

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielstellung der Dissertation	7
2 Literaturübersicht	8
2.1 Tuberkulose in Vergangenheit und Gegenwart	8
2.2 Ätiologie der Tuberkulose	10
2.3 Gruppe der nicht-tuberkulösen Mykobakterien	11
2.4 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Komplex-Mykobakterien	13
2.5 Tuberkulose als Zoonose	15
2.6 Immunantwort des Wirtes auf die Tuberkulose	16
2.6.1 Angeborene Immunantwort.....	16
2.6.2 Adaptive Immunantwort auf Mykobakterien.....	21
2.7 Granulomatöse Entzündung durch <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
2.8 Aufbau der mykobakteriellen Zellwand	27
2.8.1 Immunmodulation durch mykobakterielle Lipid-Antigene	29
2.8.2 Ausgewählte mykobakterielle Lipopeptide und deren immunmodulierende Eigenschaften	32
3 Material und Methoden	36
3.1 Bakteriologische Arbeiten	36
3.1.1 Verwendete Bakterienstämme.....	36
3.1.2 Kultivierung der genutzten Bakterienstämme	36
3.1.3 Bestimmung der Kolonie-bildenden-Einheiten (KBE).....	37
3.2 Medien und Puffer	38
3.3 Antigene	38
3.3.1 Lösung der CME und Chromatographie-Proben in verschiedenen Medien	41
3.3.2 Vakuum-Evaporation mykobakterieller Präparate	41
3.3.3 Herstellung mykobakterieller Lysate	41
3.4 Experimente mit menschlichen Zellen	43
3.4.1 Verwendete Zelllinien.....	43
3.4.2 Humane Blutspender	43
3.4.3 Aufreinigung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus humanem Vollblut	43
3.4.4 Generierung von CD1 ⁺ -APCs	44
3.4.5 Generierung von T-Zell-Klonen mittels Grenzverdünnung	44
3.4.6 Restimulation von T-Zell-Klonen	45
3.4.7 Testung der Antigenpräparate im B2-Stimulationsassay.....	45
3.4.8 Analyse der Zellkulturüberstände mittels IFN-γ-ELISA.....	45
3.4.9 Herstellung der getesteten Antigenansätze	46
3.4.10 Inhibitions-Experimente	49
3.5 Tierversuche	51
3.5.1 Für Tierversuche verwendete Meerschweinchen	51
3.5.2 Haltung der Meerschweinchen	51
3.5.3 Vakzinierung der Meerschweinchen	51

3.5.4	Narkotisierung der Meerschweinchen.....	51
3.5.5	Gewinnung von Meerschweinchen-Vollblut.....	52
3.5.6	Isolation von Meerschweinchen-PBMCs	52
3.5.7	Euthanasie der Meerschweinchen.....	52
3.6	Flüssigchromatographische Aufreinigung.....	53
3.6.1	Normal-Phase-Chromatographie	53
3.6.2	Umkehrphase-Chromatographie.....	54
3.7	Zytologische Arbeiten und Serumaufarbeitung.....	55
3.7.1	Kryokonservierung von Zellen	55
3.7.2	Auftauen von Zellen	55
3.7.3	Bestimmung der Zellzahl	55
3.7.4	CFSE-Färbung von Zellen	55
3.7.5	FACS-Färbung von Zellen	56
3.7.6	Ex-vivo-CFSE-Proliferationsassay.....	56
3.7.7	Durchfluszytometrische Messung von Zellen	57
3.7.8	Auswertung von gemessenen FACS-Daten	57
3.7.9	Gamma-Bestrahlung von PBMCs.....	57
3.7.10	Gewinnung von autologem Meerschweinchen-Serum	57
3.8	Sequenzierung des B2-Restriktionselementes	58
3.8.1	RNS-Isolation aus antigenpräsentierenden Zellen	58
3.8.2	Reverse-Transkription von RNS-Proben in komplementäre DNS	58
3.8.3	Amplifizierung der DNS-Proben	59
3.8.4	Aufreinigung von DNS-Proben mittels Agarose-Gelektrophorese	61
3.8.5	Extraktion von DNS-Proben aus Agarose-Gelen.....	61
3.8.6	„Next-Generation“-Sequenzierung der cDNS-Proben	61
3.8.7	Ligation von DNS-Amplifikaten in den pGEM-T Easy-Plasmidvektor.....	62
3.8.8	Transformation des Plasmidvektors in kompetente <i>E. coli</i> -Bakterienzellen....	63
3.8.9	Sanger-Sequenzierung der aufgearbeiteten und transformierten Plasmide	64
3.9	Aufarbeitung der Proben für die Flüssigsäulen-Ionen-Mobilitäts-Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisation (LC-IMSE-MS).....	65
3.9.1	Tryptischer Verdau der Proben.....	65
3.9.2	LC-IMSE-MS-Messung	65
3.9.3	Auswertung der erhobenen LC-IMSE-MS-Daten	67
3.10	In-silico-Analyse von Nukleotidsequenzen und detektierten Proteinen	68
3.11	Statistische Analyse	69
4	Ergebnisse	70
4.1	Ex-vivo-Nachweis von MTK-reaktiven T-Zellen in humanen Blutspendern.....	70
4.1.1	FACS-Daten von nicht-reaktiven Spendern.....	71
4.1.2	FACS-Daten des Tuberkulin-reaktiven Spenders 3.....	72
4.2	Etablierung von humanen T-Zell-Klonen mit Reaktivität für MTK-Antigenpräparate.....	73
4.3	Uniformität des B2-T-Zell-Klons	76
4.4	Abhängigkeit der IFN- γ -Sezernierung vom B2-Klon und dem restringierenden Element.....	78
4.5	Abhängigkeit der Reaktivität des B2-T-Zell-Klons von MHC-Restriktionselementen	80

