

Role of innate immune triggers for the induction of poxviral T cell responses

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität

vorgelegt von

Gregor Ciupka

Remscheid, 25.09.2019

aus dem Institut für Virologie (AG Prof. Drexler)
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Ingo Drexler

2. Prof. Jürgen Scheller

Tag der mündlichen Prüfung: Düsseldorf, 02.07.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	5
2	Zusammenfassung.....	7
3	Einleitung.....	9
3.1	Vacciniavirus.....	9
3.1.1	Modified Vaccinia Virus Ankara.....	9
3.2	Replikationszyklus und Genexpression vom Vacciniavirus	11
3.3	Angeborene Immunität	15
3.3.1	Stimulator of interferon genes (STING).....	16
3.3.2	Toll-like Rezeptor 9 (TLR9).....	19
3.3.3	Interferon Typ-I Rezeptor (IFNAR).....	19
3.4	Adaptive Immunität	20
3.4.1	CD8 ⁺ T Zell-vermittelte Immunantwort.....	21
3.5	Direkte Antigenpräsentation.....	24
3.6	Kreuzpräsentation	25
3.6.1	Antigenkreuzpräsentierende Zellen	28
3.7	Zielsetzung.....	30
4	Material und Methoden.....	31
4.1	Material	31
4.1.1	Geräte	31
4.1.2	Chemikalien	33
4.1.3	Zytokine	35
4.1.4	Antikörper.....	35
4.1.5	Zellen	36
4.1.6	Mäuse	37
4.1.7	Virus.....	37
4.1.8	Vacciniavirus-spezifische Peptide.....	38
4.1.9	Sonstige Verbrauchsmaterialien	38
4.1.10	Software	39
4.2	Methoden.....	39
4.2.1	Molekularbiologische Arbeiten	39
4.2.2	Zellkultur.....	41
4.2.3	Virologische Arbeiten	43
4.2.4	Immunologische Arbeiten	44
4.2.5	Proteinbiochemische Arbeiten.....	52
5	Ergebnisse	55
5.1	<i>In vitro</i>	55
5.1.1	AraC Behandlung von Feeder-Zellen inhibiert die Kreuzpräsentation von frühen Antigenen.....	55
5.1.2	STING hat keinen Einfluss auf die direkte- sowie Kreuz-Präsentation.....	57
5.1.3	Die MVA-induzierte Produktion von Typ-I-Interferonen ist STING abhängig und araC beeinflusst stark die IFN-I-Induktion während der Kreuzpräsentation	59
5.1.4	Löslichen Faktoren haben keinen Einfluss auf frühe antigenspezifische CD8 ⁺ T-Zellaktivierung.	60

5.1.5	Die IFN-I-Induktion während der Kreuzpräsentation ist abhängig von STING in Feeder-Zellen.	64
5.1.6	STING in humanen <i>Feeder</i> -Zellen hat vermutlich keinen signifikanten Einfluss auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit von Vacciniavirus-spezifischen Antigenen	66
5.1.7	TLR9 in Antigen-präsentierenden Zellen haben keinen Einfluss auf die Aktivierung von CD8 ⁺ T-Zellen	67
5.1.8	Exklusiv STING und nicht IFNAR1 oder TLR9 beeinflusst die Reifung von Bystander-BMDCs während einer MVA-Infektion	68
5.1.9	Die Endozytoseaktivität sowie die Endosomenfunktionalität von BMDCs ist nicht STING-, TLR9- und IFNAR1-abhängig	70
5.1.10	IFN γ hemmt im gleichem Maße die Vacciniavirus-spezifische CD8 ⁺ T-Zellantwort wie araC	73
5.2	<i>In vivo</i>	76
5.2.1	Das Fehlen von STING resultiert in einem signifikanten Verlust der immundominanten B8R-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellantwort	77
5.2.2	TLR9 beeinflusst im hohen Maße die Entwicklung einer immundominanten B8R-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellantwort	80
6	Diskussion	83
6.1	STING moduliert die IFN-I Produktion hat jedoch keinen Einfluss auf die Vacciniavirus-spezifische CD8 ⁺ T-Zell Aktivierung während der direkten- bzw. Kreuzpräsentation <i>in vitro</i>	83
6.2	Lösliche Faktoren beeinflussen die späte jedoch nicht die frühe Vacciniavirus-spezifische CD8 ⁺ T-Zell Aktivierung	86
6.3	TLR9-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit und die CD8 ⁺ T-Zellantwort <i>in vitro</i>	88
6.4	Die Reifung von <i>Bystander</i> -BMDCs <i>in vitro</i> ist STING-abhängig und TLR9- sowie IFNAR1-unabhängig und hat keinen Einfluss auf die Endozytose-aktivität sowie -funktionalität	88
6.5	IFN γ inhibiert die Kreuzpräsentation von viralen Antigenen	90
6.6	Ein intaktes IFN- <i>Signaling</i> induziert über die STING- bzw. TLR9-Achse ist essentiell um <i>in vivo</i> eine potente CD8 ⁺ Immunität zu induzieren	91
7	Aktuelle Untersuchungen und Ausblick	95
8	Abbildungsverzeichnis	97
9	Tabellenverzeichnis	98
10	Abkürzungsverzeichnis	98
11	Anhang	101
11.1	Ergänzende Abbildungen	101
12	Literaturverzeichnis	110
	Erklärung	127

1 Abstract

Poxviruses include a family of complex DNA viruses that replicate in the cytoplasm of vertebrate or invertebrate cells. Attenuated recombinant poxvirus vectors expressing heterologous antigens from pathogens are currently tested at various stages in clinical trials. They have advantageous properties including acceptable safety profiles in animals and humans, proven immunogenicity without the need of an adjuvant and established procedures for large scale production. The understanding of the molecular interactions between the innate and the adaptive immune factors and the induction of a T cell-based immunity is the key for the development of therapeutic agents against certain diseases such as atherosclerosis, cancer or invasive fungal diseases.

The main objective was the identification of innate sensor and activation pathways in APCs (antigen-presenting cells) which modulate the quality and quantity of CD8⁺ T cell responses in poxviral infection.

Preliminary results revealed that cross-presentation of MVA-derived (Modified Vaccinia Ankara) antigens by uninfected DC (dendritic cells) strictly depends on the presence of viral DNA replication in infected cells which served as antigenic source. These findings indicate that a yet uncharacterized innate trigger derived from the infected cell is needed to license or activate a neighboring uninfected APC for cross-presentation.

Analyzing the influence of STING (stimulator of interferon genes) on the activation of CD8 T cells by cross- (and direct-) presentation of various VACV-specific (Vaccinia virus) antigens, we found no significant differences between STING knockout and wild-type BMDC (bone marrow-derived dendritic cells) used as APC. We could also exclude the role of a soluble factor in the supernatant of infected cells for cross-presentation.

However, investigations of the supernatant revealed that the production of Type-I interferon depended on STING. Inhibition of viral DNA replication also strongly affected the Type-I Interferon production in cross-presentation.

Importantly, we investigated the role of STING for the activation and cytotoxicity of anti-viral T cells *in vivo* using strain MVA. We could show significant differences in IFN γ -, TNF α -, CD107 α - and MIP1 α -induction for CD8 T cells responses (between STING knockout and wild-type mice). Following these findings, we revealed a significantly reduced number of virus-specific effector and effector memory CD8 T cells in STING knockout mice. Furthermore, we could exclude any impairment for the uptake or the degradation of

antigen in STING knockout BMDCs (bone marrow-derived dendritic cells). We showed also an influence of STING for bystander BMDC maturation.

Besides STING, we also investigated the role of TLR9 (Toll-like receptor 9) and IFNAR1 (interferon- α/β receptor 1) for a poxviral triggered CTL response. TLR9 is also a key player for shaping the quality of poxviral specific CD8 T cell responses in vivo. However, TLR9 had no influence on bystander BMDC maturation in vitro in contrast to STING.

On the other hand, IFNAR is responsible for a potent bystander BMDC maturation. Additionally, we could also exclude an influence of TLR9 or IFNAR1 for uptake and degradation of antigens in knockout BMDCs.

2 Zusammenfassung

Die Pockenviren (Poxviridae) umfassen eine Familie komplexer DNA-Viren, deren Replikation im Cytoplasma sowohl von Vertebraten- als auch von Invertebraten-Zellen stattfindet. Attenuierte rekombinante Pockenviren, die heterologe Antigene von Pathogenen exprimieren, befinden sich derzeit in verschiedenen Stadien klinischer Studien. Diese Vektoren besitzen diverse Vorteile, wie z.B. ein sehr geringes Sicherheitsrisiko beim Menschen, eine nachgewiesene Immunität ohne die Notwendigkeit der Gabe von Adjuvantien sowie etablierte Verfahren für eine Produktion im Industriemaßstab.

Eine detaillierte Untersuchung der molekularen Wechselwirkungen der angeborenen Immunfaktoren mit antigenpräsentierenden Zellen sowie die Initiierung einer CD8⁺ T-Zellimmunität sind daher ein wichtiger Schlüssel für das Verständnis der Interaktionen zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Sie bildet die Basis für die Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze, beispielsweise bei Atherosklerose, Krebs oder invasiven Pilzinfektionen.

Im Fokus der vorliegenden Forschungsarbeit steht die funktionelle Charakterisierung angeborener Immunfaktoren in antigenpräsentierenden Zellen, die sowohl die Qualität als auch die Quantität einer Vacciniavirus induzierten CD8⁺ T-Zellimmunität modulieren.

Vorangegangene Ergebnisse haben dargestellt, dass die Kreuzpräsentation von MVA-Antigenen (*Modified Vaccinia Ankara*) durch nicht-infizierte dendritische Zellen strikt von der viralen DNA-Replikation in infizierten antigenproduzierenden Zellen (sog. *Feeder-Zellen*) abhängt.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein noch unbekannter Stimulus in infizierten Zellen entsteht, der benötigt wird, um benachbarte nicht-infizierte Antigen-präsentierende Zellen für eine effiziente Kreuzpräsentation zu lizenzieren und zu aktivieren.

Die Analyse der Rolle von STING (*stimulator of inteferon genes*) bezüglich der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen nach der Kreuz- bzw. direkten Präsentation verschiedener Vacciniavirus-Antigene ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen STING-*Knockout* und STING-Wildtyp BMDC (*bone marrow-derived dendritic cells*). Ebenfalls konnte der Einfluss eines löslichen Faktors auf eine frühe antigenspezifische CD8⁺ T-Zellaktivierung ausgeschlossen werden.

Die Produktion von Typ-I-Interferonen stellte sich jedoch als STING-abhängig dar und zeigte überdies eine starke Abhängigkeit von einer intakten viralen DNA-Replikation in *Feeder*-Zellen.

In Hinblick auf die biologische Aktivität wurde die Rolle von STING bezüglich der Aktivierung und Zytotoxizität von antiviralen T-Zellen unter Verwendung des Stammes MVA *in vivo* untersucht. In diesem Kontext konnte eine signifikante Differenz in Bezug auf die Produktion von IFN γ -, TNF α -, CD107 α - und MIP1 α zwischen STING-*Knockout* und STING-Wildtyp Mäusen aufgezeigt werden. Daran anknüpfend war die Anzahl Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen beim STING-*Knockout* Genotyp signifikant reduziert.

Des Weiteren konnte jegliche Beeinträchtigung der Endozytoseaktivität sowie der Endosomenfunktionalität in STING^{-/-} BMDCs ausgeschlossen werden. Ferner beeinflusste STING zudem die Reifung von *Bystander*-BMDC.

Neben dem Adaptor STING wurde der Einfluss von TLR9 (*Toll-like receptor 9*) und IFNAR1 (*interferon- α/β receptor 1*) hinsichtlich einer Vacciniavirus-induzierten CD8⁺ T-Zellantwort untersucht. Wie STING, spielt TLR9 eine entscheidende Rolle bei der intakten Aktivierung einer B8R-spezifischen CD8⁺ T-Zellimmunantwort.

Dies lässt konkludieren, dass sowohl der STING- als auch der TLR9-Signalweg für die Qualität der CD8⁺ T-Zellantwort während einer Pockenvirusinfektion *in vivo* verantwortlich ist. Konträr zu STING hatte TLR9 jedoch keinen Einfluss auf die Reifung von *Bystander*-BMDCs *in vitro*.

Demgegenüber ist IFNAR1, wie auch STING, im ähnlichen Maße für eine potente Reifung von *Bystander*-BMDCs verantwortlich.

Darüber hinaus konnte jegliche Restriktion der Endozytoseaktivität und der Endosomenfunktionalität bei TLR9- sowie IFNAR1-BMDCs ausgeschlossen werden.

3 Einleitung

3.1 Vacciniavirus

Das Vacciniavirus (VACV) ist ein Mitglied der Gattung *Orthopoxvirus* und gehört zur Familie der *Poxviridae*. Die Viruspartikel sind komplex aufgebaut und besitzen eine doppelsträngige DNA die zwischen 180 – 280 Kilobasen lang ist. Die Replikation findet, im Gegensatz zu anderen DNA-Viren, mit eigenen Replikationsenzymen im Zytoplasma statt [Moss 2007].

3.1.1 Modified Vaccinia Virus Ankara

Das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) wurde durch seriell Passagieren in Hühnerembryofibroblasten (engl.: *chicken embryo fibroblasts* (CEF)) vom *Chorioallantois Vacciniavirus Ankara* (CVA) abgeleitet [Mayr *et al.* 1964; Mayr *et al.* 1978]. Von 1968 bis 1985 produzierte die Bayerische Landesimpfanstalt das MVA-Virus als humanen Pockenimpfstoff. Ergebnisse einer großen Feldstudie mit mehr als 120.000 Individuen hat aufgezeigt, dass die Nebenwirkungen bei Anwendung des MVA-Impfstoffs im Vergleich zu einer konventionellen Pockenimpfung deutlich gesenkt werden [Stickl *et al.* 1974].

