Platz einnehmen um anschließend die T-Zellen zu aktivieren. Jedoch, in dem humanen Modell konnte gezeigt werden, dass das Ursprungs-Protein von RVRGAVTGM, Ag85A, erfolgreich prozessiert und präsentiert wird. Zusätzlich induziert es eine IFN $\gamma$ - Immunantwort in

T-Zellen von BCG-geimpften Probanden. Wie schon erwähnt, würde dieses Peptid wegen seiner niedrigen Wertung in der Epitop-Vorhersage (<http://www.syfpeithi.com/>) und augenscheinlich keiner Bindung an das HLA-A\*02 Molekül kaum Beachtung als möglicher Epitop-Kandidat auf sich ziehen. Jedoch handelt es sich tatsächlich um ein T-Zell-Epitop, wie hier gezeigt werden konnte. Um seine Bedeutung in der Tuberkulose zu bestimmen, sollte es weiter im humanen System untersucht werden.

### **3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Immunogenität von identifizierten mykobakteriellen Liganden**

Eine der gängigsten Methoden der Identifizierung von MHC-Liganden ist die *in-silico*-Vorhersage von Antigenen mit Hilfe von Programmen wie SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>). Zusätzlich besteht die Möglichkeit der Untersuchung von spezifischen Gedächtnis-T-Zell-Antworten nach der Stimulation mit vorhergesagten oder überlappenden Peptiden eines Antigens. Die Methode der Identifizierung von natürlich prozessierten MHC-Liganden ist die Analyse des HLA-Ligandoms mit Hilfe der Massenspektrometrie. Diese Methode ist unabhängig von T-Zellen und der *in-silico*-Vorhersage (Schirle et al. 2000). Über die identifizierten Peptide kann man auf die dazu gehörigen Proteine schließen und diese weiter im Kontext einer Immunantwort charakterisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels einer Affinitätschromatographie acht mykobakterielle Liganden identifiziert. Diese wurden anschließend auf ihre Fähigkeit, eine Immunantwort auszulösen, untersucht. Wie vorher gezeigt werden konnte, sind drei der Peptide fähig, eine IFN $\gamma$ -Sekretion in Immunzellen von PPD-Positiven bzw. BCG-Geimpften zu induzieren. Die stärkste IFN $\gamma$ -Sekretion wurde nach der Stimulation mit LLDAHIPQL beobachtet, daneben wurde gezeigt, dass es sich um eine CD8-vermittelte Antwort handelt. Ein anderes Epitop war RVRGAVTGM, welches im Vergleich zu LLDAHIPQL jedoch eine schwächere Immunreaktion auslöst. Leider konnte keines dieser HLA-A\*02-Epitope im transgenen Maus-Modell seine immunologische Relevanz zeigen. Bei dem RVRGAVTGM-Peptid liegt dies höchstwahrscheinlich an der schwachen Affinität zum HLA-A\*02-Molekül und der resultierenden schwachen Verdrängungsfreudigkeit gegenüber schon im MHC-Komplex gebundenen Liganden (<http://www.syfpeithi.de>). Trotz der starken Affinität

von LLDAHIPQL zum HLA-A\*02-Molekül und seiner Immunogenität *in vitro* zeigt es *in vivo* im Maus-Modell keine entsprechenden Ergebnisse.

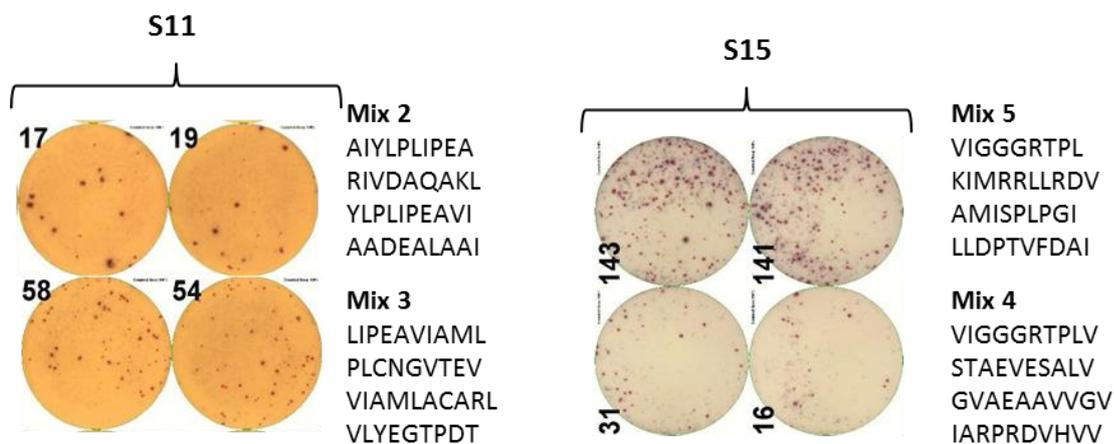
Wegen der intrazellulären Lebensweise der Mykobakterien ist es besonders wichtig, mykobakterielle HLA-Liganden von infizierten Zellen zu untersuchen. Das mykobakterielle HLA-Ligandom wird als Reaktion auf verschiedene immunologische Prozesse des Wirts präsentiert und kann dazu beitragen, die intrazelluläre Lebensweise der Mykobakterien zu verstehen und neue Antigene zu identifizieren. So zum Beispiel das im Rahmen dieser Arbeit entdeckte Antigen Acetyl-CoA-Synthetase und das dazugehörige Epitop TVFDAIRAAK, das dritte Peptid mit einer immunauslösenden Fähigkeit. Es wurde der Versuch unternommen, weitere Epitope der Acetyl-CoA-Synthetase zu identifizieren. Dazu wurden HLA-A\*02 und HLA-A\*03 Epitope mittels einer *in-silico*-Vorhersage bestimmt (siehe Tabelle 3.10). Die Immunantwort auf je vier bzw. fünf Peptide als Mix wurde mittels einer IFN $\gamma$ -Sekretion in ELISPOT-Versuchen gemessen.

**Tabelle 3.10: Liste der mit Hilfe von IEDB (<http://www.iedb.org/>) *in silico* vorhergesagten HLA-A\*02- und HLA-A\*03-Peptide.**

Epitope mit einer Länge von 9 Aminosäuren			Epitope mit einer Länge von 10 Aminosäuren		
<b>HLA-A*02-Peptide</b>					
Erste Aminosäure	Sequenz	SYFPHEITI Score	Erste Aminosäure	Sequenz	SYFPHEITI Score
137	YLPLIPEAV	23.0	107	LYSDLLAEV	25.0
148	MLACARLGI	22.0	127	GLVAGDRVAI	22.0
169	ALQARIVDA	22.0	135	AIYLPLIPEA	22.0
173	RIVDAQAKL	23.0	137	YLPLIPEAVI	22.0
200	AADEALAAI	23.0	140	LIPEAVIAML	28.0
320	PLCNGVTEV	25.0	145	VIAMLACARL	23.0
328	VLYEGTPDT	23.0	147	AMLACARLGI	22.0
345	IIEKYGVTI	22.0	199	AADEALAAI	24.0
401	VIGGGRTPL	23.0	204	ALAAIPDCSV	26.0
421	AMISPLPGI	27.0	207	AIPDCSVEHV	25.0
436	SAMTPLPGI	22.0	344	QIIEKYGVTI	24.0
519	WVLGRIDDV	22.0	381	RLLGSVGEPI	22.0
586	ELRTEVARV	23.0	401	VIGGGRTPLV	22.0
618	IMRRLLRDV	25.0	536	STAEVESALV	22.0
638	LLDPTVFDA	22.0	549	GVAEAAVVG	26.0
			598	IARPRDVHV	23.0
			617	KIMRRLLRDV	24.0
			638	LLDPTVFDAI	23.0
<b>HLA-A*03-Peptide</b>					
212	SVEHVLVVR	24.0	144	AVIAMLACAR	26.0
425	PLPGIAAAK	29.0	153	RLGIMHSVVF	27.0
572	VLRANYAPH	22.0	260	LLYTSGTTGK	25.0
609	ELPKTRSGK	24.0	593	RVISPIARPR	24.0
212	SVEHVLVVR	24.0	603	DVHVPELPGK	23.0
			621	RLLRDVAENR	26.0
			144	AVIAMLACAR	26.0

Wie in Abbildung 3.23 beispielhaft dargestellt ist, konnte eine Immunreaktion nach der Amplifikation und Restimulation der Spender-T-Zellen mit den vorhergesagten Peptiden der Acetyl-CoA-Synthetase induziert werden. Dabei handelt es sich um unterschiedlich starke Reaktionen auf die Peptid-Mixe. Im Vergleich zu Mix 4 veranlasst Mix 5 die T-Zellen des

Spenders S15 nach der Restimulation dazu, verstärkt IFN $\gamma$  zu sekretieren. Dagegen reagieren die T-Zellen des Spenders S11 auf zwei andere Mixe, die bei T-Zellen von Spender S15 zu keiner Reaktion führten. Ob Mix 4 und Mix 5 auch eine Immunreaktion in den T-Zellen des Spenders S11 auslösen, ist unbekannt, da aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht alle Peptide mit allen Spender-T-Zellen ausgetestet werden konnten. Die Analyse der Peptide wurde somit in dieser Arbeit noch nicht vollständig abgeschlossen und lässt Raum für weitere Untersuchungen.