4.5.1	Identifizierung des MHC-Restriktionselement-Typs mit monoklonalen Antikörpern	80
4.5.2	Identifizierung des MHC-Restriktionselementes mittels „Next-Generation“-Sequenzierung der antigenpräsentierenden Zellen	82
4.5.3	Sangersequenzierung des Restriktionselementes	87
4.6	Charakterisierung des vom T-Zell-Klon B2 erkannten Antigens (B2-Antigen)	90
4.6.1	Vorkommen des Antigens innerhalb der Gattung <i>Mycobacterium</i>	90
4.6.2	Verdau und Verseifung des Total-Lipid-Extrakts	94
4.6.3	Veterinärmedizinisch-genutzte Tuberkuline	95
4.6.4	Metabolische Inaktivierung von Mykobakterien	96
4.7	Sedimentationseigenschaften des B2-Antigens	98
4.8	Untersuchungen zur Aufnahme und Prozessierung des B2-Antigens durch APCs	100
4.9	Flüssigchromatographische Aufreinigung des B2-Antigens	102
4.9.1	Antigenfraktionierung von CME mittels Stufengradienten	102
4.9.2	Drei- und zweistufige Flüssigchromatographie im Säulenformat	104
4.10	Ex-vivo-Testung von Chromatographie-Fraktionen	112
4.11	Reaktion des B2-T-Zell-Klons auf Kulturüberstände eines BCG-Wildtyps und einer Δ Lnt-BCG-Mutante	115
4.12	Massenspektrometrische Untersuchung des B2-Antigens	118
4.12.1	Trypsin-Verdau der reaktiven Proben zur Verbesserung der massenspektrometrischen Analyse	118
4.12.2	Analyse der RP-HPLC-Fraktionen mittels LC-IMSE-MS	121
4.12.3	In-silico-Analyse ausgewählter B2-Antigen-Kandidaten	128
5	Diskussion	137
5.1	Die Generierung antigenspezifischer T-Zell-Klone	137
5.2	Der B2-T-Zell-Klon	138
5.3	Biochemische Charakteristika des B2-T-Zell-Antigens	139
5.4	Die MHC-Präsentation des T-Zell-Antigens	140
5.5	Bildung des B2-T-Zell-Antigens durch die Mykobakterien	142
5.6	Die chromatographische Aufreinigung des B2-Antigens	145
5.7	Der Vergleich von BCG-Wildtyp und Δ Lnt-BCG-Mutante	146
5.8	Die Ex-vivo-Relevanz des B2-Antigens	148
5.9	Massenspektrometrische Identifizierung des B2-T-Zell-Antigens	149
5.10	In-silico-Untersuchungen an ausgewählten B2-Antigen-Kandidaten	150
6	Zusammenfassung	154
7	Summary	156
8	Literaturverzeichnis	159
9	Anhang	188
9.1	Nukleotidsequenzen der mittels „Next-Generation“-Sequenzierung bestimmten „Contigs“	188
9.2	Mittels LC-IMSE-Massenspektrometrie ermittelte Proteine	192
9.3	Medien, Puffer, Chemikalien, Laborgerät und andere Materialien	197
10	Abkürzungsverzeichnis	206

11	Abbildungsliste.....	210
12	Tabellenliste.....	213
13	Danksagung.....	215
14	Erklärung.....	218