Das serielle Passagieren in primären und sekundären Hühnerembryofibroblasten führte zu großen Deletionen und zahlreichen Mutationen im viralen Genom, welche Vacciniaviralen Virulenz- und Immunevasionsfaktoren beeinflussen z.B. Gene, die mit den Wirtsrezeptoren für Interferon- γ , Interferon- α/β und CC-Chemokine interagieren [Meyer *et al.* 1991; Antoine *et al.* 1998; Drexler *et al.* 2003; Meisinger-Henschel *et al.* 2010].

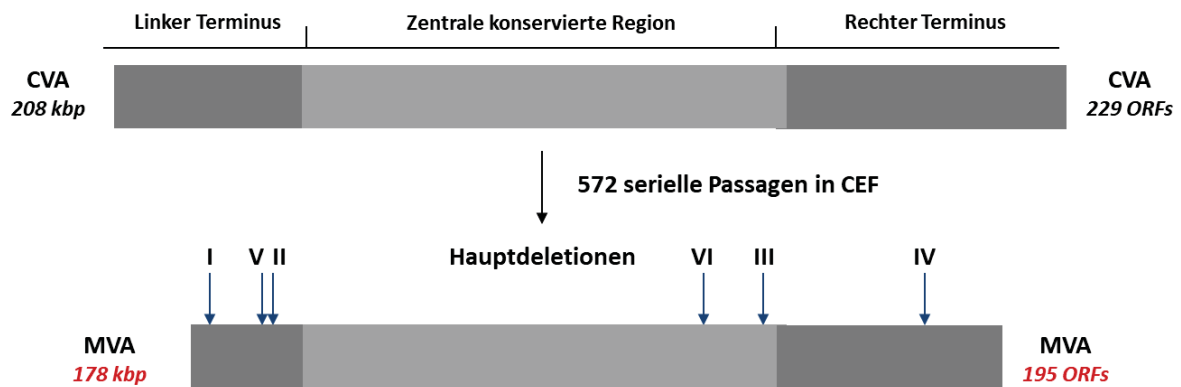


Abb. 1: Schematische Darstellung des CVA und MVA Virusgenoms (modifiziert nach Drexler)
 Dargestellt ist die schematische Architektur des Chorioallantois Vaccinia Virus Ankara (CVA) und des Modifizierten Vaccinia Virus Ankara (MVA). Das attenuierte MVA Virus wurde nach 572 Passagen vom CVA in Hühnerembryofibroblasten generiert. Dabei verlor es etwa 15% des Genoms im Vergleich zum CVA-Stamm und ist etwa 178 kb lang. Sechs große genomische Deletionen wurden identifiziert sowie viele kürzere Deletionen, Insertionen und Punktmutationen. MVA hat dadurch viele Gene verloren oder inaktiviert wie z. B. viele pockenvirale Immunevasions- und Virulenzfaktoren.

Folglich ist die Replikation von MVA auf CEF-Zellen (*chicken embryo fibroblasts*) beschränkt und das Virus ist nicht in der Lage infektiöse Nachkommen in den meisten Säugetierzellen zu produzieren [Carroll *et al.* 1997; Drexler *et al.* 1998].

Kurz nach der Eradikation der Pocken wurde gezeigt, dass homologe Rekombination, die häufig zwischen dem VACV-Genomen innerhalb einer infizierten Zelle stattfindet, als Methode genutzt werden kann, um Fremd-DNA in das Virusgenom zu inserieren [Wittek *et al.* 1980; Wittek *et al.* 1980; Mackett *et al.* 1982; Panicali *et al.* 1982]. Diese Technologie ermöglichte die Entwicklung neuer rekombinanter Impfstoffe, um die Auswirkungen verschiedener Infektionskrankheiten zu verringern. In den folgenden Jahren wurde replikationskompetentes rekombinantes VACV erfolgreich in der Veterinärmedizin eingeführt, wie es rekombinante VACV-Impfstoffe gegen Tollwut bewiesen haben [Blancou *et al.* 1986; Esposito *et al.* 1987].

Die Impfung von Menschen blieb jedoch aufgrund der bekannten Nebenwirkungen vom VACV-Pockenimpfstoff aus. Unter diesen Umständen hat die Verfügbarkeit von replikationsdefizientem VACV, wie NYVAC oder MVA, die Etablierung von außergewöhnlich sicheren Pockenvirusvektoren der nächsten Generation begünstigt [Sutter *et al.* 1992; Tartaglia *et al.* 1992].

In jüngerer Zeit wurden alternative Verfahren eingeführt, um Pockenvirusgenome zu konstruieren. Die gesamte VACV- und MVA-Genome wurden als bakterielle künstliche Chromosome (engl.: *bacterial artificial chromosomes* (BAC)) kloniert. Diese wurden in *E. Coli* durch homologe Rekombination, mit Hilfe von Bakteriophagen-Lambda-Enzymen, hergestellt [Domi *et al.* 2002; Domi *et al.* 2005; Cottingham *et al.* 2008]. Die modifizierten BAC-Klone können verwendet werden, um reines rekombinantes Pockenvirus in Säugerzellen mit der initialen Assistenz eines Helfervirus herzustellen, jedoch ohne einer weiteren Plaquereinigung. Eine weitere aktuelle Methode, die noch an die Konstruktion von rekombinantem MVA adaptiert werden muss, stellt das CRISPR-Cas9-System dar, um alternative Gensequenzen in das VACV-Genom einzufügen [Yuan *et al.* 2015].

Im Jahr 2013 erteilten die Europäische Arzneimittelagentur und Canada Health die Genehmigung für das Inverkehrbringen eines MVA-Impfstoffs zur Immunisierung gegen eine VARV-Infektion in Abwesenheit von natürlichen Pocken oder natürlich vorkommenden VARV (EMA/490157/2013). Ferner gehören rekombinante MVA-Viren, die verschiedene heterologe Antigene exprimieren, zu den vielversprechendsten Vektorkandidaten, um innovative Impfstrategien zum Schutz vor komplexen Infektionen wie HIV, Tuberkulose, Malaria oder gegen seltene aber bedrohliche neu auftretende Krankheiten wie z.B. Ebola zu entwickeln [Ewer *et al.* 2013; Kapulu *et al.* 2015; Munseri *et al.* 2015; Nilsson *et al.* 2015; Sheehan *et al.* 2015; Ewer *et al.* 2016; Tapia *et al.* 2016].

3.2 Replikationszyklus und Genexpression vom Vacciniavirus

Der vacciniavirale Replikationszyklus weist eine komplexe Morphogenese auf. Es existieren drei infektiöse Formen von Viruspartikeln: *mature virions* (MV), *wrapped virions* (WV) und *extracellular virions* (EV). Bei der EV-Form wird die äußere Membran zerstört und ermöglicht so, dass die dadurch vorliegende MV-Form direkten Kontakt zur Plasmamembran hat und so in die Wirtszelle gelangt. Die direkte MV-Form fusioniert mit ihrer MV-Membran und der Wirtsmembran und setzt somit das Kapsid zusammen mit den *lateral bodies* ins Zytosol frei [Armstrong *et al.* 1973; Carter *et al.* 2005]. Für die Bindung an die Zellmembran sind die MV-Proteine A26, A27, D8 und H3 verantwortlich. Des Weiteren bilden die Proteine A16, A21, A28, G3, G9, H2, J5, L5 und O3 den sog. *entry fusion complex* (EFC) welcher für den Zelleintritt verantwortlich ist [Moss 2007]. Ferner werden beide Formen via virus-induzierter Makropinozytose internalisiert

[Huang *et al.* 2008; Mercer *et al.* 2008; Schmidt *et al.* 2011]. Das Aufbrechen der Viruskapside erfolgt in zwei Schritten.

Zunächst durchlaufen sie morphologische Veränderungen. Das Kapsid erweitert sich und nimmt eine ovale Morphologie an [Dales 1963; Hollinshead *et al.* 1999; Cyrklaff *et al.* 2007]. Die Transkription der frühen viralen Gene wird im Kapsid initiiert; die Transkripte werden freigesetzt und ca. 80 verschiedene Proteine im Zytosol translatiert [Yang *et al.* 2009]. Der zweite Kapsidöffnungsschritt ist das eigentliche Aufbrechen des Kapsids: Das virale Genom wird ins Zytosol freigesetzt und das Kapsid wird zerlegt [Joklik 1964a; Schmidt *et al.* 2012]. Dieser Schritt, der für die Replikation der viralen DNA benötigt wird, erfordert die Expression von frühen viralen Proteinen sowie die Aktivität von Wirtsfaktoren einschließlich des Proteasoms [Joklik 1964b; Mercer *et al.* 2012], welches auch für die virale DNA-Replikation benötigt wird [Satheshkumar *et al.* 2009; Teale *et al.* 2009].

Die Genexpression ist zeitlich so programmiert, dass sie in drei aufeinanderfolgenden Stadien vorkommt: die frühe (118 ORFs), intermediäre (53 ORFs) und späte (38 ORFs) Genexpression [Baldick *et al.* 1993; Yang *et al.* 2013]. Frühe Gene werden mit Hilfe von Proteinen transkribiert, die während der späten Infektionsphase synthetisiert und in neu assemblierte Viruspartikel verpackt wurden [Broyles *et al.* 1988; Broyles *et al.* 1990; Gershon *et al.* 1990; Yang *et al.* 2013].

Intermediäre und späte Gene werden nach der Genomreplikation transkribiert und erfordern die sukzessive Synthese von intermediären bzw. späten viralen Transkriptionsfaktoren [Keck *et al.* 1990; Sanz *et al.* 1999]. Die Diskriminierung zwischen intermediären post-replikativen und späten post-replikativen Transkripten ist aufgrund ihrer nahezu gleichzeitigen Synthese schwierig. Weiterführend hat die Analyse von individuellen Genen zudem eine Tandemexpression von frühen und postreplikativen Genen aufgezeigt [Cochran *et al.* 1985; Rosel *et al.* 1986; Vos *et al.* 1988].

Ferner ist zu erwähnen, dass die gesamte Genomreplikation sowie die erste virale Teilassemblierung in separierten Kompartimenten stattfindet, in den sogenannten *viral factories* [Cairns 1960; Dahl *et al.* 1970; Katsafanas *et al.* 2007]. Diese *viral factories* werden etwa zwei Stunden nach der Infektion im Zytoplasma der Zelle gebildet [Schramm *et al.* 2006]. Frühere Berichte beschreiben die *viral factories* als ungebundene Kompartimente im Zytoplasma [Dales *et al.* 1961; Dales *et al.* 1964].

Neuere Studien haben jedoch aufgezeigt, dass die *viral factories* initial als kompakte Strukturen vorkommen, die von endoplasmatischen Retikulum-Membranen umgeben sind. Ferner findet die Koaleszenz der *viral factories* und der Verlust der ER-Membran zu einem späteren Zeitpunkt statt [Tolonen *et al.* 2001; Doglio *et al.* 2002; Katsafanas *et al.* 2007; Lin *et al.* 2010]. Die bereits erwähnte Teilassemblierung meint die Inkorporation von viraler DNA in unreife Virionen (*immature virions* = IVs). Erwähnenswert ist hierbei, dass in Säugerzellen MVA an diesem Punkt der Morphogenese nicht weiter ausreift. Bei anderen Vacciniastämmen, die in Säugerzellen replizieren, maturieren IVs zu infektiösen *intracellular mature virions* (IMVs) und werden aus den *viral factories* mittels Mikrotubuli und dem A27 Protein transportiert [Sanderson *et al.* 2000].

Das IMV ist von nur einer Membran umgeben. Bis zur Zelllyse verbleibt das Virus innerhalb der Zelle. Das andere umhüllte Virus (engl.: *wrapped virion* (WV)) ist von einer zweiten Membran umhüllt und wird vor dem Zelltod aus der Zelle exportiert. Während das Virion auf der Zelloberfläche zurückgehalten wird, wird es als *cell-associated enveloped virus* (CEV) bezeichnet. Sobald es von der Zelloberfläche gelöst wird, wird das Virion als *extracellular enveloped virus* (EEV) beschrieben [Condit *et al.* 2006]. IMV und EEV besitzen unterschiedliche virale Proteine in der Hülle und sind somit strukturell, antigenisch und funktionell different. Die CEV- und EEV-Formen sind für die Verbreitung wichtig. CEVs induzieren Actin-Ausstülpungen der Zellmembran, die die CEV-Partikel näher zu nicht infizierten Zellen führen. EEVs hingegen vermitteln eine langfristige und weitreichendere Dissemination *in vitro* und wahrscheinlich auch im Wirt [Payne *et al.* 1985; Condit *et al.* 2006]. Zusätzlich zu Ihrer Aufgabe bei der Virusdissemination spielen CEVs und EEVs bei der Immunevasion eine wichtige Rolle. Die Umhüllung des Virus mit der Wirtsmembran hilft dem Vacciniavirus, sowohl dem Komplementsystem als auch Antikörpern auszuweichen. Das IMV besitzt mehrere Proteine, insbesondere A27 und H3, die Ziele für die Neutralisierung durch Antikörper sind. Das einzige EEV-Protein, welches neutralisierende Antikörper induziert, ist das B5 [Putz *et al.* 2006].