**Abbildung 3.23: ELISPOT-Ergebnis nach Restimulation von T-Zellen mit *in silico* vorhergesagten Peptiden der Acetyl-CoA-Synthetase.**

PBMCs von zwei Spendern (S11 und S15) wurden über 12 Tage mit je einer Mischung der oben genannten Peptide stimuliert. Am Tag 13 erfolgte eine einmalige Restimulation mit den gleichen Peptidmischungen in Doppelbestimmung. Wie zu erkennen ist, führte Mix 5 bei S15 zu stärkerer T-Zell-Aktivierung (siehe Abb. rechts), während bei S11 die Peptid-Mixe 2 und 3 eine IFN $\gamma$ -Sekretion auslösten.

Im Grunde spiegelt das MHC-Ligandom das zelluläre Innenleben wider. Dabei werden die Stoffwechselprozesse wie auch mögliche Gefahren durch Pathogene dem Immunsystem zur Überprüfung präsentiert. Die Untersuchung des HLA-Ligandoms ist in der Krebsforschung ein gängiges Thema (Neumann et al. 2013; Dutoit et al. 2012). Die Idee ist, tumorassoziierte Peptide zu identifizieren und diese in Zukunft für personalisierte therapeutische Impfungen zu nutzen (Walter et al. 2012). Dieser Ansatz kann auch zur Identifizierung von natürlich prozessierten mykobakteriellen Peptiden angewendet werden. Dabei ist nicht nur die Identifikation von immunologisch dominanten Epitopen, wie LLDAHIPQL, sondern auch die Identifikation von Epitopen mit einer schwächeren Immunreaktivität, wie RVRGAVTGM und TVFDAIRAAK, entscheidend. So konnte im Maus-Modell gezeigt werden, dass die subdominanten mykobakteriellen Peptide im Verhältnis zu dominanten ESAT-6-Epitopen

unterschiedliche Reaktionen in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen auslösten. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen entwickelten sich nach der Immunisierung der Tiere mit sub-dominanten Peptiden in Gedächtnis-T-Zellen, die einen polyfunktionalen Phänotyp zeigten und deren proliferative Kapazität erhöht war (Woodworth et al. 2014). Zur Herstellung von neuen nicht-lebend-Vakzinen ist ein breites Wissen um viele mykobakterielle Antigene von Vorteil. Dementsprechend kann man von vornherein Zellen mit Mykobakterien verschiedener Stadien infizieren und so die unterschiedlichen für die Progression der Erkrankung relevanten Proteine identifizieren. Im idealen Fall sollten die Proteine auch unterschiedliche Stadien der Erkrankung repräsentieren, die latente und aktive Form der Tuberkulose. Die unterschiedlichen Antigene können zur differentiellen Diagnostik und Vorhersage genutzt werden.

## 4. Zusammenfassung

Der Schutz vor einer Tuberkulose besteht in einer wirksamen Immunantwort. Vor allem die Zellen des adaptiven Immunsystems haben eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung einer Immunität gegen Mtb. Da die BCG-Impfung nur bedingt Wirkung zeigt, ist das Bestreben groß, Alternativen zu haben, die eine volle Immunität vor Tuberkulose darstellen. Somit ist es notwendig nach Antigenen zu suchen, welche zur Immunisierung oder zur immunologischen Diagnostik von Nutzen sein können. Ein neuer Ansatz zur Identifikation von Antigenen aus Mtb ist die Analyse des HLA-Ligandoms, welches die exprimierten und dementsprechend Stadien-relevante Proteine aufzeigt. Um schnell eine große Anzahl an möglichen und unterschiedlichen HLA-Liganden zu identifizieren, wurde hier deren massenspektrometrische Analyse an infizierten Zellen vorgenommen.

Mit Hilfe eines etablierten Protokolls zur Isolation von natürlich prozessierten Liganden konnten acht mykobakterielle MHC Klasse I-Liganden eluiert werden. Vier dieser Peptide wurden nach der Infektion der JY Zelllinie mit MVA, welches ein oder mehrere Antigene mykobakteriellen Ursprungs kodiert, identifiziert. Drei dieser Peptide stammen aus dem Ag85A und das vierte aus dem Protein TB9.8. Zusätzlich wurden 16 Vaccinia-abstammende MHC Klasse I- und ein MHC Klasse II-Ligand und seine zwei Längenvarianten eluiert. Die anderen vier vorher nicht bekannten mykobakteriellen Peptide wurden nach der Infektion von monozytären Makrophagen isoliert. Hier wurden die primären Zellen mit dem pathogenen Stamm H37Rv infiziert.

Drei der identifizierten HLA-Liganden lösen eine spezifische T-Zell-Immunantwort aus. Bei einem Epitop handelt es sich um ein Peptid aus Ag85A, das zweite stammt von TB9.8 und das dritte aus der Acetyl-CoA-Synthetase. Das Peptid mit der Sequenz LLDAHIPQL löst in ca. 70% der Spender-PBMCs eine IFN $\gamma$ -Antwort aus.

Trotz der fehlenden MHC Klasse II-Liganden mykobakteriellen Ursprungs demonstriert diese Arbeit die Zuverlässigkeit der massenspektrometrischen Analyse von infizierten Proben zur Identifikation von natürlich prozessierten T-Zell-Epitopen und neuen attraktiven Antigenen. Durch die Optimierung der Infektion von Makrophagen mit einem pathogenen Mykobakterien-Stamm und der sich fortwährend entwickelnden massenspektrometrischen Technik wird es in der nächsten Zeit möglich sein viele Antigene zu identifizieren, die wiederum hilfreich sein werden, den Mythos der Tuberkulose und seinen Erreger aufzuklären und zur Entwicklung von Impfungen beitragen.

## 5. Abstract

*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) is the causative pathogen for tuberculosis (TB) in humans. Most of the individuals infected with *Mtb* do harbour the pathogen without sign of infection, and the reactivation risk remains lifelong. The current vaccine against TB is Bacillus Calmette–Guérin (BCG), which fails to protect against pulmonary TB in adolescent and adults. For the development of optimal vaccination based on antigens or for immune monitoring strategies, it is essential to characterize the human histocompatibility leucocyte antigen (HLA)-ligandome of cells infected with *Mtb*. The presented mycobacterial ligands on infected cells can lead to identification of novel ligands and resultant antigens. Further, the identified ligandome could give a glance at the life cycle of intracellular persisting *Mtb*, in active replicating or dormant state, and help to understand the biology of the pathogen. In the past various epitopes from mycobacterial antigens could be identified by epitope prediction and screening of T cells. We showed an approach to isolate naturally processed mycobacterial peptides presented by HLA molecules and analysed them by HPLC-coupled mass spectrometry. For the first time, we were able to identify novel mycobacterial HLA ligands with mass spectrometric analysis of B-lymphoblastoid cell line (B-LCL) infected with modified vaccinia virus Ankara (MVA) encoding mycobacterial antigens and macrophages infected with mycobacterial laboratory strain H37Rv. Several additional viral peptides from MVA vectors could be identified. The identified *Mtb* peptides were screened in highly sensitive enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assays for single cell IFN $\gamma$  release to monitor the presence of reactive memory T cells in BCG-vaccinated or purified protein derivative (PPD) -positive donors. Three of nine identified ligands were immunogenic. This demonstrates the suitability of the mass spectrometry-based technique to identify bacterial and viral ligands from infected cells.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle ( <i>Antigen Presenting Cell</i> )
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-Propan-Sulfonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dendritische Zellen ( <i>dendritic cells</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISPOT	<i>Enzyme Linked Immunospot</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>Fetal Calf Serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
h	<i>hours</i>
h.i.	Hitze inaktiviert
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen ( <i>Human Leukocyte Antigen</i> )
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HS	Human Serum
ICS	Intrazelluläre Zytokinfärbung ( <i>Intracellular Cytokine Staining</i> )
IFN	Interferon
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL	Interleukin

iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie ( <i>Lymphoblastoid Cell Line</i> )
LM	Lipomannan
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MGCs	<i>Multinucleated giant cells</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
MOTT	<i>Mycobacteria Other Than Tuberculosis</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
PAMPs	<i>Pattern Recognition Molecular Patterns</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes ( <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> )
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PenStrep	Penicillin und Streptomycin
PGN	Peptidoglykan
pH	potentia Hydrogenii
PHA-L	Phytohaemagglutinin
PIM	Phosphatidyl-myo-inositolmannosid
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PPD	<i>Purified Protein Derivate</i>
PPR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RD-1	<i>Region of Difference 1</i>
RNase	Ribonuklease
RNI	Reaktive Stickstoffspezies ( <i>reactive nitrogen intermediates</i> )
ROI	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RT	Raumtemperatur
SFU	<i>Spot Forming Units</i>

Tab.	Tabelle
TB	Tuberkulose
TDM	Trehalose-6,6'-dimykolat
TLR	Toll-Like Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
TZR	T-Zell-Rezeptor
Upm	Umdrehung pro Minute
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

## 7. Literaturverzeichnis

- Adams, E.J., 2013. Diverse antigen presentation by the Group 1 CD1 molecule, CD1c. *Molecular Immunology*, 55(2), pp.182–185. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589012004336> [Accessed November 9, 2013].
- Aderem, A. & Underhill, D.M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology*, 17, pp.593–623. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10358769> [Accessed November 10, 2013].
- Agarwal, N. et al., 2009. Cyclic AMP intoxication of macrophages by a Mycobacterium tuberculosis adenylate cyclase. *Nature*, 460(7251), pp.98–102. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19516256> [Accessed November 10, 2013].
- Amigorena, S. & Savina, A., 2010. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Current opinion in immunology*, 22(1), pp.109–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171863> [Accessed November 10, 2013].
- Andersen, P. et al., 2000. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*, 356(9235), pp.1099–104. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11009160> [Accessed November 10, 2013].
- Andersen, P. & Doherty, T.M., 2005. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature reviews. Microbiology*, 3(8), pp.656–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16012514> [Accessed November 10, 2013].
- Antoine, G. et al., 1998. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, 244(2), pp.365–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9601507> [Accessed November 10, 2013].
- Appleman, L.J. et al., 2000. CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(1), pp.144–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10605005> [Accessed November 10, 2013].
- Arlehamn, C.S.L. et al., 2012. Dissecting mechanisms of immunodominance to the common tuberculosis antigens ESAT-6, CFP10, Rv2031c (hspX), Rv2654c (TB7.7), and Rv1038c (Esx). *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(10), pp.5020–31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3345088&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Assarsson, E. et al., 2007. A quantitative analysis of the variables affecting the repertoire of T cell specificities recognized after vaccinia virus infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(12), pp.7890–901. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548627> [Accessed November 10, 2013].
- Aston, F.W., 1933. THE STORY OF ISOTOPES. *Science (New York, N.Y.)*, 78(2010), pp.5–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17821424> [Accessed November 10, 2013].

- Baena, A. & Porcelli, S.A., 2009. Evasion and subversion of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tissue antigens*, 74(3), pp.189–204. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2753606&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Bafica, A. et al., 2005. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of experimental medicine*, 202(12), pp.1715–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2212963&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Barry, C.E., 2001. Interpreting cell wall “virulence factors” of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in microbiology*, 9(5), pp.237–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11336841> [Accessed February 21, 2013].
- Barry, M. & Bleackley, R.C., 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature reviews. Immunology*, 2(6), pp.401–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093006> [Accessed November 10, 2013].
- Beckett, D., Kovaleva, E. & Schatz, P.J., 1999. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 8(4), pp.921–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2144313&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Belisle, J.T. et al., 1997. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5317), pp.1420–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9162010> [Accessed November 10, 2013].
- Betts, M.R. et al., 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of immunological methods*, 281(1-2), pp.65–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580882> [Accessed November 10, 2013].
- Betts, M.R. & Koup, R.A., 2004. Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods in cell biology*, 75, pp.497–512. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15603439> [Accessed November 10, 2013].
- Bifani, P. et al., 2000. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra variants: distinguishing the mycobacterial laboratory strain. *Journal of clinical microbiology*, 38(9), pp.3200–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=87354&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Blum, J.S., Wearsch, P.A. & Cresswell, P., 2013. Pathways of antigen processing. *Annual review of immunology*, 31, pp.443–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23298205> [Accessed November 10, 2013].
- Bouvier, M. & Wiley, D.C., 1994. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5170), pp.398–402. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8023162> [Accessed November 10, 2013].

- Bowdish, D.M.E. et al., 2007. Macrophage receptors implicated in the “adaptive” form of innate immunity. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 9(14-15), pp.1680–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18023392> [Accessed November 10, 2013].
- Brennan, P.J., 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 83(1-3), pp.91–7. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472979202000896> [Accessed February 21, 2013].
- Bricard, G. & Porcelli, S.A., 2007. Antigen presentation by CD1 molecules and the generation of lipid-specific T cell immunity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 64(14), pp.1824–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17483872> [Accessed November 10, 2013].
- Brightbill, H.D. et al., 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5428), pp.732–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426995> [Accessed November 10, 2013].
- Brigl, M. & Brenner, M.B., 2004. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annual review of immunology*, 22, pp.817–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032598> [Accessed November 10, 2013].
- Briken, V. et al., 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Molecular microbiology*, 53(2), pp.391–403. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mycobacterial+lipoarabinomannan+and+related+lipoglycans%3A+from+biogenesis+to+modulation+of+the+immune+response> [Accessed November 7, 2013].
- Bruns, H. et al., 2009. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis in humans. *The Journal of clinical investigation*, 119(5), pp.1167–77. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2673881&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- C. A. Janeway, Jr, P. Travers, M. Walport, and M.J.S., 2005. *Immunobiology, 6th edition*,
- Caccamo, N. et al., 2009. Analysis of Mycobacterium tuberculosis-specific CD8 T-cells in patients with active tuberculosis and in individuals with latent infection. *PloS one*, 4(5), p.e5528. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2678250&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Call, M.E. et al., 2002. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell*, 111(7), pp.967–79. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3420808&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Calmette, A., 1931. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proc R Soc Med.*, pp.1481–1490.

- Cammarota, G. et al., 1992. Identification of a CD4 binding site on the beta 2 domain of HLA-DR molecules. *Nature*, 356(6372), pp.799–801. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1574119> [Accessed November 10, 2013].
- Caruso, A.M. et al., 1999. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(9), pp.5407–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10228018> [Accessed November 10, 2013].
- Casadevall, A. & Pirofski, L., 2003. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nature reviews. Microbiology*, 1(1), pp.17–24. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro732> [Accessed November 10, 2013].
- Casanova, J.-L. & Abel, L., 2002. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annual review of immunology*, 20, pp.581–620. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861613> [Accessed November 10, 2013].
- Chackerian, A.A. et al., 2002. Dissemination of Mycobacterium tuberculosis is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. *Infection and immunity*, 70(8), pp.4501–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=128141&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Chan, J. et al., 1992. Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *The Journal of experimental medicine*, 175(4), pp.1111–22. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2119182&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Chang, J.C. et al., 2009. igr Genes and Mycobacterium tuberculosis cholesterol metabolism. *Journal of bacteriology*, 191(16), pp.5232–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2725594&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Chatterjee, D., 1997. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Current opinion in chemical biology*, 1(4), pp.579–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9667898> [Accessed November 10, 2013].
- Christ, C., 2009. Untersuchungen zur von kommensalen und pathogenen Staphylokokken induzierten Expression von Zytokinen und Aktivierung von Signaltransduktionswegen in humanen Keratinozyten. , (Diplomarbeit).
- Clay, H., Volkman, H.E. & Ramakrishnan, L., 2008. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity*, 29(2), pp.283–94. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3136176&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Cobat, A. et al., 2009. Two loci control tuberculin skin test reactivity in an area hyperendemic for tuberculosis. *The Journal of experimental medicine*, 206(12), pp.2583–91. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2806605&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].

- Cole, S.T. et al., 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393(6685), pp.537–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634230> [Accessed February 23, 2013].
- Collette, Y. et al., 1998. Distinct regulation of T-cell death by CD28 depending on both its aggregation and T-cell receptor triggering: a role for Fas-FasL. *Blood*, 92(4), pp.1350–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9694724> [Accessed November 10, 2013].
- Colten, H.R., 1984. Expression of the MHC class III genes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 306(1129), pp.355–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6149578> [Accessed November 10, 2013].
- Cooper, A.M., 2009. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annual review of immunology*, 27(December), pp.393–422. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302046> [Accessed November 10, 2013].
- Davila, J. et al., 2010. Assessment of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* *esxA*, *esxH*, and *fbpB* genes among clinical isolates and its implication for the future immunization by new tuberculosis subunit vaccines Ag85B-ESAT-6 and Ag85B-TB10.4. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, p.208371. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2896655&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2013].
- Davis, J.M. et al., 2002. Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity*, 17(6), pp.693–702. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12479816> [Accessed November 10, 2013].
- Davis, J.M. & Ramakrishnan, L., 2009. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell*, 136(1), pp.37–49. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3134310&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Dengjel, J. et al., 2005. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22), pp.7922–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1142372&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Denis, O., Lozes, E. & Huygen, K., 1997. Induction of cytotoxic T-cell responses against culture filtrate antigens in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin-infected mice. *Infection and immunity*, 65(2), pp.676–84. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=176113&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Denzin, L.K. et al., 1997. Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5335), pp.106–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9311912> [Accessed November 10, 2013].
- Denzin, L.K., Hammond, C. & Cresswell, P., 1996. HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *The Journal of experimental medicine*, 184(6), pp.2153–65. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2196380&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Deretic, V., 2010. Autophagy in infection. *Current opinion in cell biology*, 22(2), pp.252–62. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2866841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Diedrich, C.R. et al., 2010. Reactivation of latent tuberculosis in cynomolgus macaques infected with SIV is associated with early peripheral T cell depletion and not virus load. *PloS one*, 5(3), p.e9611. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2835744&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Dingler, F., 2011. *Identifikation und Charakterisierung prostataspezifischer Liganden auf MHC I*.
- Dole, M., 1968. Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics*, 49(5), p.2240. Available at: <http://link.aip.org/link/?JCP/49/2240/1&Agg=doi> [Accessed March 2, 2013].
- Dutoit, V. et al., 2012. Exploiting the glioblastoma peptidome to discover novel tumour-associated antigens for immunotherapy. *Brain : a journal of neurology*, 135(Pt 4), pp.1042–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22418738> [Accessed August 4, 2014].
- Van Endert, P., 2011. Post-proteasomal and proteasome-independent generation of MHC class I ligands. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(9), pp.1553–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21390545> [Accessed November 10, 2013].
- Ernst, J.D., 2012. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature reviews. Immunology*, 12(8), pp.581–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22790178> [Accessed November 10, 2013].
- Falk, K. et al., 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351(6324), pp.290–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1709722> [Accessed November 10, 2013].
- Farinacci, M., Weber, S. & Kaufmann, S.H.E., 2012a. The recombinant tuberculosis vaccine rBCG ΔureC::hly(+) induces apoptotic vesicles for improved priming of CD4(+) and CD8(+) T cells. *Vaccine*, 30(52), pp.7608–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23088886> [Accessed April 29, 2013].
- Farinacci, M., Weber, S. & Kaufmann, S.H.E., 2012b. The recombinant tuberculosis vaccine rBCG ΔureC::hly(+) induces apoptotic vesicles for improved priming of CD4(+) and CD8(+) T cells. *Vaccine*, 30(52), pp.7608–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23088886> [Accessed November 10, 2013].
- Fenn, J.B. et al., 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4926), pp.64–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2675315> [Accessed November 8, 2013].

- Fulton, S.A. et al., 2004. Inhibition of major histocompatibility complex II expression and antigen processing in murine alveolar macrophages by Mycobacterium bovis BCG and the 19-kilodalton mycobacterial lipoprotein. *Infection and immunity*, 72(4), pp.2101–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=375182&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 13, 2013].
- Garboczi, D.N. et al., 2010. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature*. 1996. 384: 134–141. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(11), pp.6394–401. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21084668> [Accessed November 10, 2013].
- Geluk, A. et al., 2000. Identification of major epitopes of Mycobacterium tuberculosis AG85B that are recognized by HLA-A\*0201-restricted CD8+ T cells in HLA-transgenic mice and humans. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(11), pp.6463–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11086086> [Accessed November 10, 2013].
- Geluk, A. et al., 2011. ML1419c peptide immunization induces Mycobacterium leprae-specific HLA-A\*0201-restricted CTL in vivo with potential to kill live mycobacteria. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(3), pp.1393–402. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3140574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Gilleron, M. et al., 2000. Mycobacterium tuberculosis H37Rv parietal and cellular lipoarabinomannans. Characterization of the acyl- and glyco-forms. *The Journal of biological chemistry*, 275(1), pp.677–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617666> [Accessed November 10, 2013].
- Girardin, S.E. et al., 2003. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *The Journal of biological chemistry*, 278(43), pp.41702–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871942> [Accessed November 10, 2013].
- Glynn, J.R. et al., 2010. High rates of recurrence in HIV-infected and HIV-uninfected patients with tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*, 201(5), pp.704–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20121434> [Accessed November 10, 2013].
- Gonzalo, J.A. et al., 2001. Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(1), pp.1–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123268> [Accessed November 10, 2013].
- Green, A.M., Difazio, R. & Flynn, J.L., 2013. IFN- $\gamma$  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)*, 190(1), pp.270–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233724> [Accessed November 10, 2013].
- Gu, S. et al., 2003. Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a Mycobacterium tuberculosis strain. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2(12), pp.1284–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14532352> [Accessed November 10, 2013].
- Guerder, S., Meyerhoff, J. & Flavell, R., 1994. The role of the T cell costimulator B7-1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen.

- Immunity*, 1(2), pp.155–66. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7534199> [Accessed November 10, 2013].
- Guinn, K.M. et al., 2004. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology*, 51(2), pp.359–70. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1458497&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Gutierrez, M.G. et al., 2004. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*, 119(6), pp.753–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607973> [Accessed November 10, 2013].
- Harding, C. V & Boom, W.H., 2010. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nature reviews. Microbiology*, 8(4), pp.296–307. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3037727&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Harrington, L.E. et al., 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology*, 6(11), pp.1123–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16200070> [Accessed November 8, 2013].
- Harris, J. & Keane, J., 2010. How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. *Clinical and experimental immunology*, 161(1), pp.1–9. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2940142&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Hart, P.D. et al., 1972. Ultrastructural study of the behavior of macrophages toward parasitic mycobacteria. *Infection and immunity*, 5(5), pp.803–7. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=422443&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 11, 2013].
- Hawkrigde, T. et al., 2008. Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa. *The Journal of infectious diseases*, 198(4), pp.544–52. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2822902&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Hayden, K.A., Tough, D.F. & Webb, S.R., 1996. In vivo response of mature T cells to Mlsa antigens. Long-term progeny of dividing cells include cells with a naive phenotype. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(1), pp.48–55. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598492> [Accessed November 10, 2013].
- Heath, W.R. & Carbone, F.R., 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu.Rev.Immunol.*, 19, pp.47–64.
- Van Heijst, J.W.J. & Pamer, E.G., 2013. Radical host-specific therapies for TB. *Cell*, 153(3), pp.507–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23622234> [Accessed November 10, 2013].