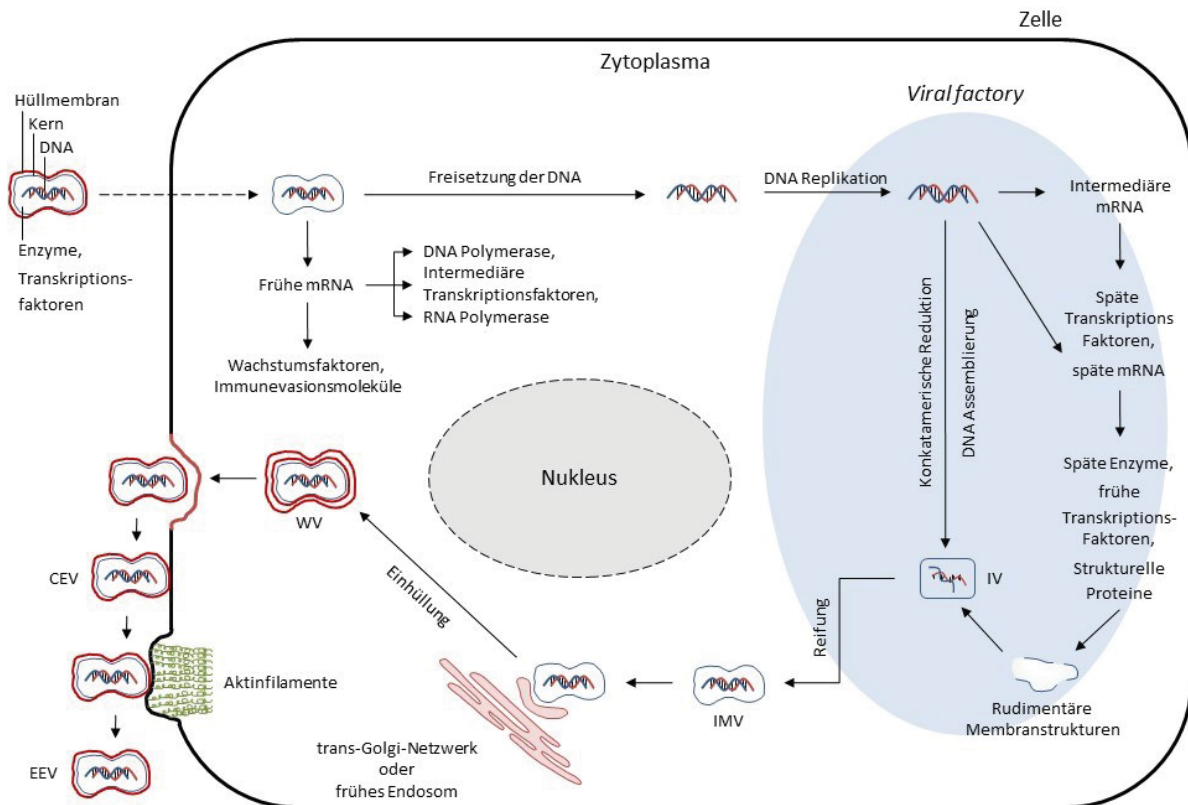


Abb. 2: Replikationszyklus vom Vacciniavirus (modifiziert nach [Moss 2007])

Das Virion bindet an die Zelle und fusioniert mit der Zellmembran, wodurch der Kern Enzyme sowie Transkriptionsfaktoren ins Zytoplasma freisetzt. Die Kerne synthetisieren die frühe mRNAs, die in eine Vielzahl von Proteinen translatiert werden, unter anderem Wachstumsfaktoren, Immunevasionsmoleküle, Enzyme und Faktoren zur DNA Replikation sowie zur intermediären Transkription. Folgend wird das Genom über den Schritt des „uncoatings“ freigesetzt und die DNA wird repliziert, um konkatermere Moleküle zu generieren. Intermediäre Gene werden transkribiert und die mRNAs werden translatiert, um die späten Transkriptionsfaktoren zu bilden. Die späten Gene werden transkribiert und die mRNAs werden zu Virionsstrukturproteinen, Enzymen und frühen Transkriptionsfaktoren translatiert. Der Zusammenbau des Viruspartikels beginnt mit rudimentären Membranstrukturen. An diesem Schritt stoppt der Replikationszyklus von MVA. Das konkatermere DNA-Zwischenprodukt wird in ein Einheitsgenom assembliert und in unreife Virionen (IV) verpackt. Die weitere Assemblierung verläuft über das „reife“ Viruspartikel (IMV). Diese Viruspartikel werden von modifizierten trans-Golgi- und endosomalen-Zisternen umhüllt. Diese umhüllten Viren (WV) werden über Mikrotubuli in die Peripherie der Zelle transportiert. Die Fusion der WVs mit der Plasmamembran führt zur Freisetzung extrazellulärer Virionen (EEV).

3.3 Angeborene Immunität

Das angeborene Immunsystem ist ein hochkonserviertes evolutionäres System, welches als erste Verteidigungslinie gegen exogene und endogene Bedrohungen für den Organismus fungiert. Diese Bedrohungen können unter anderem pathogene Infektionen, Gewebeschäden oder entartete Zellen sein. Dies umfasst diverse Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen und angeborene lymphatische Zellen [Akira *et al.* 2006; Beutler *et al.* 2007; Medzhitov 2007]. Besonders anzumerken ist hier, dass das angeborene Immunsystem nicht nur chronologisch dem hochspezialisierten adaptiven Immunsystem vorausgeht, sondern auch die langanhaltende immunologische Gedächtnisfunktion der adaptiven Immunität unterstützt. Dies geschieht zum Teil unter Hilfe von Antigen-präsentierenden Zellen (engl.: *antigen-presenting cells* (APCs)), die dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden und mit adaptiven Immunkomponenten, wie B- und T-Zellen, interagieren [Medzhitov *et al.* 1997; Medzhitov 2007; Abbas *et al.* 2015]. Wirtszellen erkennen über das angeborene Immunsystem die Invasion von Viren und initiieren und manifestieren starke antivirale Reaktionen.

Viren aktivieren mit ihren Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (engl.: *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMP)) angeborene Immunsystemkomponenten über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (engl.: *Pattern-Recognition-Receptors* (PRR)) [Iwasaki *et al.* 2010]. Die Hauptfamilien der PRRs bilden die Toll-Like-Rezeptoren (TLR), die NOD-Like-Rezeptoren (NLR), die RIG-I-Like-Rezeptoren (RLR), Zytoplasmatische DNA Sensoren (CDS), die C-Type-Lectin-Rezeptoren (CLR) und die Inflammasome [Medzhitov 2007; Iwasaki *et al.* 2010; Dai *et al.* 2014]. Die Detektion von viralen Komponenten über PRRs, wie TLRs oder CDSs, aktivieren intrazelluläre Signalkaskaden, welche unter anderem zur Sekretion von Typ-I-Interferonen (IFN- α , - β , - ϵ , - κ , - τ , - δ , - ζ , - ω , - ν), proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und einer erhöhten Expression von kostimulatorischen Molekülen, wie CD40, CD80 und CD86, führen [Takeuchi *et al.* 2010]. Ferner aktivieren die Typ-I-Interferone weitere intrazelluläre Signalwege und regulieren die Expression einer Vielzahl von Genen. Diese IFN-induzierbaren Gene, wie z.B. die Proteinkinase R und die 2'5'-Oligoadenylat-Synthase, sind an der Eliminierung viraler Komponenten in infizierten Zellen beteiligt. Darüber hinaus induzieren die Genprodukte Apoptose und verleihen noch nicht infizierten Zellen eine Resistenz gegen die Infektion [Akira *et al.* 2006; Iwasaki *et al.* 2010; Takeuchi *et al.* 2010]. Typ-I-Interferone werden nicht nur von Zellen des angeborenen

Immunsystems, wie dendritischen Zellen und Makrophagen, produziert, sondern auch von nicht-professionellen Zellen, wie Fibroblasten. Proinflammatorische Zytokine und Chemokine sind ebenfalls kritisch für die Eliminierung von Virusinfektionen, indem sie Entzündungen hervorrufen und Zellen des angeborenen sowie adaptiven Immunsystems rekrutieren. Kostimulatorische Moleküle sind für die Aktivierung von naiven T-Zellen essentiell und führen zur erworbenen Immunreaktion [Medzhitov *et al.* 1997; Ishikawa *et al.* 2008; Dai *et al.* 2014; Abbas *et al.* 2015].

3.3.1 Stimulator of interferon genes (STING)

Wie bereits erwähnt, fungiert das angeborene Immunsystem als erste Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene, wie z. B. Bakterien und Viren. In diesem Kontext erkennt cGAS/STING Fremd-DNA von Bakterien und Viren sowie Eigen-DNA, die durch zelluläre Dysfunktion und Zellstress ausgetreten ist [Goubau *et al.* 2013; O'Neill 2013].

Die zyklische GMP-AMP-Synthase (cGAS) ist für angeborene Immunsensoren untypisch, da sie gleichzeitig als Rezeptor und als biosynthetisches Enzym fungiert [Kranzusch *et al.* 2013; Sun *et al.* 2013]. Nach der Bindung von doppelsträngiger DNA (dsDNA) an die Zinkfingerdomäne der cGAS rearrangiert sich die aktive Seite der cGAS und ermöglicht die Synthese von dem sekundären Messenger cGAMP (engl.: *cyclic GMP-AMP*). Das zyklische GMP-AMP ist ein Mitglied der kleinen Familie der zyklischen Dinukleotiden (engl.: *cyclic dinucleotides* (CDNs)) [Civril *et al.* 2013; Gao *et al.* 2013; Kranzusch *et al.* 2013; Li *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2014]. CDNs wurden zunächst in Bakterien beschrieben [Ross *et al.* 1987]. Die von cGAS produzierte CDN ist das einzige bekannte Säugetier-CDN und unterscheidet sich von bakteriellen CDNs durch eine nicht-kanonische 2'-5' Phosphodiesterbindung (verbindet das Nukleotid G → A) und einer nicht-kanonischen 3'-5' Phosphodiesterbindung (verbindet A → G) [Ablasser *et al.* 2013; Diner *et al.* 2013; Gao *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013]. Aus diesem Grund wird das cGAS-Produkt häufig 2'3'-cGAMP benannt, um es vom bakteriellen 3'3'-cGAMP zu differenzieren. 2'3'-cGAMP aktiviert die IFN-I-Signalkaskade über einen ER-residenten Homodimer-Rezeptor namens *stimulator of interferon genes* (STING). Die Fähigkeit eines einzelnen cGAS-Enzyms mehrere cGAMP-Moleküle zu produzieren stellt einen Mechanismus bereit, der bereits durch geringe Mengen zytosolischer DNA eine sich schnell verstärkende Immunantwort erzeugen kann [Ishikawa *et al.* 2008; Ablasser *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013].

STING ist aus vier Transmembrandomänen sowie aus einer CDN-bindenden Domäne, die prädisponiert ins Zytosol gerichtet ist, aufgebaut [Burdette *et al.* 2013]. Ferner weist die CDN-bindende Domäne eine einzigartige Faltung auf, die strukturell zu keinem anderen bekannten Protein homolog ist [Huang *et al.* 2012; Ouyang *et al.* 2012; Shang *et al.* 2012; Shu *et al.* 2012]. Zudem deuten biochemische Analysen stark darauf hin, dass Apo-STING in Abwesenheit eines Liganden bereits als vorgebildetes Dimer vorliegt [Huang *et al.* 2012; Burdette *et al.* 2013; Yi *et al.* 2013]. Daraus folgend scheint somit der Mechanismus, wodurch die cGAMP-Bindung STING aktiviert, keine Dimerisierung zu sein, sondern eine Konformationsreorganisation der „Deckelstruktur“ und der C-terminalen Domäne von STING. Diese Konformationsänderung erlaubt die Rekrutierung der TBK1-Kinase (engl.: *TANK-binding kinase 1*), welche die C-terminale Domäne von STING phosphoryliert und somit zur weiteren Rekrutierung des Transkriptionsfaktors IRF3 (engl.: *interferon regulatory factor 3*) führt [Liu *et al.* 2015; Chen *et al.* 2016]. Im weiteren Verlauf phosphoryliert TBK1 IRF3, wodurch IRF3-Dimere gebildet und in den Nukleus transloziert werden. Im Nukleus vermittelt IRF3 die Transkription von IFN- β und anderen koregulierten Genen. Ferner ist zu erwähnen, dass STING weitere Faktoren induzieren kann, wie beispielsweise über den NF- κ B-, den MAP-Kinase- sowie den STAT6-Signaltransduktionsweg [McWhirter *et al.* 2009; Chen *et al.* 2011; Abe *et al.* 2014]. Weitere Forschungen haben zudem aufgezeigt, dass STING die Bildung von LC3-*Puncta* stimuliert, ein Kennzeichen, welches häufig mit der Autophagosomenbildung assoziiert ist [Saitoh *et al.* 2009; Rasmussen *et al.* 2011; Khatif 2017]. Darüber hinaus unterliegen cGAS und STING einer extensiven Regulation durch posttranslationale Modifikationen und Interaktionen mit anderen Proteinen [Chen *et al.* 2011]. Dies indiziert eine enge Regulation des cGAS/STING-Signalweges. Nach der Signalfunktion wird STING schnell, lysosomal oder möglicherweise über den ULK1/ATG1-Weg, autophagolysosomal abgebaut [Konno *et al.* 2013; Khatif 2017].