- Helmut Hahn, Stefan H. E. Kaufmann, Thomas F. Schulz, S.S., 2009. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*,
- Hermans, I.F. et al., 2004. The VITAL assay: a versatile fluorometric technique for assessing CTL- and NKT-mediated cytotoxicity against multiple targets in vitro and in vivo. *Journal of immunological methods*, 285(1), pp.25–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14871532> [Accessed April 29, 2013].
- Hervas-Stubbs, S. et al., 2006. High frequency of CD4+ T cells specific for the TB10.4 protein correlates with protection against Mycobacterium tuberculosis infection. *Infection and immunity*, 74(6), pp.3396–407. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1479244&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Ho, A.W.S. et al., 2011. Lung CD103+ dendritic cells efficiently transport influenza virus to the lymph node and load viral antigen onto MHC class I for presentation to CD8 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(11), pp.6011–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22043017> [Accessed November 10, 2013].
- Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S., 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5609), pp.1057–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12522256> [Accessed November 10, 2013].
- Hsu, T. et al., 2003. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), pp.12420–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=218773&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Hunter, R.L. et al., 2006a. Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Annals of clinical and laboratory science*, 36(4), pp.371–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17127724> [Accessed November 10, 2013].
- Hunter, R.L. et al., 2006b. Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Annals of clinical and laboratory science*, 36(4), pp.371–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17127724> [Accessed November 10, 2013].
- Huygen, K. et al., 1996. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nature medicine*, 2(8), pp.893–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8705859> [Accessed November 14, 2013].
- Inohara, N. & Nuñez, G., 2003. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature reviews. Immunology*, 3(5), pp.371–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12766759> [Accessed November 10, 2013].
- Ishizuka, J. et al., 2009. Quantitating T cell cross-reactivity for unrelated peptide antigens. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(7), pp.4337–45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2762195&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].

- Jameson, S.C., Hogquist, K.A. & Bevan, M.J., 1995. Positive selection of thymocytes. *Annual review of immunology*, 13, pp.93–126. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7612239> [Accessed November 10, 2013].
- Jick, S.S. et al., 2006. Glucocorticoid use, other associated factors, and the risk of tuberculosis. *Arthritis and rheumatism*, 55(1), pp.19–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16463407> [Accessed November 10, 2013].
- Johnson, K.L. et al., 2009. Discovery of naturally processed and HLA-presented class I peptides from vaccinia virus infection using mass spectrometry for vaccine development. *Vaccine*, 28(1), pp.38–47. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2787804&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- De Jonge, M.I. et al., 2007. ESAT-6 from Mycobacterium tuberculosis dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *Journal of bacteriology*, 189(16), pp.6028–34. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1952024&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Jouvin-Marche, E., Fuschiotti, P. & Marche, P.N., 2009. Dynamic aspects of TCRalpha gene recombination: qualitative and quantitative assessments of the TCRalpha chain repertoire in man and mouse. *Advances in experimental medicine and biology*, 650, pp.82–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19731803> [Accessed November 10, 2013].
- Kagina, B.M.N. et al., 2010. Specific T cell frequency and cytokine expression profile do not correlate with protection against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182(8), pp.1073–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2970848&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Kassa, D. et al., 2012. Analysis of immune responses against a wide range of Mycobacterium tuberculosis antigens in patients with active pulmonary tuberculosis. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 19(12), pp.1907–15. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3535869&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Kastenmuller, W. et al., 2007. Cross-competition of CD8+ T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination. *The Journal of experimental medicine*, 204(9), pp.2187–98. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2118691&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Kato-Maeda, M. et al., 2001. Comparing genomes within the species Mycobacterium tuberculosis. *Genome research*, 11(4), pp.547–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=311074&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Kaufmann, S.H., 1988. CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunology today*, 9(6), pp.168–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3151440> [Accessed November 10, 2013].

- Kaufmann, S.H., 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature reviews. Immunology*, 1(1), pp.20–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905811> [Accessed April 30, 2013].
- Kaufmann, S.H.E., Hussey, G. & Lambert, P.-H., 2010. New vaccines for tuberculosis. *Lancet*, 375(9731), pp.2110–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488515> [Accessed November 10, 2013].
- Keane, J. et al., 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *The New England journal of medicine*, 345(15), pp.1098–104. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11596589> [Accessed November 10, 2013].
- Kim, J.-J. et al., 2012. Host cell autophagy activated by antibiotics is required for their effective antimycobacterial drug action. *Cell host & microbe*, 11(5), pp.457–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22607799> [Accessed November 10, 2013].
- Kirberg, J., Berns, A. & von Boehmer, H., 1997. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *The Journal of experimental medicine*, 186(8), pp.1269–75. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2199081&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Klausner, R.D., Donaldson, J.G. & Lippincott-Schwartz, J., 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *The Journal of cell biology*, 116(5), pp.1071–80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2289364&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Koch, R., 1882. Die Aetiologie der Tuberculose. *Berliner Klinische Wochenschrift* 19.
- Kohn, J. & Wilchek, M., 1981. Procedures for the analysis of cyanogen bromide-activated Sepharose or Sephadex by quantitative determination of cyanate esters and imidocarbonates. *Analytical biochemistry*, 115(2), pp.375–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6171179> [Accessed November 10, 2013].
- Kotturi, M.F. et al., 2009. Of mice and humans: how good are HLA transgenic mice as a model of human immune responses? *Immunome research*, 5, p.3. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2702351&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Kowalewski, D.J., 2011. *Massenspektrometrische Analyse von Nierenzellkarzinomen zur Entwicklung neuer Tumorstoffe*.
- Kowalewski, D.J. & Stevanovic, S., 2013. *Antigen Processing* P. van Endert, ed., Totowa, NJ: Humana Press. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-62703-218-6> [Accessed November 10, 2013].
- Kowalewski, D.J. & Stevanović, S., 2013. Biochemical large-scale identification of MHC class I ligands. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 960, pp.145–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23329485> [Accessed November 10, 2013].

- Kvist, S. et al., 1982. Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens. *Cell*, 29(1), pp.61–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6955026> [Accessed November 10, 2013].
- Kwan, C.K. & Ernst, J.D., 2011. HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. *Clinical microbiology reviews*, 24(2), pp.351–76. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3122491&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Kyzirakos, C., 2009. *Charakterisierung der CD4 T - Zellantwort gegen EBV - Antigene.*
- Kyzirakos Christina, 2013. *Häufig erkannte EBV-spezifische CD4+ T-Zellepitope für eine optimierte Immuntherapie bei EBV-assoziierten Erkrankungen.*
- Lalvani, A. et al., 1998. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(1), pp.270–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=18198&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Lange, C. et al., 2006. [Current position regarding the diagnosis of tuberculosis]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, 131(7), pp.341–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16468106> [Accessed November 10, 2013].
- Lay, G. et al., 2007. Langhans giant cells from M. tuberculosis-induced human granulomas cannot mediate mycobacterial uptake. *The Journal of pathology*, 211(1), pp.76–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17115379> [Accessed November 10, 2013].
- Lee, K.-H. et al., 2002. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5559), pp.1539–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11859198> [Accessed November 10, 2013].
- Lehmann, KB and Neumann, R., 1896. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik. *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik.*
- Lemmel, C. et al., 2004. Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nature biotechnology*, 22(4), pp.450–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004565> [Accessed November 10, 2013].
- Levine, B. & Klionsky, D.J., 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell*, 6(4), pp.463–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15068787> [Accessed November 10, 2013].
- Lew, J.M. et al., 2013. Database resources for the tuberculosis community. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 93(1), pp.12–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23332401> [Accessed November 10, 2013].
- Lew, J.M. et al., 2011. TubercuList--10 years after. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 91(1), pp.1–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20980199> [Accessed November 10, 2013].

- Lewinsohn, D.A. et al., 2007. Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B. *PLoS pathogens*, 3(9), pp.1240–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2323292&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Lewinsohn, D.A. et al., 2003. Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells preferentially recognize heavily infected cells. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 168(11), pp.1346–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12969871> [Accessed November 10, 2013].
- Liu, J. & Mushegian, A., 2003. Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 12(7), pp.1418–31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2323934&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Lounis, N. et al., 2001. Iron and Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 20(3), pp.123–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166659> [Accessed November 10, 2013].
- Madden, D.R., Garboczi, D.N. & Wiley, D.C., 1993. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell*, 75(4), pp.693–708. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7694806> [Accessed November 10, 2013].
- Maini, R. et al., 1999. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet*, 354(9194), pp.1932–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10622295> [Accessed November 10, 2013].
- Malen, H. et al., 2010. Definition of novel cell envelope associated proteins in Triton X-114 extracts of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *BMC.Microbiol.*, 10, p.132–.
- Malin, A.S. et al., 2000. Vaccinia expression of Mycobacterium tuberculosis-secreted proteins: tissue plasminogen activator signal sequence enhances expression and immunogenicity of M. tuberculosis Ag85. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 2(14), pp.1677–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137041> [Accessed November 10, 2013].
- Masson, D., Zamai, M. & Tschopp, J., 1986. Identification of granzyme A isolated from cytotoxic T-lymphocyte-granules as one of the proteases encoded by CTL-specific genes. *FEBS letters*, 208(1), pp.84–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3533635> [Accessed November 10, 2013].
- Mattow, J. et al., 2003. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent Mycobacterium tuberculosis H37Rv and attenuated M. bovis BCG Copenhagen. *Electrophoresis*, 24(19-20), pp.3405–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14595687> [Accessed November 10, 2013].
- Mawuenyega, K.G. et al., 2005. Mycobacterium tuberculosis functional network analysis by global subcellular protein profiling. *Molecular biology of the cell*, 16(1), pp.396–404. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=539182&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Mazandu, G.K. & Mulder, N.J., 2012. Function Prediction and Analysis of Mycobacterium tuberculosis Hypothetical Proteins. *International journal of molecular sciences*, 13(6), pp.7283–302. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3397526&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- McLean, K.J. et al., 2007. Structure, function and drug targeting in Mycobacterium tuberculosis cytochrome P450 systems. *Archives of biochemistry and biophysics*, 464(2), pp.228–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Structure%2C+function+and+drug+targeting+in+Mycobacterium+tuberculosis+cytochrome+P450+systems> [Accessed November 10, 2013].
- McShane, H. et al., 2002. Protective immunity against Mycobacterium tuberculosis induced by dendritic cells pulsed with both CD8(+)- and CD4(+)-T-cell epitopes from antigen 85A. *Infection and immunity*, 70(3), pp.1623–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=127749&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- McShane, H. et al., 2004. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nature medicine*, 10(11), pp.1240–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15502839> [Accessed November 10, 2013].
- Means, T.K. et al., 1999. Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(7), pp.3920–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490993> [Accessed November 10, 2013].
- Meisinger-Henschel, C. et al., 2007. Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara. *The Journal of general virology*, 88(Pt 12), pp.3249–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18024893> [Accessed November 10, 2013].
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E. & Von Andrian, U.H., 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*, 427(6970), pp.154–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14712275> [Accessed November 10, 2013].
- Mester, G., Hoffmann, V. & Stevanović, S., 2011. Insights into MHC class I antigen processing gained from large-scale analysis of class I ligands. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(9), pp.1521–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21387142> [Accessed November 10, 2013].
- Meyer, V.S. et al., 2008a. Long-term immunity against actual poxviral HLA ligands as identified by differential stable isotope labeling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(9), pp.6371–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18941228> [Accessed November 10, 2013].
- Meyer, V.S. et al., 2008b. Long-term immunity against actual poxviral HLA ligands as identified by differential stable isotope labeling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. :*

- 1950), 181(9), pp.6371–83. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18941228>.
- Mogues, T. et al., 2001. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *The Journal of experimental medicine*, 193(3), pp.271–80. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2195922&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Mohan, V.P. et al., 2001. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infection and immunity*, 69(3), pp.1847–55. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98092&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Molloy, A., Laochumroonvorapong, P. & Kaplan, G., 1994. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guérin. *The Journal of experimental medicine*, 180(4), pp.1499–509. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2191680&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Monack, D.M., Mueller, A. & Falkow, S., 2004. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nature reviews. Microbiology*, 2(9), pp.747–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15372085> [Accessed November 13, 2013].
- Morris, G.P. & Allen, P.M., 2012. How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nature immunology*, 13(2), pp.121–8. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22261968> [Accessed November 10, 2013].
- Münz, C., 2012. Antigen Processing for MHC Class II Presentation via Autophagy. *Frontiers in immunology*, 3, p.9. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3342365&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Neefjes, J.J., Momburg, F. & Hämmerling, G.J., 1993. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5122), pp.769–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8342042> [Accessed November 10, 2013].
- Nepal, R.M. et al., 2006. Cathepsin L maturation and activity is impaired in macrophages harboring M. avium and M. tuberculosis. *International immunology*, 18(6), pp.931–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16636015> [Accessed November 13, 2013].
- Netski, D.M. et al., 2005. Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41(5), pp.667–75. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16080089> [Accessed November 10, 2013].
- Neumann, A. et al., 2013. Identification of HLA ligands and T-cell epitopes for immunotherapy of lung cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 62(9), pp.1485–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817722> [Accessed July 16, 2014].

- Nguyen, S. & Fenn, J.B., 2007. Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(4), pp.1111–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1783130&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Noss, E.H. et al., 2001a. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(2), pp.910–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11441098> [Accessed November 10, 2013].
- Noss, E.H. et al., 2001b. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(2), pp.910–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11441098> [Accessed November 10, 2013].
- O'Garra, A. & Arai, N., 2000. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in cell biology*, 10(12), pp.542–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121747> [Accessed November 10, 2013].
- Oettinger, T. et al., 1999. Development of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 79(4), pp.243–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692993> [Accessed November 10, 2013].
- Oseroff, C. et al., 2005. HLA class I-restricted responses to vaccinia recognize a broad array of proteins mainly involved in virulence and viral gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), pp.13980–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1236582&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Ostrout, N.D. et al., 2007. Long-term T cell memory to human leucocyte antigen-A2 supertype epitopes in humans vaccinated against smallpox. *Clinical and experimental immunology*, 149(2), pp.265–73. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1941954&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Ottenhoff, T.H. & Mutis, T., 1995. Role of cytotoxic cells in the protective immunity against and immunopathology of intracellular infections. *European journal of clinical investigation*, 25(6), pp.371–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7656913> [Accessed November 10, 2013].
- Ottenhoff, T.H.M., 2012. The knowns and unknowns of the immunopathogenesis of tuberculosis. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 16(11), pp.1424–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23044443> [Accessed November 10, 2013].
- Ottenhoff, T.H.M. & Kaufmann, S.H.E., 2012. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS pathogens*, 8(5), p.e1002607. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3349743&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 17, 2013].

Pai, R.K. et al., 2003. Inhibition of IFN-gamma-induced class II transactivator expression by a 19-kDa lipoprotein from Mycobacterium tuberculosis: a potential mechanism for immune evasion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(1), pp.175–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12816996> [Accessed November 10, 2013].

Parker, D.C., 1993. The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation. *Seminars in immunology*, 5(6), pp.413–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8123796> [Accessed November 10, 2013].

Pasquetto, V. et al., 2005. HLA-A\*0201, HLA-A\*1101, and HLA-B\*0702 transgenic mice recognize numerous poxvirus determinants from a wide variety of viral gene products. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(8), pp.5504–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210659> [Accessed November 10, 2013].

Peyron, P. et al., 2008. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for M. tuberculosis persistence. *PLoS pathogens*, 4(11), p.e1000204. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2575403&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].

Philips, J. a & Ernst, J.D., 2012. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annual review of pathology*, 7, pp.353–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22054143> [Accessed February 6, 2013].

Philips, J.A. & Ernst, J.D., 2012. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annual review of pathology*, 7, pp.353–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22054143> [Accessed November 10, 2013].

Picker, L.J., 1994. Control of lymphocyte homing. *Current opinion in immunology*, 6(3), pp.394–406. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7917107> [Accessed November 10, 2013].

Van Pinxteren, L.A. et al., 2000. Control of latent Mycobacterium tuberculosis infection is dependent on CD8 T cells. *European journal of immunology*, 30(12), pp.3689–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11169412> [Accessed November 10, 2013].

Puissegur, M.-P. et al., 2007. Mycobacterial lipomannan induces granuloma macrophage fusion via a TLR2-dependent, ADAM9- and beta1 integrin-mediated pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(5), pp.3161–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17312164> [Accessed May 3, 2013].

Pulendran, B. & Artis, D., 2012. New paradigms in type 2 immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6093), pp.431–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22837519> [Accessed November 10, 2013].

Ramakrishnan, L., 2012. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature reviews. Immunology*, 12(5), pp.352–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22517424> [Accessed November 10, 2013].