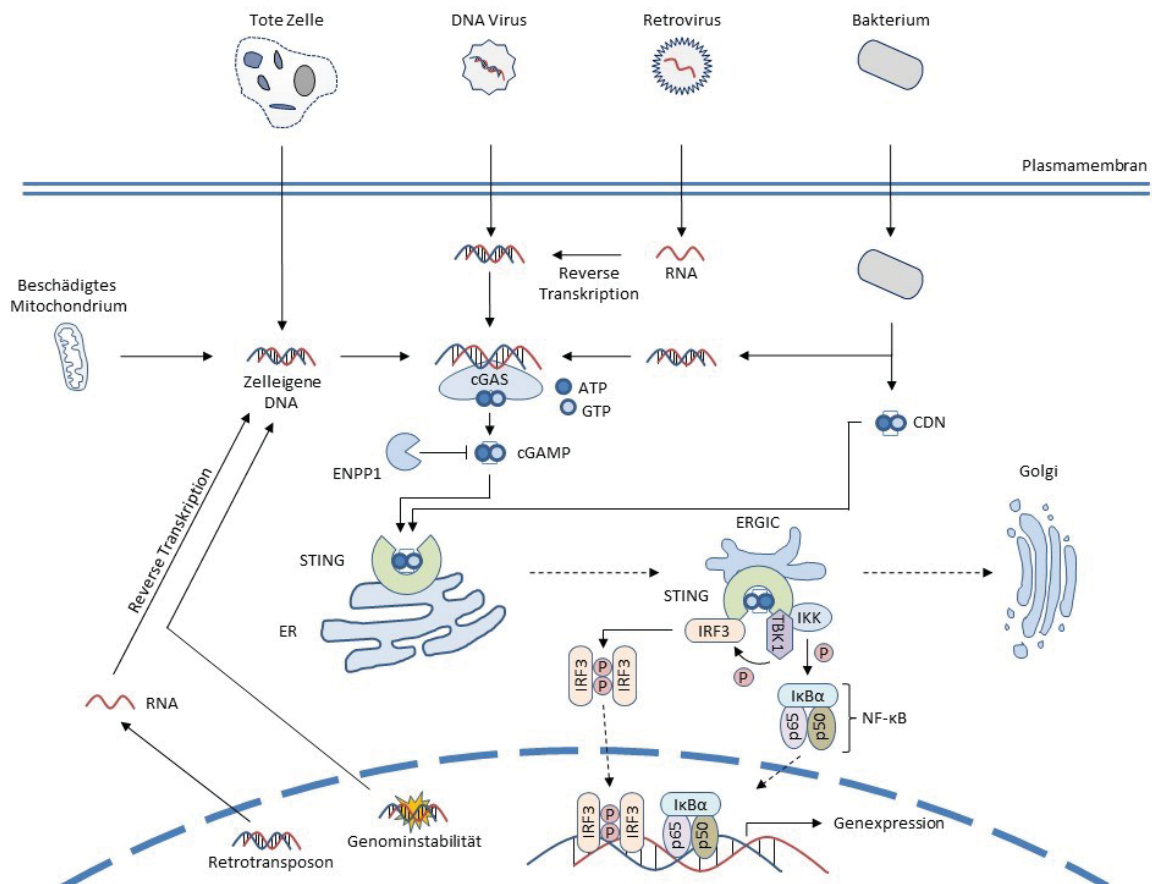


Abb. 3: Der cGAS/STING Signalweg (modifiziert nach [Chen *et al.* 2016])

Die DNA kann zu einem Pathogen-assoziierten molekularen Muster werden, sobald sie über eine Infektion in das Zytoplasma gelangt. Ferner ist die DNA ein Gefahr-assoziiertes molekulares Muster, wenn es aus dem Zellkern (z.B. durch DNA-Schäden oder reverse Transkription von Retroviruselementen), aus den Mitochondrien oder durch Aufnahme von toten Zellen ins Zytoplasma gelangt. Zytosolische DNA bindet und aktiviert cGAS, welches die Synthese von 2'3'-cGAMP aus ATP und GTP katalysiert. 2'3'-cGAMP bindet an das ER-lokalisierte Protein STING. STING transloziert zum ER-Golgi-Zwischenkompartiment (engl.: *ER-Golgi intermediate compartment* (ERGIC)) sowie zum Golgi-Apparat. Dort aktiviert STING das Protein IKK und TBK1. TBK1 phosphoryliert STING, was zur Rekrutierung und Phosphorylierung (mittels TBK1) von IRF3 führt. Dimerisiertes und gleichzeitig phosphoryliertes IRF3 transloziert in den Nukleus und induziert, zusammen mit NF-κB, die Expression von Typ-I-Interferonen und anderen immunomodulatorischen Molekülen.

3.3.2 Toll-like Rezeptor 9 (TLR9)

Bis heute wurden 13 verschiedene TLRs identifiziert: 10 im Menschen und 12 in Mäusen. Jeder TLR erkennt unterschiedliche molekulare Muster von Viren, Bakterien und endogenen Komponenten. Forschungen haben gezeigt, dass die TLR 1, 2, 4, 5 und 6 auf der Plasmamembran exprimiert werden, während TLR 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 13 fast ausschließlich in den endosomalen Kompartimenten aufzufinden sind [Kawai *et al.* 2010]. TLR9 ist der einzige Rezeptor in dieser Familie, der ein unmethyliertes Cytosin-Phosphat-Guanin-Motiv (CpG-Motiv) erkennt. Da bakterielle und virale DNA viele CpG-Motive enthalten können, sind TLR9-vermittelte Antworten ein wichtiger Verteidigungsweg gegen die Invasion solcher Pathogene [Hemmi *et al.* 2000; Krieg 2003; Krug *et al.* 2004]. TLR9 wird in den Endosomen verschiedener Säugertierzellen einschließlich plasmazytoider dendritischer Zellen (engl.: plasmacytoid dendritic cells (pDCs)) und B-Zellen exprimiert [Latz *et al.* 2004]. Nach der zellulären Aufnahme und Einlagerung in Endosomen bindet die CpG-reiche DNA an TLR9 und induziert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (z.B. IFN-I, IL-6, TNF, IL-12), primär über das MyD88-Adaptorprotein. MyD88 verbindet TLR9 mit Kinasen der IL-1R-assoziierten Kinase (IRAK)-Familie. Die Verbindung erfolgt mittels einer homotypischen Protein-Protein-Wechselwirkung und aktiviert über multifunktionale Signalkaskaden das angeborene Immunsystem u.a. über die Aktivierung von nukleärem Faktor kappa B (NFkB), Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP) sowie dem Aktivator-Protein 1 (AP1) [Wagner 2001; Rutz *et al.* 2004; Martinez-Campos *et al.* 2017]. Neuste Studien haben zudem bestätigt, dass TLR9 auch andere Nukleotide als unmethylierte DNA, wie z.B. DNA:RNA-Hybride, jedoch nicht einzelsträngige DNA, erkennt [Martinez-Campos *et al.* 2017].

3.3.3 Interferon Typ-I Rezeptor (IFNAR)

Interferone wurden erstmals 1957 von Alick Isaacs und Jean Lindemann identifiziert [Isaacs *et al.* 1957]. Neben IFN-ε, -κ, -τ, -δ, -ζ, -ω, -ν, sind die anderen beiden Mitglieder der Typ-I-Interferon-Familie, IFNα und IFNβ, am besten charakterisiert [Decker *et al.* 2005]. Alle Typ-I Interferone teilen sich einen ubiquitär exprimierten heterodimeren Rezeptor (IFNAR), der aus zwei Subeinheiten, IFNAR1 (niederaffin) und IFNAR2 (hochaffin), aufgebaut ist [Pestka *et al.* 2004]. Es existieren drei Isoformen, die vom gleichen Ursprungsgen abstammen, jedoch mittels alternativem Spleißen (z.B. *Exon-skipping*) und unterschiedlicher Nutzung

von Polyadenylierungsstellen entstehen [Lutfalla *et al.* 1995]. Die am besten charakterisierte Form von IFNAR2 ist IFNAR2c. IFNAR2c ist aus einer langen Transmembraneinheit mit einer intrazellulären Domäne aufgebaut und ist für eine vollständige Immunantwort über die JAK/STAT-Signalkaskade verantwortlich [Cohen *et al.* 1995]. Um die Signale über den JAK/STAT-Signalweg zu transduzieren, sind IFNAR1 und IFNAR2 mit den Kinasen Tyk2 bzw. JAK1 assoziiert. Diese Kinaseaktivität ist für die Rezeptorphosphorylierung und die STAT-Rekrutierung zum IFNAR-Rezeptor erforderlich [Pestka *et al.* 2004]. Ferner wurde gezeigt, dass Tyk2 für die Stabilität von IFNAR1 auf der Zelloberfläche verantwortlich ist. Das IFNAR2 assoziierte JAK1 hat hingegen keinen Einfluss auf den Rezeptor [Ragimbeau *et al.* 2003]. Obwohl IFNAR1 und IFNAR2 nicht vorassoziiert vorliegt, sind beide für die vollständige IFN-I-abhängige STAT-Aktivierung und den daraus folgenden antipathogenen Effekt erforderlich [Hwang *et al.* 1995].

3.4 Adaptive Immunität

Wie bereits im Kapitel 3.3 (Angeborene Immunität) erwähnt, hängt die Aktivierung der Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems von invarianten Mustererkennungsrezeptoren ab, die gemeinsame Merkmale von Pathogenen erkennen. Angeborene Abwehrmechanismen sind von entscheidender Bedeutung, können jedoch von vielen Pathogenen überwunden werden und führen zu keinem immunologischen Gedächtnis. Ferner ist zu erwähnen, dass im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort, die bei allen mehrzelligen Lebewesen vorkommt, die adaptive Immunantwort nur bei Wirbeltieren entstehen kann.

Das adaptive Immunsystem ist sowohl durch die antigenspezifische Immunität als auch durch das immunologische Gedächtnis charakterisiert. Dabei spielt der B-Zell- als auch der T-Zell-Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Antigenerkennung. Sie werden klonal auf Lymphozyten exprimiert und erzeugen eine hohe Diversität durch somatische Rekombination der variablen (V), Diversitäts- (D) und verbindenden (J) Fragmente über DNA-Doppelstrangbrüche mit Hilfe des rekombinationsaktivierenden Gens (RAG). Dadurch kann der Organismus Immunrepertoires aufbauen, die groß genug sind, um praktisch jedes Antigen mit höchster Spezifität zu erkennen [Tonegawa 1983; Schatz *et al.* 2011]. Somit bilden der BCR, TCR und das MHC-Molekül einen wichtigen Eckpfeiler der adaptiven Immunität.

3.4.1 CD8⁺ T Zell-vermittelte Immunantwort

Während einer Infektion werden naive CD8⁺ T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (engl.: *antigen-presenting cells* (APCs)) in sekundären lymphatischen Organen, wie den Lymphknoten (LN) und der Milz initial aktiviert (Engl.: *Priming*). Frühere Studien haben aufgezeigt, dass in Abwesenheit von Antigenen, naive T-Zellen scheinbar zufällig durch die T-Zell-Kompartimente der Lymphknoten wandern. Diese Wanderung wurde später jedoch als gezielter Transport auf einem Fibroblastennetzwerk beschrieben [Bajenoff *et al.* 2006]. Neuere Forschungen haben gezeigt, dass der Erstkontakt zwischen CD8⁺ T-Zellen und APCs in der subkapsulären Sinusregion der Milz oder in drainierenden Lymphknoten stattfindet [Hickman *et al.* 2008; John *et al.* 2009]. In naiven Mäusen, d.h. vor Antigenkontakt, befinden sich CD8⁺ T-Zellen hauptsächlich in diesen T-Zell-Zonen, während die dendritischen Zellen ein ausgedehntes Netzwerk in der gesamten T-Zell-Zone, dem B-Zell-Follikel und einigen Bereichen der subkapsulären Sinusregion bilden [Lindquist *et al.* 2004]. Kurz nach der Infektion reichern sich die CD8⁺ T-Zellen und dendritischen Zellen schnell in den peripheren Regionen der Lymphknoten an [Hickman *et al.* 2008; John *et al.* 2009]. Partikuläre Antigene und Pathogene gelangen über die Lymphgefäße in den subkapsulären Sinus des drainierenden Lymphknotens. Die erste Hauptzellpopulation, die mit dem Pathogen in Kontakt kommt, sind die CD169⁺ Makrophagen, die den subkapsulären Sinusbereich auskleiden. Obwohl die Makrophagen im sehr hohem Maße Antigene präsentieren, bevorzugen CD8⁺ T-Zellen fürs *Priming* zur Effektorzelle primär dendritische Zellen. Hinzufügend ist anzumerken, dass während einer Infektion mit dem Vacciniavirus die Migration von naiven CD8⁺ Zellen weitgehend antigenspezifisch ist [Hickman *et al.* 2008; Davies *et al.* 2017].

Die Migration von dendritischen Zellen während der Initiierung einer Immunantwort ist streng reguliert und ein fundamentaler Faktor bei der CD8⁺ T-Zell Aktivierung und Expansion. Forschungen haben gezeigt, dass die XCL1/XCR1 Interaktion dabei eine kritische Rolle einnimmt [Lei *et al.* 2012; Brewitz *et al.* 2017]. Die Expression von XCR1 ist stark auf die CD8α⁺ dendritischen Zellen beschränkt, die im lymphatischen Gewebe vorkommen. Ferner wird der Ligand XCL1 von aktivierten CD8⁺ T-Zellen produziert.

Die Induktionskinetik, die aufgrund eines TCR-Stimulus induziert wird, ist derjenigen der frühen Aktivierungsmarker CD69 und CD25 nahezu homolog und für ein maximales *Priming* und eine maximale Expansion von CD8⁺ T-Zellen essentiell [Dorner *et al.* 2009].