- Rammensee, H.G., 1995. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Current opinion in immunology*, 7(1), pp.85–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7772286> [Accessed November 10, 2013].
- Randhawa, P.S., 1990. Lymphocyte subsets in granulomas of human tuberculosis: an in situ immunofluorescence study using monoclonal antibodies. *Pathology*, 22(3), pp.153–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2243727> [Accessed November 10, 2013].
- Rastogi, N., Legrand, E. & Sola, C., 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 20(1), pp.21–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11288513> [Accessed February 21, 2013].
- Reece, S.T. & Kaufmann, S.H.E., 2012. Floating between the poles of pathology and protection: can we pin down the granuloma in tuberculosis? *Current opinion in microbiology*, 15(1), pp.63–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22074861> [Accessed November 10, 2013].
- Reiley, W.W. et al., 2008. ESAT-6-specific CD4 T cell responses to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection are initiated in the mediastinal lymph nodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(31), pp.10961–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2504808&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Riganti, C. et al., 2012. Human  $\gamma\delta$  T-cell responses in infection and immunotherapy: common mechanisms, common mediators? *European journal of immunology*, 42(7), pp.1668–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22806069> [Accessed November 10, 2013].
- Rindi, L., Lari, N. & Garzelli, C., 1999. Search for genes potentially involved in Mycobacterium tuberculosis virulence by mRNA differential display. *Biochemical and biophysical research communications*, 258(1), pp.94–101. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10222241> [Accessed November 10, 2013].
- Roach, D.R. et al., 2001. Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *The Journal of experimental medicine*, 193(2), pp.239–46. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193339&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Roca, F.J. & Ramakrishnan, L., 2013. TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species. *Cell*, 153(3), pp.521–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23582643> [Accessed November 10, 2013].
- Roepstorff, P. & Fohlman, J., 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical mass spectrometry*, 11(11), p.601. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6525415> [Accessed November 10, 2013].
- Rogers, P.R., Dubey, C. & Swain, S.L., 2000. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *Journal of*

- immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(5), pp.2338–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679068> [Accessed November 10, 2013].
- Rohde, K. et al., 2007. Mycobacterium tuberculosis and the environment within the phagosome. *Immunological reviews*, 219, pp.37–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17850480> [Accessed November 10, 2013].
- Rose, D.N., Schechter, C.B. & Adler, J.J., 1995. Interpretation of the tuberculin skin test. *Journal of general internal medicine*, 10(11), pp.635–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8583267> [Accessed November 10, 2013].
- Rosenkrands, I. et al., 2000. Mapping and identification of Mycobacterium tuberculosis proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis*, 21(5), pp.935–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10768780> [Accessed November 10, 2013].
- Rowen, L., Koop, B.F. & Hood, L., 1996. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5269), pp.1755–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8650574> [Accessed November 10, 2013].
- Russell, D.G. et al., 2009. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature immunology*, 10(9), pp.943–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2759071&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 12, 2013].
- Saito, S. & Nakano, M., 1996. Nitric oxide production by peritoneal macrophages of Mycobacterium bovis BCG-infected or non-infected mice: regulatory role of T lymphocytes and cytokines. *Journal of leukocyte biology*, 59(6), pp.908–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8691077> [Accessed November 10, 2013].
- Sakaguchi, S., 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology*, 22, pp.531–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032588> [Accessed November 10, 2013].
- Sakula, A., 1982. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax*, 37(4), pp.246–251.
- Salter, R.D. et al., 1990. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature*, 345(6270), pp.41–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2109837> [Accessed November 10, 2013].
- Sasiain, M.C. et al., 1998. Interferon-gamma (IFN-gamma) and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) are necessary in the early stages of induction of CD4 and CD8 cytotoxic T cells by Mycobacterium leprae heat shock protein (hsp) 65 kD. *Clinical and experimental immunology*, 114(2), pp.196–203. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1905104&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Schaible, U.E. et al., 2003. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nature medicine*, 9(8), pp.1039–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12872166> [Accessed November 10, 2013].

- Schaible, U.E. et al., 1998. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(3), pp.1290–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570546> [Accessed November 10, 2013].
- Schall, T.J. et al., 1993. Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 177(6), pp.1821–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2191042&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Scheibenbogen, C. et al., 2000. Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFNgamma-ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial. *Journal of immunological methods*, 244(1-2), pp.81–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11033021> [Accessed November 10, 2013].
- Schirle, M. et al., 2000. Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *European journal of immunology*, 30(8), pp.2216–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940913> [Accessed November 10, 2013].
- Schlesinger, L.S. et al., 1990. Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 144(7), pp.2771–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2108212> [Accessed November 11, 2013].
- Schnappinger, D. et al., 2003. Transcriptional Adaptation of Mycobacterium tuberculosis within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *The Journal of experimental medicine*, 198(5), pp.693–704. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2194186&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Schorey, J.S., Carroll, M.C. & Brown, E.J., 1997. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5329), pp.1091–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9262476> [Accessed November 10, 2013].
- Schroder, K. et al., 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*, 75(2), pp.163–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14525967> [Accessed November 8, 2013].
- Sendide, K. et al., 2004. Mycobacterium bovis BCG urease attenuates major histocompatibility complex class II trafficking to the macrophage cell surface. *Infection and immunity*, 72(7), pp.4200–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=427455&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 13, 2013].
- Shoji-Kawata, S. & Levine, B., 2009. Autophagy, antiviral immunity, and viral countermeasures. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(9), pp.1478–84. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2739265&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Sia, I.G. & Wieland, M.L., 2011. Current concepts in the management of tuberculosis. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, 86(4), pp.348–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21454737> [Accessed November 10, 2013].

- Skjøt, R.L.V. et al., 2002. Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10.4 and the two homologous proteins TB10.3 and TB12.9, which constitute a subfamily of the esat-6 gene family. *Infection and immunity*, 70(10), pp.5446–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=128304&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Smith, C.L. et al., 2005. Immunodominance of poxviral-specific CTL in a human trial of recombinant-modified vaccinia Ankara. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(12), pp.8431–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339586> [Accessed November 10, 2013].
- Smith, S.M. et al., 2000. Human CD8+ CTL specific for the mycobacterial major secreted antigen 85A. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(12), pp.7088–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11120838> [Accessed November 10, 2013].
- Snyder, J.T. et al., 2004. Protection against lethal vaccinia virus challenge in HLA-A2 transgenic mice by immunization with a single CD8+ T-cell peptide epitope of vaccinia and variola viruses. *Journal of virology*, 78(13), pp.7052–60. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=421672&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Soualhine, H. et al., 2007. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin secreting active cathepsin S stimulates expression of mature MHC class II molecules and antigen presentation in human macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(8), pp.5137–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911599> [Accessed November 13, 2013].
- De Souza, G.A. et al., 2011. Bacterial proteins with cleaved or uncleaved signal peptides of the general secretory pathway. *Journal of proteomics*, 75(2), pp.502–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21920479> [Accessed November 10, 2013].
- Stahl, P.D. & Ezekowitz, R.A., 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Current opinion in immunology*, 10(1), pp.50–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9523111> [Accessed November 10, 2013].
- Stalder, T., Hahn, S. & Erb, P., 1994. Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 152(3), pp.1127–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7507960> [Accessed November 10, 2013].
- Stanke, J. et al., 2010. A flow cytometry-based assay to assess minute frequencies of CD8+ T cells by their cytolytic function. *Journal of immunological methods*, 360(1-2), pp.56–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20558172> [Accessed March 14, 2013].
- Stenger, S. et al., 1998. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5386), pp.121–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9756476> [Accessed November 10, 2013].
- Stenger, S. et al., 1997. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5319), pp.1684–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9180075> [Accessed November 10, 2013].

- Stone, J.D., Demkowicz, W.E. & Stern, L.J., 2005. HLA-restricted epitope identification and detection of functional T cell responses by using MHC-peptide and costimulatory microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(10), pp.3744–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=553304&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Sturgill-Koszycki, S. et al., 1994. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5147), pp.678–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8303277> [Accessed November 11, 2013].
- Takayama, K. & Kilburn, J.O., 1989. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in Mycobacterium smegmatis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 33(9), pp.1493–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2817850> [Accessed November 10, 2013].
- Tameris, M.D. et al., 2013. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet*, 381(9871), pp.1021–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23391465> [Accessed November 10, 2013].
- Tang, S.T. et al., 2008. MHC-I-restricted epitopes conserved among variola and other related orthopoxviruses are recognized by T cells 30 years after vaccination. *Archives of virology*, 153(10), pp.1833–44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2784598&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Taub, D.D. et al., 1993. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5106), pp.355–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682337> [Accessed November 10, 2013].
- Taylor, G.M. et al., 2003. Koch's bacillus - a look at the first isolate of Mycobacterium tuberculosis from a modern perspective. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 11), pp.3213–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14600233> [Accessed November 10, 2013].
- Terajima, M. et al., 2003. Quantitation of CD8+ T cell responses to newly identified HLA-A\*0201-restricted T cell epitopes conserved among vaccinia and variola (smallpox) viruses. *The Journal of experimental medicine*, 197(7), pp.927–32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193889&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Terajima, M. et al., 2008. Vaccinia virus-specific CD8(+) T-cell responses target a group of epitopes without a strong immunodominance hierarchy in humans. *Human immunology*, 69(12), pp.815–25. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2638498&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Thomson, J.J., 1913. ON THE APPEARANCE OF HELIUM AND NEON IN VACUUM TUBES. *Science (New York, N.Y.)*, 37(949), pp.360–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17771650> [Accessed November 10, 2013].

- Torrelles, J.B. et al., 2008. Role of C-type lectins in mycobacterial infections. *Current drug targets*, 9(2), pp.102–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18288961> [Accessed November 10, 2013].
- Townsend, A.R. et al., 1986. The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell*, 44(6), pp.959–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2420472> [Accessed November 10, 2013].
- Trautwein, N., 2011. *Miniaturisierung und Optimierung der MHC-Präzipitation, Bestimmung des Epitopuntersuchungen von MHC Klasse II bindenden Antikörpern.*
- Tsai, M.C. et al., 2006. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cellular microbiology*, 8(2), pp.218–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16441433> [Accessed November 10, 2013].
- Turenne, C.Y., Wallace, R. & Behr, M.A., 2007. Mycobacterium avium in the postgenomic era. *Clinical microbiology reviews*, 20(2), pp.205–29. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1865596&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Urdahl, K.B., Shafiani, S. & Ernst, J.D., 2011. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. *Mucosal immunology*, 4(3), pp.288–93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3206635&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Vandal, O.H. et al., 2008. A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal Mycobacterium tuberculosis. *Nature medicine*, 14(8), pp.849–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2538620&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 11, 2013].
- Vogt, S. et al., 2003. Shortening of telomeres: Evidence for replicative senescence of T cells derived from patients with Wegener's granulomatosis. *Kidney international*, 63(6), pp.2144–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12753301> [Accessed November 10, 2013].
- WALLGREN, A., 1948. The time-table of tuberculosis. *Tubercle*, 29(11), pp.245–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18101320> [Accessed November 10, 2013].
- Walter, S. et al., 2012. Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nature medicine*, 18(8). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842478> [Accessed March 12, 2013].
- Wan, Y.Y., 2010a. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology*, 130(2), pp.166–71. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2878461&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 1, 2013].
- Wan, Y.Y., 2010b. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology*, 130(2), pp.166–71. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2878461&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].

- Watanabe, M. et al., 2001. Separation and characterization of individual mycolic acids in representative mycobacteria. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 7), pp.1825–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11429460> [Accessed November 10, 2013].
- Weinzierl, A.O. et al., 2007. Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 6(1), pp.102–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17074750> [Accessed November 10, 2013].
- Weinzierl, A.O. et al., 2008. Identification of HLA-A\*01- and HLA-A\*02-restricted CD8+ T-cell epitopes shared among group B enteroviruses. *The Journal of general virology*, 89(Pt 9), pp.2090–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18753217> [Accessed November 10, 2013].
- Weir, R.E. et al., 2006. The influence of previous exposure to environmental mycobacteria on the interferon-gamma response to bacille Calmette-Guérin vaccination in southern England and northern Malawi. *Clinical and experimental immunology*, 146(3), pp.390–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1810413&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Van der Wel, N. et al., 2007. M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*, 129(7), pp.1287–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17604718> [Accessed November 10, 2013].
- Whitehouse, C.M. et al., 1985. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical chemistry*, 57(3), pp.675–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2581476> [Accessed November 10, 2013].
- Wiker, H.G. & Harboe, M., 1992. The antigen 85 complex: a major secretion product of Mycobacterium tuberculosis. *Microbiological reviews*, 56(4), pp.648–61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=372892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Wilkinson, K.A. et al., 2005. Infection biology of a novel alpha-crystallin of Mycobacterium tuberculosis: Acr2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(7), pp.4237–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778386> [Accessed November 10, 2013].
- Willerford, D.M., Swat, W. & Alt, F.W., 1996. Developmental regulation of V(D)J recombination and lymphocyte differentiation. *Current opinion in genetics & development*, 6(5), pp.603–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8939716> [Accessed November 10, 2013].
- Winder, F.G. & Collins, P.B., 1970. Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of general microbiology*, 63(1), pp.41–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5500025> [Accessed November 10, 2013].
- Wolf, A.J. et al., 2008. Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *The*

- Journal of experimental medicine*, 205(1), pp.105–15. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2234384&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Wolf, A.J. et al., 2007. Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(4), pp.2509–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17675513> [Accessed November 10, 2013].
- Woodworth, J.S. et al., 2014. Protective CD4 T cells targeting cryptic epitopes of Mycobacterium tuberculosis resist infection-driven terminal differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(7), pp.3247–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24574499> [Accessed August 4, 2014].
- Xu, M. et al., 1994. Cathepsin B cleavage and release of invariant chain from MHC class II molecules follow a staged pattern. *Molecular immunology*, 31(10), pp.723–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8035834> [Accessed November 10, 2013].
- Ye, P. et al., 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *The Journal of experimental medicine*, 194(4), pp.519–27. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193502&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Yoshimori, T. & Noda, T., 2008. Toward unraveling membrane biogenesis in mammalian autophagy. *Current opinion in cell biology*, 20(4), pp.401–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18472412> [Accessed November 10, 2013].
- Yuan, Y. et al., 1998. The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in Mycobacterium tuberculosis. *Molecular microbiology*, 29(6), pp.1449–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+effect+of+oxygenated+mycolic+acid+composition+on+cell+wall+function+and+macrophage+growth+in+Mycobacterium+tuberculosis> [Accessed November 10, 2013].
- Zinkernagel, R.M. & Doherty, P.C., 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248(450), pp.701–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4133807> [Accessed November 10, 2013].
- Zúñiga-Pflücker, J.C. & Lenardo, M.J., 1996. Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Current opinion in immunology*, 8(2), pp.215–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8725945> [Accessed November 10, 2013].

# 8. Lebenslauf

Christina Christ geborene Kononenko

Geburtsdatum 01.09.1982  
Geburtsort Nerjungri, Russische Föderation  
Familienstand Ledig  
Nationalität Deutsch  
Aktuelle Position seit 10/2013 Entwickler neuer LC-MS Tests im Bereich klinische Diagnostik

## ARBEITSERFAHRUNG

---

10/2013 - Jetzt Entwickler neuer LC-MS Tests im Bereich klinische Diagnostik, Immundiagnostik AG, Bensheim  
Applikationsspezialist für Massenspektrometrie; *Bottom Up* und *Top Down*; Affinitätsaufreinigung; tryptischer Verdau  
01/2013 – 09/2013 Produkt Manager für gastro-enterologische Tests in klinischer Diagnostik, Immundiagnostik AG, Bensheim  
ELISA, Schnittstelle zwischen Entwicklung, Labor, Produktion, Export und Kunde, Literatur-Recherche, Besuch von Konferenzen

## HOCHSCHULBILDUNG

---

09/2009 – jetzt **Promotion**  
unter Anleitung von Professor Dr. Stefan Stevanovic  
Universität Tübingen, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie (UKT)  
Vorläufiger Titel: „Identifikation von natürlich prozessierten HLA Liganden von *Mycobacterium tuberculosis* mittels Massenspektrometrischer Analyse“  
06/2008 – 05.2009 **Diplomarbeit** (Gesamtnote 1,1)  
unter Anleitung von Prof. Dr. Birgit Schittek  
Universität-Hautklinik Tübingen, Dermatologische Onkologie  
„Untersuchungen zur von kommensalen und pathogenen Staphylokokken induzierten Expression von Zytokinen und Aktivierung von Signaltransduktionswegen in humanen Keratinozyten“ (Note 1,0)  
10/2005 – 05.2008 **Hauptstudium** der Biologie  
Universität Tübingen  
Zellbiologie und Immunologie als Hauptfach, Allgemeine Genetik und Medizinische Mikrobiologie in den Nebenfächern  
11/2003 – 09/2005 **Vordiplom** in der Biologie  
Universität Hohenheim

## SCHULBILDUNG

---

2003	Abitur (Gesamtnote 2,7)
09/1996 – 06/2003	Zeppelin Gymnasium, Stuttgart
01/1994 – 07/1996	Realschule Ostheim, Stuttgart
09/1989 – 12/1993	Grundschule Nerjungri, Russische Föderation