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Chemokine, wie CCL3, CCL4 und CCL17, die von DCs produziert werden, CCR5⁺/– bzw. CCR4⁺/– naive-CD8⁺ T-Zellen während des *Primings* anlocken [Castellino *et al.* 2006]. Durch diese Interaktionen kann eine *Feed-Forward*-Schleife zwischen CD8⁺ T-Zellen und den dendritischen Zellen etabliert werden, um die Rekrutierung von sowohl antigenspezifischen naiven CD8⁺ T-Zellen als auch DCs während des *Primings* zu maximieren [Castellino *et al.* 2006; Semmling *et al.* 2010].

Am Höhepunkt einer primären Antwort auf ein Pathogen, ist die Population von Antigen-induzierten CD8⁺ T-Effektorzellen (CD127^{lo}, CD62L^{lo}) phänotypisch und funktionell heterogen. Sogenannte kurzlebige Effektorzellen (engl.: *short-lived effector cells* (SLEC)) bilden den Hauptteil dieser Population (90-95%); sie sterben jedoch durch Apoptose ab, sobald die Infektion beseitigt ist. Neben den SLECs bilden auch die Gedächtnisvorläufer-Effektorzellen (engl.: *memory precursor effector cells* (MPEC)) einen Teil dieser Population. MPECs erhalten einen geringen Stimulus und differenzieren vorrangig zur Gedächtniszellpopulation (CD127^{hi}, CD62L^{hi}) aus [Mescher *et al.* 2006; Parish *et al.* 2009].

Zwei Modelle der Gedächtniszelldifferenzierung sind gegenwärtig vorherrschend:

- Das lineare Differenzierungsmodell, das postuliert, dass Gedächtniszellen eine Effektorphase durchlaufen [Kalia *et al.* 2006]
- Das divergente Modell, das vorschlägt, dass terminale Effektor- und Gedächtnislinien eindeutig voneinander zu differenzieren sind und von diversen Faktoren beeinflusst werden [Kalia *et al.* 2006].

Eine korrekte Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen, die zu einer klonalen Expansion, Erlangung von Effektorfunktionen und Gedächtnisbildung führt, wird nur dann erzielt, wenn die T-Zellen drei Signale erhalten [Crouse *et al.* 2015; Brewitz *et al.* 2017].

Signal 1.: Durch Bindung des TCRs an kognate Antigen/MHC-I-Komplexe

Signal 2.: Durch die Interaktion der ko-stimulatorischen Rezeptoren (CD28/B7-1|2; CD40L/CD40)

Signal 3.: Durch spezifische Zytokinsignale (z.B. IL-12, Typ I-Interferone)

Die gezielte Tötung von infizierten Zielzellen wird durch die Freisetzung zytotoxischer Granula (z.B. Granzym B und Perforin) aus lysosomalen Kompartimenten vermittelt [Kagi *et al.* 1994; Wolint *et al.* 2004]. Während der Degranulation werden die lysosomalen Membranproteine transient an die Zelloberfläche der CD8⁺ T-Effektorzelle transloziert. Daher sind zytotoxische T-Zellen, die kürzlich degranuliert worden sind, durch die

Expression von Lysosom-assoziierten Membranproteinen (LAMP-1 und LAMP-2) identifizierbar [Liu *et al.* 2009; Krzewski *et al.* 2013]. Ferner haben *ex vivo* Studien die zytotoxische Funktionalität von SLECs und MPECs gemessen und gezeigt, dass die Gedächtniszellen einen robusten Effektorzustand (CD127^{hi}, CD62L^{lo}) durchlaufen. Darüber hinaus wurde angemerkt, dass die Aktivierung des Effektor-Differenzierungsprogramms mit dem CD8⁺ T-Zell *Priming* und mit der Proliferation verknüpft ist [Kalia *et al.* 2006; Kalia *et al.* 2010].

Ob MPECs und SLECs *in vivo* ein ähnliches Maß an Zytotoxizität besitzen, muss noch genauer untersucht werden. Es wird aber angenommen, dass die differentielle anatomische Lokalisierung von MPECs und SLECs und somit der Einfluss von unterschiedlichen Differenzierungssignalen (z.B. IL-2, IL-12, Antigene, etc.) die Effektordifferenzierung und das Gedächtnispotential innerhalb dieser Gruppen stark prägt [Sarkar *et al.* 2008; Kalia *et al.* 2010; Pipkin *et al.* 2010; Obar *et al.* 2011].

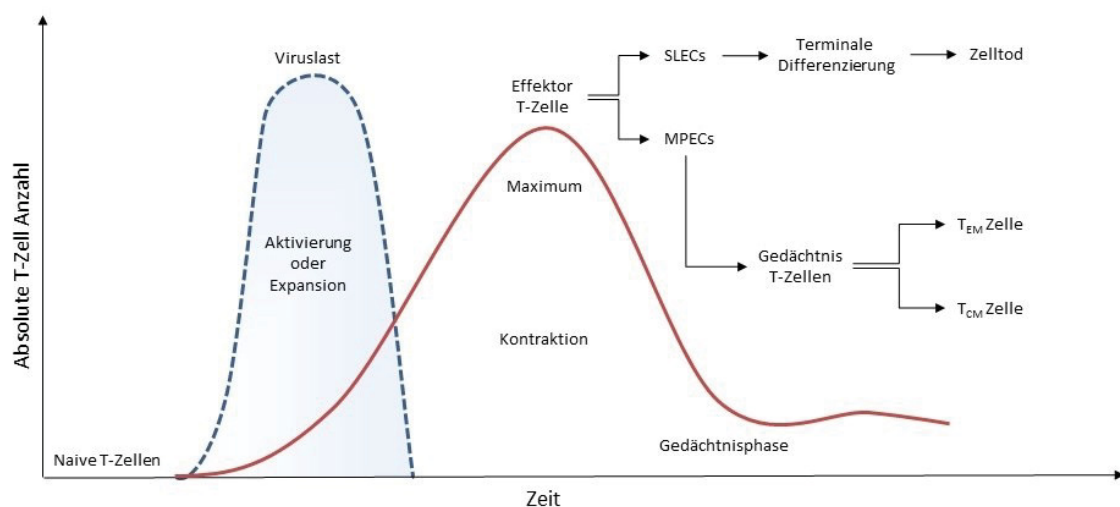


Abb. 4: Differenzierung von CD8⁺ T-Gedächtniszellen (modifiziert nach [Russ *et al.* 2013])

Wenn eine naive T-Zelle von einem Antigen aktiviert wird, durchläuft sie ein dreistufiges Differenzierungsprogramm: die klonale Expansion und Differenzierung, Kontraktion und Gedächtnisbildung. Der Differenzierungsprozess, der am Höhepunkt der Immunantwort auftritt, erzeugt eine heterogene Population von CD8⁺ T-Zellen. Die kurzlebigen Effektorzellen (SLECs; CD127^{lo}, CD62L^{lo}) durchlaufen eine terminale Differenzierung, die in der Apoptose der CD8⁺ T-Zellen endet. Im Gegensatz dazu, erzeugen die Gedächtnisvorläuferzellen (MPECs) eine langlebige und selbsterneuernde CD8⁺ T-Zellantwort. Nachdem eine Infektion beseitigt wurde, sterben die meisten antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen ab, die während der klonalen Expansion entstanden sind. Die Zellen, die die Kontraktionsphase überstehen, erzeugen ein Reservoir von T-Gedächtniszellen, welche in Effektor-Gedächtniszellen (T_{EG}, CD127^{hi}, CD62L^{lo}) und in Zentrale-Gedächtniszellen (T_{ZG}, CD127^{hi}, CD62L^{hi}) differenzieren können.

3.5 Direkte Antigenpräsentation

Um einen Einblick in die intrazelluläre Proteinzusammenstellung zu ermöglichen, assoziieren die naszierenden polymorphen α -Ketten des MHC-I Moleküls nicht-kovalent mit der leichten β 2-Mikroglobulin-Kette (β 2M) und bilden, zusammen mit einem Peptid, einen tri-molekularen Komplex [Peaper *et al.* 2008]. Die auf dem MHC-I Molekül gebundenen Peptide können sowohl endogenen (z.B. fehlgefaltete Proteine) als auch exogenen (z.B. Fremdproteine von Pathogenen) Ursprungs sein. Dabei spielt die proteasomale Degradation eine entscheidende Rolle und ermöglicht über das Ubiquitin-Proteasom-System die zelluläre Homöostase zu erhalten. Der Abbau eines Proteins wird durch eine Verkettung von Ubiquitinmolekülen initiiert und involviert ein Netzwerk aus den Proteinen E1 (Ubiquitinaktivase), E2 (Ubiquitinkonjugase) und E3 (Ubiquitinligase). Ferner ist anzumerken, dass der Prozess der Ubiquitinierung ein reversibler Prozess ist, der über das Protein Deubiquitinase gesteuert wird.

Ein „Qualitätskontroll“-Mechanismus, der in Abhängigkeit von den N-verknüpften Oligosacchariden im endoplasmatischen Retikulum als auch von O-Glykosilierungen im Golgi-Apparat an der α -Kette steht, verhindert den Export von unvollständig zusammengebauten α -Ketten/ β 2M/Peptid-Trimeren. Die Peptide, die MHC-I Moleküle binden, sind in der Regel acht bis zehn Aminosäuren lang. Sie werden durch die dedizierten ATP-abhängigen TAP1/2-Transporter in das Lumen des ERs transloziert und durch die Aminopeptidase ERAAP1/2 am N-Terminus getrimmt. Die Übertragung der getrimmten Peptide von TAP auf das MHC-I wird durch einen Beladungskomplex unterstützt. Dieser Komplex besteht aus einem dedizierten Chaperon, Tapasin, und einer Reihe allgemeiner membrangebundener und löslicher Chaperone (einschließlich Calnexin, ERP57 und Calreticulin) [Peaper *et al.* 2008; van Hateren *et al.* 2017]. Nach dem vollständigen Zusammenbau werden die α -Ketten/ β 2M/Peptid-Komplexe über den klassischen Sekretionsweg aus dem ER exportiert und an der Oberfläche der Zelle zur Erkennung durch peptidspezifische CD8⁺ T-Zellen präsentiert [Neefjes *et al.* 2011].

3.6 Kreuzpräsentation

Im Jahre 1976 wurde zuerst das Phänomen der Kreuzaktivierung (engl.: *Cross-Priming*) beschrieben. Dabei wurde beobachtet, dass genetisch polymorphe Antigene von einem Transplantat CD8⁺ T-Zellen stimulieren können. Der Stimulus ging interessanterweise nicht von den MHC-I Molekülen des Transplantats aus, sondern von denen des Empfängers [Bevan 1976]. Dieses Phänomen der Kreuzaktivierung deutete darauf hin, dass auch exogene Antigene auf MHC-I Molekülen präsentiert werden konnten. Ein Prozess der heutzutage als Kreuzpräsentation bezeichnet wird. Über viele Jahre galt die Beladung von MHC-I Molekülen auf Zelloberflächen mit Peptidpitopen nach Prozessierung endogener Proteine als einziger bekannter Mechanismus zur Präsentation von exogenen Antigenen [Townsend *et al.* 1986]. Im Jahre 1990 hat die Arbeitsgruppe um Rock *et al.* beobachtet, dass bestimmte primäre lymphatische Zellen Proteine aus dem extrazellulären Milieu aufnehmen, prozessieren und über den MHC-I-Weg präsentieren können. Diese antigenpräsentierenden lymphatischen Zellen erwiesen sich im späteren Verlauf als dendritische Zellen und Makrophagen [Grant *et al.* 1992; Kovacsovics-Bankowski *et al.* 1993; Pooley *et al.* 2001].

Ferner haben Experimente gezeigt, dass partikuläre Antigene die durch Phagozytose oder Makropinozytose internalisiert werden, die höchste Fähigkeit besitzen eine effiziente CD8⁺ T-Zellantwort zu stimulieren [Kovacsovics-Bankowski *et al.* 1993; Pfeifer *et al.* 1993; Norbury *et al.* 1995].

Die physiologisch wichtigste Hauptquelle von partikulären Antigenen stammt von sterbenden autologen Zellen. Die Reduktion der Ingestion solcher Zellen mit einem negativ-dominanten Rac1-Transgen oder der Deletion von Clec9A beeinträchtigt sowohl die Kreuzpräsentation als auch die Kreuzaktivierung von CD8⁺ T-Zellen *in vivo* [Kerksiek *et al.* 2005; Iborra *et al.* 2012]. Anknüpfend daran wurde beschrieben, dass während der Kreuzpräsentation der AXL/LRP-1/RANBP9-Komplex bei apoptotischen- und Clec9A bei nekrotischen-Zellen eine zentrale Rolle einnimmt [Schreibelt *et al.* 2012; Subramanian *et al.* 2014].

Die Internalisierung von toten Zellen durch Makrophagen involviert unterschiedliche Rezeptoren, die kooperative und redundante Rollen übernehmen [Poon *et al.* 2014].

Mit dem Zelltod ist die Exposition von Phosphatidylserinen assoziiert. Diese Phosphatidylserine stimulieren Makrophagenrezeptoren, wie z. B. TIM4 oder CD36 und führen zur Ausschüttung von diversen Opsoninen (z.B. MFG-E8, Gas6, Protein S).

Die Aufnahme toter Zellen durch Makrophagen erfordert einen koordinierten Prozess der direkten Erkennung von „Fresssignalen“ und anschließender Aktivierung von intrazellulären Signalwegen. Beispielsweise vermitteln TIM4-Rezeptoren, wie bereits erwähnt, die Internalisierung von toten Zellen direkt über die Erkennung von Phosphatidylserinen, während die Aktivierung von Tyrosinkinasen, wie MerTK, zu einer Aktinremodellierung führt [Miyashita *et al.* 2007; Toda *et al.* 2012].

Bei humanen DCs haben initiale Arbeiten von Albert *et al.* gezeigt, dass das Integrin $\alpha V\beta 5$ und der Scavenger-Rezeptor CD36 eine essentielle Rolle beim Aufnehmen von toten Zellen einnehmen [Albert *et al.* 1998]. Jedoch zeigen Milzzellen aus CD36^{-/-} und $\alpha V\beta 5$ ^{-/-} Mäusen keine Einschränkung während der Internalisierung und Kreuzpräsentation von Antigenen [Belz *et al.* 2002; Schulz *et al.* 2002].

Im Gegensatz dazu, inhibieren Antikörper gegen αV -Integrine und CD36 effektiv die Efferozytose bei humanen CD141⁺cDCs [Subramanian *et al.* 2014].

Die Beteiligung von CD36 und αV -Integrinen an der Internalisierung von toten Zellen durch DCs ist jedoch umstritten. In diesem Zusammenhang hat eine weitere *in vivo*-Studie aufgezeigt, dass die Hemmung der Phosphatidylserinerkennung die Aufnahme durch Makrophagen beeinträchtigt, jedoch die Efferozytose durch CD8 α^+ DCs fördert [Bondanza *et al.* 2004].

Ferner ist anzumerken, dass Antikörper gegen TIM3 und die Inaktivierung eines Faktors des AXL/LRP-1/RANBP9-Komplexes die Efferozytose durch murine cDCs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* inhibiert und die Kreuzpräsentation einschränkt [Nakayama *et al.* 2009; Subramanian *et al.* 2014]. Anknüpfend daran, führt im humanen Modell die Blockade von AXL und LRP-1 zu einer minimierten Efferozytose durch humane cDCs [Subramanian *et al.* 2014].

Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass es zu einer verstärkten Kreuzpräsentationsfähigkeit in gestressten Zellen führt, wenn die Antigene in Autophagosomen lokalisiert oder an Hitzeschockproteinen bzw. Vesikeln gebunden sind [Basu *et al.* 2000; Joubert *et al.* 2012].

Neben dem sterbenden autologen Zellen können auch andere Quellen, beispielsweise lebenden Zellen, zum Erwerb von Antigenen beitragen. In diesem Fall können Antigene von einer Antigen-Spenderzelle via *GAP junctions* zu dendritischen Zellen transferiert werden [Neijssen *et al.* 2005]. Ein weiterer Mechanismus ist der Transfer von Peptid/MHC-I-Komplexen via *cross-dressing* oder Trogozytose. Jedoch zeigen weitere Daten, dass der Transfer über *GAP junctions* und Trogozytose nicht der primäre Mechanismus ist, der zur Kreuzpräsentation führt [Serna *et al.* 2003; Norbury *et al.* 2004; Wang *et al.* 2014].

Wie bereits beschrieben, ist der Hauptmechanismus durch den dendritische Zellen Antigene kreuzpräsentieren, der phagosomale/cytosolische-Weg, bei dem eine Fraktion von Antigenen in Phagosomen bzw. Makropinosomen internalisiert und ins Zytosol transferiert werden. Im Zytosol werden die Antigene für die proteasomale Degradation und für die Beladung der MHC-I Moleküle bereitgestellt [Kovacsovics-Bankowski *et al.* 1995; Palmowski *et al.* 2006].

In Übereinstimmung mit diesem Mechanismus wurden TAP, Tapasin, Calretikulin, Erp57 und die schweren Ketten der MHC-I Moleküle in aufgereinigten frühen Phagosomen aus dendritischen Zellen nachgewiesen. Interessanterweise wurden auch häufiger Peptid/MHC-I-Komplexe in Phagosomen aufgefunden, die mit OVA-gebundenen *Beads* befüllt waren. Dies deutet darauf hin, dass eher eine direkte Beladung der MHC-I Moleküle im Phagosom stattfindet als eine Rekrutierung von Peptid/MHC-I-Komplexen zum Phagosom [Guermónprez *et al.* 2003].

Die Depletion von Sec22b beeinträchtigt die Rekrutierung von ER-Proteinen, wie TAP, Tapasin und Calretikulin zu den Phagosomen sowie die Kreuzpräsentation in dendritischen Zellen. Diese Ergebnisse deuten auf eine entscheidende Rolle von Sec22b bei der Rekrutierung von essentiellen Komponenten des Peptid-Beladungskomplexes hin.

Die Rekrutierung von MHC-I Molekülen zu den Phagosomen ist dadurch jedoch nicht eingeschränkt [Cebrian *et al.* 2011].

Dies steht im Einklang mit der intrazellulären Lokalisation von MHC-I Molekülen, die sich im „*steady-state*“-Stadium der Zelle an der Plasmamembran und den Recycling-Endosomen, jedoch nicht im ER befinden [Donaldson *et al.* 2009]. Das MHC-II-Chaperon CD74 könnte auch eine wichtige Rolle bei der Translokation von MHC-I Molekülen in Richtung von Endolysosomen beteiligt sein [Basha *et al.* 2012]. Diese Ergebnisse legen

nahe, dass auch an späten Endosomen/Lysosomen eine Beladung von MHC-I Molekülen stattfindet.

3.6.1 Antigenkreuzpräsentierende Zellen

Kreuzpräsentierende Zellen im Lymphknoten oder der Milz erwiesen sich als dendritische Zellen [Shen *et al.* 1997; Jung *et al.* 2002; Segura *et al.* 2013; Chiang *et al.* 2016]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die selektive Depletion von dendritischen Zellen das *Cross-Priming* hemmt [Jung *et al.* 2002; Hildner *et al.* 2008]. Daher sind dendritische Zellen die Hauptzellen, die Antigene kreuzpräsentieren und eine T-Zell Immunantwort initiieren. Verschiedene Typen von dendritischen Zellen können über die Lokalisation bzw. mittels Oberflächenmarker differenziert werden und verfügen, je nach Typ, über die Fähigkeit, Antigene kreuz zu präsentieren [Shen *et al.* 1997; Nierkens *et al.* 2013; Tel *et al.* 2013; Chiang *et al.* 2016].

Dendritische Zellen, die in Mäusen kreuzpräsentieren, exprimieren am häufigsten den Chemokinrezeptor XCR1 in Kombination mit CD8 bzw. CD103 [den Haan *et al.* 2000; Becker *et al.* 2014; Cerovic *et al.* 2015; Kitano *et al.* 2016].

Ferner wurde beobachtet, dass in den Milzen von Mäusen, die intravenös mit Plasmodien oder löslichem- bzw. zellassoziertem-OVA behandelt worden sind, ausschließlich residente CD8⁺DCs kreuzpräsentieren. In die Lunge applizierte lösliche- bzw. zellgebundene-Antigene werden exklusiv von migratorischen CD103⁺DCs kreuzpräsentiert [Bedoui *et al.* 2009; Kitano *et al.* 2016]. Darüber hinaus übernehmen im Darm migratorische CD8⁺CD103⁺DCs die Kreuzpräsentation von epithelial-exprimiertem Antigen. Hinzufügend ist zu erwähnen, dass Batf3-defiziente Mäuse (exprimieren weder CD8 noch CD103) eine erheblich gestörte Kreuzpräsentation aufweisen [Hildner *et al.* 2008; Desch *et al.* 2011].

Zudem wurde berichtet, dass migratorische DCs Antigene auf residente lymphatische DCs transferieren können, um somit die Kreuzpräsentation zu ermöglichen [Allan *et al.* 2006]. Es wird vermutet, dass im Menschen die BDCA3⁺XCR1⁺CD141⁺DCs die äquivalenten Zellen zu den murinen XCR1⁺DCs sind und effektiv Antigene kreuzpräsentieren [Haniffa *et al.* 2012; Cohn *et al.* 2013; Chiang *et al.* 2016].

Überdies wurde interessanterweise aufgezeigt, dass kreuzpräsentierende MHC-I⁺ dendritische Zellen sich von MHC-II⁺ dendritischen Zellen unterscheiden, sogar wenn das exogene Antigen identisch ist. MHC-II präsentierende DCs sind CD8⁻ [den Haan *et al.* 2000; Pooley *et al.* 2001; Mount *et al.* 2008].

Der Grund dafür ist zurzeit noch unklar. Es wird vermutet, dass die Beladung von MHC-II-Molekülen saure Vesikel erfordert, die für die MHC-I Peptidbeladung eine eher suboptimale Bedingung darstellen. Tatsächlich wurde eine reziproke Beziehung zwischen der Kreuzpräsentationsfähigkeit und der MHC-II Präsentation beobachtet.

Beispielsweise hemmt der Transkriptionsfaktor TFEB die Kreuzpräsentation, verstärkt jedoch die MHC-II Präsentation [Samie *et al.* 2015].

3.7 Zielsetzung

In den letzten Jahrzehnten haben sich rekombinante virale Vektoren als vielversprechende Kandidaten für die Generierung von Impfstoffen erwiesen, welche eine protektive T-Zellimmunität gegen verschiedene Pathogene und Tumorantigene induzieren sollen.

Die genauen Mechanismen einer protektiven Immunität, die während einer Pockenvirusinfektion hervorgerufen werden, sind teilweise unverstanden. Hierbei bildet die Schnittstelle zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität eine entscheidende Rolle und formt die Basis dieser und weiterführenden Forschungsarbeiten. Dabei spielt sowohl die Kommunikation dendritischer Zellen mit T-Zellen als auch die dadurch resultierenden Signalkaskaden, wie beispielsweise die Produktion und Induktion diverser Effektormoleküle wie Zytokine oder zytotoxische Granula, wie z.B. IFN γ , TNF α oder CD107 α , eine entscheidende Rolle.

Voruntersuchungen zeigten, dass die Kreuzpräsentation von MVA-produzierten Antigenen durch nicht-infizierte dendritische Zellen strikt durch Hemmung der viralen DNA-Replikation in infizierten Zellen, die als Antigenquelle dienten, unterbunden werden kann [Tao 2013, *unpublished*].

Darauf aufbauend werden *in vitro* als auch *in vivo* Experimente durchgeführt, die den Einfluss verschiedener angeborenen Immunfaktoren auf die Qualität und Quantität von CD8⁺ T-Zellantworten darstellen. Im Fokus stehen hierbei die Immunfaktoren STING, TLR9 sowie IFNAR. Mit Hilfe von Knockout- sowie Wildtyp-Mäusen, werden auf diversen Ebenen lösliche Faktoren, die Kreuzpräsentationsfähigkeit, Reifung von dendritischen Zellen sowie die Induktion von Zytokinen und die daraus resultierenden Signalkaskaden analysiert.

Für vergleichende Untersuchungen stehen diverse Vacciniavirus-Stämme zur Verfügung, welche sich in der Virulenz, dem Antigenexpressionsprofil sowie dem immunmodulatorischen Potential unterscheiden.

Das langfristige Ziel des gesamten Forschungsvorhabens ist die Optimierung von Vakzinierungsstrategien unter der Verwendung von pockenviralen Vektoren, die eine T-Zell-basierte Immuntherapie ermöglichen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Nachfolgend sind die Geräte gelistet, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Elektrophoreseapparaturen

Gelkammer für Agarosegele	Bio-Rad, München, Deutschland
MiniProtean® TetraCell	Bio-Rad, München, Deutschland
Spannungsquelle PowerPac BasicTM	Bio-Rad, München, Deutschland

pH-Messgerät

PB-11	Sartorius, Ratingen, Deutschland
-------	----------------------------------

Polymerasekettenreaktion

TRIO Thermal Cycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
---------------------	----------------------------------

Spektralphotometer

NanoDrop 1000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
---------------	--

Western Blot Apparaturen

Trans-Blot® Turbo™	Bio-Rad, München, Deutschland
PowerPac™, HC	Bio-Rad, München, Deutschland
Odyssey® Imaging System	LI-COR, Lincoln, USA

Schüttler

Vortex Genie 2	Scientific Industrie, New York, USA
Thermomixer® Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Waagen

Analysenwaage AEJ 220-4M	Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
Oberschalenwaage EW 4200 2NM	Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland

Mikroskope

CKX41	Olympus, Hamburg, Deutschland
LSM 780	Zeiss, Köln, Deutschland

Zentrifugen

Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Fresco 21	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlzentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge Megafuge 16R	Heraeus, Hanau, Deutschland

Sonstige Geräte und Materialien

Geldokumentationssystem	INTAS, Göttingen, Deutschland
BD FACSCanto II flow cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Infinite M200 Pro	Tecan, Männedorf, Deutschland
Multimode Microplate Reader	
Mikropipetten Pipetman P10-1000	Gilson, Middleton, USA
Mikrowelle Optiquick	Moulinex (Krups), Offenbach, Deutschland
Accu-jet® pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Sterilbank Scanlaf Mars Safety 2	Labogene, Lynge, Dänemark
Inkubator HERAccl 150i CO ₂	Heraeus, Hanau, Deutschland
Chirurgische Pinzette HSC 801-11	Hammacher, Solingen, Deutschland
Chirurgische Schere HSB 0140-11	Hammacher, Solingen, Deutschland
Crosslinker Bio-Link BLX 365	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Eismaschine AF124	Scotsman Ice, Mailand, Italien
Heiz-Magnetrührer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Kühlschrank LKUv 1610 MediLine	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Kühlschrank FKUv 1610 Premium	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland

Kühlschrank KB 4260 Premium	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Kühlschrank KUR18421	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Gefrierschrank GNP 4166 Premium NoFrost	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Gefrierschrank IG 1166 Premium	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Gefriertruhe Forma 88000 Series	Thermo Scientific, St-Leon-Rot, Deutschland

4.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen den Reinheitsgraden *pro analysis* oder *reinst*.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Oligonukleotidprimer	Eurofins, Luxembourg, Luxemburg
EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix	Takara, Shiga, Japan

Agarose-Gelelektrophorese

Biozym LE Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
TBE-Puffer (10-fach)	Merck, Darmstadt, Deutschland
HyperLadder 50 bp + 10 kb	Bioline, London, England
DNA-Größenstandard GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland

Western Blot/Polyacrylamidgelelektrophorese

Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Proteingrößenstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, St-Leon-Rot, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin (99%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland

Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS-Pellets	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Bethesda Research Laboratories, USA
Bromphenolblau (BPB)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver (<i>blotting grade</i>)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween20	Merck, Darmstadt, Deutschland

Zellkultur

Mild-Lysis-Buffer (MLB)	AG Scheller, Düsseldorf, Deutschland
Fetales Bovines Serum (FBS)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Tri(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NH ₄ Cl	VWR BDH Prolabo®, Langenfeld, Deutschland
<i>Trypan Blue Stain</i> , Stock 0,4%	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
RPMI 1640 (R8758)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	Loewe Biochemica, Sauerlach, Deutschland
BD Perm/Wash (10x)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Destilliertes Wasser	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Brefeldin A (BFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Sonstige Chemikalien

Penicillin/Streptomycin/Hygromycin B	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cytosine β -D-arabinofuranoside	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bafilomycin A1	Santa Cruz Biotech., Dallas, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt, Deutschland

NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
CH ₃ CO ₂ K	Merck, Darmstadt, Deutschland

4.1.3 Zytokine

	<u>Merkmale</u>	<u>Referenz</u>
IFN γ	Rekombinantes Interferon- γ aus der Maus	[Dobbins <i>et al.</i> 2008]

4.1.4 Antikörper

FACS

<u>Spezifität</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Klon</u>	<u>Verdünnung</u>
CD8 α -eFluor 450	eBioscience, San Diego, USA	Ratte IgG2b, κ	53-6.7	1:300
CD11c-APC-Cy7	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Armenien Hamster IgG1, λ 2	HL3	1:200
CD16/32 Fc Block	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Ratte IgG2b κ	2.4G2	1:200
CD86-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	LOU/M IgG2a, κ	GL1	1:200
SIINFEKL/H2-K ^b -PE-Cy7	eBioscience, San Diego, USA	Maus IgG1, κ	eBio25-D1.16	1:200
MHC II(I-A/I-E)-eFluor 450	eBioscience, San Diego, USA	Ratte IgG2b, κ	M5/114.15.2	1:200
IFN- γ -APC	eBioscience, San Diego, USA	Ratte IgG1, κ	XMG1.2	1:400
TNF α -PE-Cy7	eBioscience, San Diego, USA	Ratte IgG1, κ	MP6-XT22	1:300
CD107 α -PE	eBioscience, San Diego, USA	Ratte IgG2b, κ	eBio1D4B	1:200

Western Blot

<u>Spezifität</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Klon</u>	<u>Verdünnung</u>
anti- β -Actin	Merck, Darmstadt, Deutschland	Maus IgG1	AC-15	1:1000
Anti-OVA	Abcam plc, Cambridge, UK	Kaninchen IgG		1:10000
Anti-Maus <i>IRDye</i> [®] 680RD	LI-COR, Lincoln, USA	Ziege IgG		1:10000
Anti-Kaninchen <i>IRDye</i> [®] 800CW	LI-COR, Lincoln, USA	Ziege IgG		1:5000

Fluoreszierende Farbstoffkonjugate

<u>Farbstoffkonjugat</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung</u>
<i>Viability Dye</i> eFluor 660	eBioscience, San Diego, USA	1:2000
<i>Viability Dye</i> eFluor 506	eBioscience, San Diego, USA	1:500
Ethidiumbromidmonoazid	Merck, Darmstadt, Deutschland	1:2000

4.1.5 Zellen

	<u>Eigenschaft</u>	<u>Referenz</u>
B16-GMCSF	Murine GM-CSF B16 produzierende Melanomzellen	Zur Verfügung gestellt von Georg Häcker, Freiburg, Deutschland
Cloudman S91	Melanomzellen von DBA Mäusen (MHC I Restriktion H2-D)	ATCC Nr. CCL.53.1
DC2.4	Murine dendritische Zellen	Zur Verfügung gestellt von Dr. KL Rock
EL4	Murine T-Zell-Lymphome	ATCC Nr. TIB-39
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen	Zur Verfügung gestellt von Veit Hornung, München, Deutschland
MEF	Murine embryonale Fibroblasten	Zur Verfügung gestellt von Piersma Sytse, St. Louis, USA

4.1.6 Mäuse

Alle Mäuse wurden aus der hausinternen Zucht der ZETT am Uni-Klinikum Düsseldorf oder von Janvier-Labs (Frankreich) bezogen.

Die STING^{-/-}-Mäuse basieren auf einer ca. 10 Kb Deletion, die im STING-Gen auf dem 18 Chromosom lokalisiert ist. Der genetische Hintergrund stammt von einer C57BL/6J-Maus ab. IFNAR^{-/-}-Mäuse zeichnen sich durch eine IFNAR1-Mutation aus, die durch eine Neomycin-Insertion am Exon III und IV ermöglicht wurde. Die TLR9^{-/-}-Mäuse wurden ebenfalls über eine Neomycin-Insertion realisiert. Das Transkript wird weiterhin vom Allel exprimiert, jedoch resultiert es in einem inaktiven Protein.

Mauslinie	MHC I Restriktion	Referenz
C57BL/6J	H2-K ^b /H2-D ^b	https://www.jax.org/strain/000664
C57BL/6N	H2-K ^b /H2-D ^b	https://www.jax.org/strain/005304
STING ^{-/-}	H2-K ^b /H2-D ^b	Lei Jin, Albany medical college, USA.
STING ^{+/+}	H2-K ^b /H2-D ^b	Lei Jin, Albany medical college, USA.
IFNAR ^{-/-}	H2-K ^b /H2-D ^b	Ulrike Müller, Universität Zürich, Schweiz Stephanie Scheu, Universität Düsseldorf, Deutschland
IFNAR ^{+/+}	H2-K ^b /H2-D ^b	Stephanie Scheu, Universität Düsseldorf, Deutschland
TLR9 ^{-/-}	H2-K ^b /H2-D ^b	Zoe Waibler, Paul-Ehrlich-Institut, Langen

4.1.7 Virus

Alle verwendeten rekombinanten und Wildtyp-Viren wurden in der AG Drexler von Ronny Tao nach Standardmethode [Staib *et al.* 2004] generiert und propagiert.

	Referenz
MVA-NP-SIIN-eGFP-P7.5	Exprimiert ein Fusionsprotein bestehend aus dem Nukleoprotein (NP) aus dem Influenza A Virus (Typ Puerto Rico 68), dem Peptid SIINFEKL (OVA ₂₅₇₋₂₆₄) aus dem Protein Ovalbumin (OVA) und einer verbesserten Form des grün-fluoreszierende-Proteins (eGFP)
MVA-OVA-PK1L/P7.5/P11	Exprimiert Ovalbumin unter drei verschiedenen Promotoren. PK1L=früh, P7.5=früh/spät, P11=spät
WR-dsRed-P11	Exprimiert das <i>Discosoma sp.</i> rot-fluoreszierendes-Protein (dsRed) unter dem späten Promotor P11
WR-eGFP-A5	Exprimiert ein Fusionsprotein aus dem Vacciniavirus-Kernprotein A5 (spät) und eGFP

4.1.8 Vacciniavirus-spezifische Peptide

	<u>MHC Restriktion</u>	<u>Expressionszeitpunkt in MVA</u>	<u>Eigenschaft</u>
OVA ₂₅₇₋₂₆₄	H2-K ^b	F, F+S oder S	Modellantigen
B8R ₂₀₋₂₇	H2-K ^b	F	Virulenzfaktor
A3L ₂₇₀₋₂₇₇	H2-K ^b	F+S	Kernprotein
D13L ₄₈₆₋₅₀₀	H2-K ^b	S	Strukturprotein
K3L	H2-D ^b	F	Pseudosubstrat
A19L	H2-K ^b	S	Viraler Reifungsprozess

F = früh, S = spät

4.1.9 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 mL und 2 mL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon Reaktionsgefäße (15 mL und 50 mL)	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Handschuhe	Nitra-Tex, Staffordshire, England
Nitrozellulosemembran Hybond-C Extra	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
Sterilpipetten	Corning Inc., Taufkirchen, Deutschland
Whatman-Papier	VWR International GmbH, Langenfeld, Deutschland
8-Strip PCR Caps, Domed, Natural	Starlab, Hamburg, Deutschland
Zellkulturschalen - 5 cm ² - 10 cm ²	TPP®, Trasadingen, Schweiz
96-Well Zellkulturplatte Nunc®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-Well)	Corning Inc., Taufkirchen, Deutschland
Zellkulturschalen (T75, T175, T185)	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland Corning Inc., Taufkirchen, Deutschland
Zellschaber	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
FACS Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Spritzenfilter Minisart 0,2 - 0,45 µm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

4.1.10 Software

BD FACS DIVA	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FlowJo 10.0.7	FlowJo LLC, Ashland, USA
GraphPad Prism 6.01	GraphPad Software, La Jolla, USA
Image Studio Lite 4.0	LI-COR, Lincoln, USA
MS-Office	Microsoft, Redmond, USA

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Arbeiten

Medienherstellung

Alle Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben angesetzt. Nach der Herstellung wurden die Medien autoklaviert (121°C, 1,2 bar, 20 min) und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

Agarose-Gelelektrophorese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Agarose-Gelelektrophoresen mit Tris-Borat-EDTA- (TBE-) Puffer pH 8,5 bei konstant 100 mA ausgeführt. Die DNA-Detektion erfolgte mittels EZ-Vision In-Gel als Fluoreszenzmarker unter UV-Licht. Zur Dokumentation wurde ein Geldokumentationssystem der Firma Intas mit UV-Leuchttisch, CCD-Kamera und Thermosublimationsdrucker der Firma Mitsubishi verwendet.

DNA-Isolierung aus Cloudman S91 Zellen

Die Isolierung von DNA erfolgte aus frischer Zellkultur, die über Nacht bei 37°C kultiviert worden ist.

Die Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und bei 1500 rpm für 5 min bei 4 °C pelletiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Pellet in Lysispuffer resuspendiert. Darauf folgend wurde die Suspension drei Mal bei 80 °C eingefroren und aufgetaut. Anschließend folgte eine starke Zentrifugation ($V_{11000\text{ g}}$, 20 Min., 4 °C), um das *cleared cell lysate* zu erzeugen. Der Überstand wurde in ein neues Reagenzgefäß überführt und für die PCR verwendet.

Lysis Puffer

CHAPS	0,3 %
Tris-HCl pH 7.4	50 mM
NaCl	150 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
NaF	10 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
Na ₄ O ₇ P ₂	2,5 mM
DTT	1 µM
cOmplete™ protease inhibitor cocktail	1x

PCR zum Nachweis von STING

Der Nachweis von STING in Cloudman S91 Zellen erfolgte mittels einer PCR. Als Template diente die isolierte Cloudman S91 DNA. Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Nukleotidsequenzen der PCR-Primer für die Analyse der Cloudman-Zellen auf STING

Primer	Nukleotidsequenz
Sa-left	5'-CTG GAC CTT TTC CCC AAA CT-3'
Neo	5'-GCC TTC TTG ACG AGT TCT TC-3'
Sa-right	5'-TTT CAT CTG CCT TCC AGG TC -3'

Der PCR-Ansatz (50 µL Reaktionsvolumen) zur Amplifikation der STING-Sequenz setzte sich wie folgt zusammen:

Komponenten	Volumen [µL]
Sa-Left (10 pmol/µL)	2
Neo (10 pmol/µL)	2
Sa-right (10 pmol/µL)	2
template-DNA (1:10 verd.)	1
<i>EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix</i>	25
H ₂ O _{dd}	18

Die Amplifikation erfolgte mit folgenden Zyklusparametern:

Zyklus	Temperatur [°C]	Zeit [Sek.]	
Initiale Denaturierung	98	300	
Denaturierung	98	10	} 30 Zyklen
Hybridisierung	60	30	
Elongation	72	150	
Finale Elongation	72	300	

4.2.2 Zellkultur

Alle Arbeitsschritte, die nachfolgend beschrieben werden, wurden in einer vor Beginn desinfizierten Sicherheitswerkbank der Stufe 2 mit laminarer Luftströmung unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Passagieren von Zellen

Bei ausreichender Zelldichte, also einer Konfluenz von etwa 90%, ist es notwendig die Zellen für weiteres Wachstum aufzuteilen und umzusetzen (Passagieren). Bei adhärenenten Zellen (Cloudman S91, HEK293T, MEF) wurde zunächst das Kulturmedium aus der Kulturschale entfernt.

Die Zellen wurden anschließend mit 10 mL PBS gewaschen, um somit extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen zu entfernen und so die durch extrazelluläre Matrixproteine vermittelte und Ca^{2+} -abhängige Zelladhäsion, also die etablierten Zell-Zell-Kontakte, zu schwächen sowie um abgestorbene Zellen bzw. Zelltrümmer zu entfernen. Danach wurde das PBS wieder entfernt und die Zellen wurden mit 2 mL Trypsin/EDTA für 5 min bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Trypsin bewirkt einen enzymatischen Verdau der extrazellulären Matrix und das in der Trypsin-Lösung enthaltene EDTA komplexiert noch verbliebene freie Ca^{2+} -Ionen. Zur Antagonisierung des Trypsins wurden die abgelösten Zellen auf ein Gesamtvolumen von 10 mL mit Medium aufgefüllt. Anschließend wurde ein Aliquot der Zellen in eine neue Zellkulturschale mit neuem Medium überführt und in den Inkubator gestellt.

Die verwendeten EL4 semi-adhärenenten Zellen wurden, nach Erreichen einer 90% Konfluenz, mit Medium resuspendiert und ein Aliquot für die nächste Passage in eine neue Kulturschale überführt. Die Inkubation erfolgte im CO₂-Inkubator.

M2 Medium

RPMI 1640	500 mL
FBS (10% Endk.)	50 mL
2-Mercaptoethanol (1M)	28 µL

DMEM^{+/+} Medium:

FBS (10% Endk.)	50 mL
-----------------	-------

Kryokonservierung

Die in Zellkulturschalen kultivierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend ggf. mit Hilfe eines Zellschabers oder Trypsin von der Platte gelöst und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 4°C (V_{1500 rpm}) wurden die Zellen zwei Mal in 10mL PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in *freezing* Puffer gelöst (1x10⁷/mL) und 1 mL in neue sterile Kryoröhrchen überführt.

Um eine langsame Kühlung zu gewährleisten, wurden die Kryoröhrchen in einem Kryokonservierungsbehälter über Nacht bei -80°C gelagert. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff (-196°C).

T-Zellen wurden fünf Tage nach der Restimulation resuspendiert und aus der 24 Well Zellkulturplatte geerntet, gepoolt und zentrifugiert (V_{1500 rpm}, 5 min, 4°C). Das Zellpellet wurde anschließend in *freezing* Puffer aufgenommen. Die weiteren Schritte der Kryokonservierung wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen langsam aufgetaut, in ein neues Reaktionsgefäß mit 10 mL vorgelegtem Medium überführt und anschließend zentrifugiert (V_{1500 rpm}, RT, 5 min).

Im Anschluss wurde das Zellepellet resuspendiert und in ein Kultivierungsgefäß ausgesät und im Brutschrank inkubiert.

Für die Rekultivierung von T-Zellen wurde ein Kryoröhrchen in vier Wells einer 24 Well Zellkulturplatte ausgesät und für bei 37°C unter CO₂ gelagert.

Freezing Puffer

FBS	90%
DMSO	10%

Zellzahlbestimmung

Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl einzelner Zelllinien bestimmt. Hierzu wurde die Neubauer-Zählkammer mit 10 µL der Zellsuspension befüllt und zwei 16er Großquadrate gezählt. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel bestimmt.

$$\frac{\Sigma \text{ der gezählten Zellen pro 16er Quadratfeld}}{2} \times a \times b = \text{Zellzahl pro mL}$$

a = Verdünnungsfaktor

b = Kammerfaktor (10⁴)

4.2.3 Virologische Arbeiten**Virusinfektion *in vitro***

Am Vortag der Infektion wurden jeweils 5x10⁸ Zellen pro mL in ein Zellkulturgefäß im jeweiligen Medium ausgesät, um am Tag der Infektion eine maximale Zelldichte zu erreichen. Die Zellen wurden geerntet und in einem 15 mL Reaktionsgefäß zentrifugiert (V_{1500 rpm}, 5 min, 4 °C). Die bei -80 °C gelagerte Virussuspension wurde auf Eis aufgetaut und anschließend im Eiswasser eine Minute sonifiziert sowie mit dem Vortexer geschüttelt, um eine Vereinzelung der Viruspartikel zu erreichen. Die Infektion der Zellen erfolgte in kleinem Volumen mit einer spezifischen MOI. Die infizierten Zellen wurden bei 37 °C inkubiert und alle 10 Minuten resuspendiert. Nach einer Stunde wurde die Virus-Zell-Suspension mit 1 mL frischem Medium versetzt. Eine weitere Stunde später wurden, je nach Bedarf, 1x10⁶-2x10⁶ Zellen gewaschen oder direkt in ein Zellkulturgefäß überführt.

PUVA induzierte Virusinaktivierung

MVA infizierte Zellen wurden mit dem Furocumarin Psoralen (4'-Aminomethyltrioxsalen; 0,3 µg/mL) versetzt und für 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um infektiöse Viruspartikel außerhalb der Zelle zu inaktivieren, wurden die Zellen für weitere 15 Minuten bei 365 nm im UV-Crosslinker (Bio-Link BLX 365, Peqlab) bestrahlt. Unter langwelligem ultraviolettem Licht (UVA) bindet Psoralen kovalent mit Pyrimidin über einen Cyclobutanring. Eine zweite Photoreaktion erlaubt Pyrimidinen, die auf dem gegenüberliegenden benachbarten DNA-Strang lokalisiert sind, sich zu vernetzen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für weitere Experimente verwendet.

Immunisierung

Das Virus wurde in Immunisierungspuffer gelöst, um eine Virusendkonzentration von 10^7 IU (*infectious units*)/mL zu erzielen. Zweihundert µL der Virussuspension wurde den Versuchstieren *intraperitoneal* appliziert. Futter sowie Wasser wurden *ad libitum* angeboten.

4.2.4 Immunologische Arbeiten

Präparation von Splenozyten aus der Maus

Versuchstiere wurden durch zervikale Dislokation getötet. Die Milz wurde unter sterilen Bedingungen entnommen und mittels eines Metallgitters und mit Hilfe eines Spritzenstempels homogenisiert. Das Homogenisat wurde in M2-Medium aufgenommen, filtriert und zentrifugiert ($V_{1500 \text{ rpm}}$, 4 °C, 5 Min.). Um die Erythrozyten zu lysieren, wurde das Zellpellet in 3 mL TAC Puffer bei 37 °C für 2 Minuten inkubiert und anschließend mit 50 mL M2-Medium gewaschen. Die Suspension wurde wiederholt mit Hilfe eines Zellsiebs filtriert und auf die gewünschte Zellezahl eingestellt.

TAC Puffer

90 % NH_4Cl (0,16 M)

10 % TRIS pH 7,65 (0,17 M)

Ex vivo Restimulationsassay von VACV-spezifischen T-Lymphozyten

Die Generierung von Vacciniavirus-spezifischer T-Lymphozyten erfolgte bereits im Voraus durch eine in der Arbeitsgruppe von Prof. Drexler entwickelte Methode [Tao 2013, *unpublished*].

Zur Passagierung wurden die zuvor generierten T-Lymphozyten alle sieben Tage restimuliert. Dafür wurden Splenozyten, wie bereits beschrieben, aus naiven Mäusen isoliert, mit 30 Gy bestrahlt und auf 12×10^6 Zellen/mL eingestellt. EL4-Zellen wurden mit 100 Gy bestrahlt und in neue Reaktionsgefäße aufgeteilt. Vor der Beladung mit Vacciniavirus-spezifischen Peptiden wurden die Zellen mit 20 mL RPMI 1640 Medium gewaschen und in 1 mL resuspendiert. Ein μL ($1 \mu\text{g/mL}$) des jeweiligen Peptids wurde zu den Zellen überführt, um eine finale Endkonzentration von 1 ng/mL zu erzielen. Die Zellsuspension wurde anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert, mit 10 mL M2-Medium gewaschen und auf 1×10^6 Zellen/mL eingestellt. Die Vacciniavirus-spezifischen T-Zellen wurden aus der bestehenden Dauerkultur geerntet und in neuem M2-Medium aufgenommen. Von jeder Komponente wurden 0,5 mL in eine 24 Well Zellkulturplatte überführt und zusätzlich 0,5 mL von 20% TCGF hinzugefügt, um eine TCGF Endkonzentration von 5% zu erreichen. TCGF ist isoliertes konditioniertes Zellmedium aus dem Überstand von Rattensplenozyten, welche mit $5 \mu\text{g/mL}$ Concanavalin A nach Beeton *et al.* [2007] stimuliert wurden.

BMDC Präparation

Der zuvor getöteten Maus wurden beide Beine amputiert und von Fell sowie Muskelgewebe befreit. Nach Desinfektion von Tibia- und Femurknochen mit 70% Ethanol erfolgte anschließend eine Lagerung im M2-Medium. Die Knochen wurden an beiden Seiten geöffnet und drei Mal mit 1 mL M2-Medium gespült. Der Durchfluss wurde in einem Reaktionsbehälter aufgefangen und anschließend zentrifugiert ($V_{1500} \text{ rpm}$, 21°C , 5 Min.). Anschließend folgte die Behandlung des Zellpellets in 5 mL TAC Puffer ($0,144 \text{ M NH}_4\text{Cl}$ und $0,017 \text{ M Tris pH } 7,65$) bei 37°C unter ständigem Schütteln für zwei Minuten. Die Lyse basiert im Allgemeinen auf dem erhöhten Nettozufluss von NH_4Cl in die Erythrozyten, welcher zu einem erhöhten osmotischen Druck führt. Der daraus resultierende Wasserzulauf lässt die Erythrozyten platzen. Um die Reaktion zu inhibieren, wurde mit PBS auf ein Endvolumen von 50 mL aufgefüllt. Im Anschluss wurde die Suspension durch ein

100 μm Zellsieb gefiltert und bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. In 10 cm Petrischalen wurden 9 mL M2-Medium mit 10% GM-CSF vorgelegt. Die Zellen wurden auf 5×10^6 Zellen/mL eingestellt und jeweils 1 mL in die zuvor vorbereiteten Petrischalen ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Inkubator. Am Tag 3 wurden weitere 10 mL M2-Medium (mit 10% GM-CSF) in die Petrischalen hinzugegeben. Sechs Tage nach der Präparation wurden 10 mL Medium mit frischem 10 mL M2 Medium (mit 10% GM-CSF) ausgetauscht. Die BMDCs konnten am siebten Tag für Experimente verwendet werden.

Direkte Präsentation

Sieben Tage alte BMDCs wurden wie unter Punkt 4.2.3 (Virusinfektion *in vitro*) beschrieben infiziert. Es wurden 2×10^6 Zellen in eine 6-Well Zellkulturplatte überführt und für 12 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte die Ernte der Zellen sowie drei Waschschriffe mit M2-Medium. Vier Mal 10^5 infizierte BMDCs wurden mit 2×10^5 Vacciniavirus-spezifischen T-Zellen für vier Stunden koinkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zellfärbung, wie unter dem Punkt 4.2.4 (Oberflächen und intrazelluläre Färbung von Biomarkern) beschrieben.

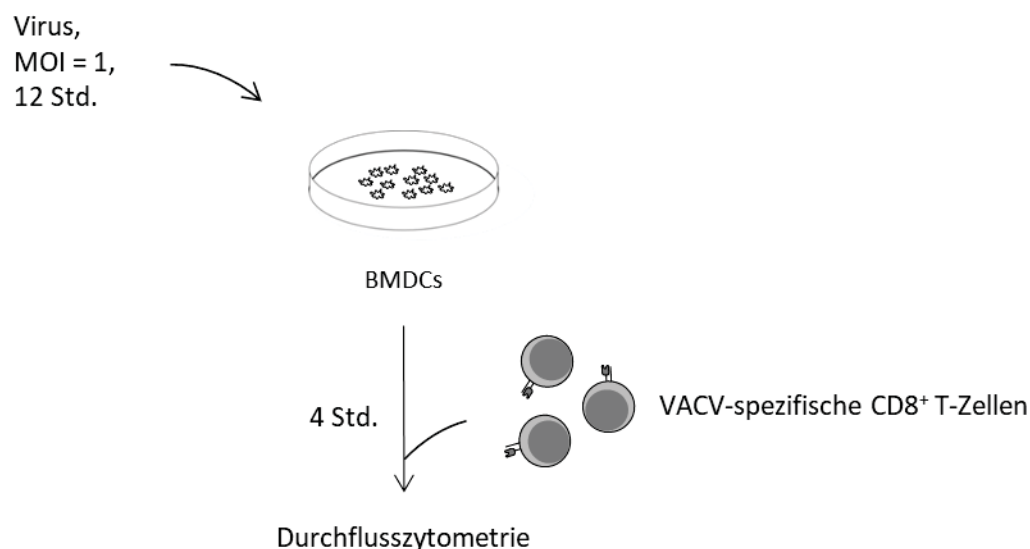


Abb. 5: Schematische Darstellung der direkten Präsentation

Isolierte BMDCs wurden mit einem Virus für 12 Stunden infiziert. Anschließend wurden die infizierten BMDCs mit Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen inkubiert und abschließend mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Kreuzpräsentation

Je nach Versuch wurden Cloudman-Zellen oder BMDCs aus verschiedenen Mauslinien mit MVA (MOI 1), wie in Abschnitt 4.2.3 (Virusinfektion *in vitro*) infiziert. 2×10^6 Zellen wurden drei Mal gewaschen und in 2 mL frischem M2 Medium resuspendiert sowie für weitere 10 Stunden in einer 6-Well-Platte bei 37 °C inkubiert. Nach der insgesamt 12 stündigen Infektion erfolgte die Inaktivierung der Viren mit Psoralen und UVA nach Punkt 4.2.3 (*PUVA induzierte Virusinaktivierung*). Die PUVA behandelten Zellen wurden mit nicht-infizierten Knockout oder Wildtyp BMDCs im Verhältnis 1:1 zusammengeführt und für weitere 12 Stunden inkubiert. Darauffolgend wurde das Zellkonglomerat im Verhältnis 2:1 mit Vacciniavirus-spezifischen T-Zellen für vier Stunden koinkubiert. Anschließend wurden die Zellen, wie im Abschnitt 4.2.4 (Oberflächen und Intrazelluläre Färbung von Biomarkern), gefärbt.

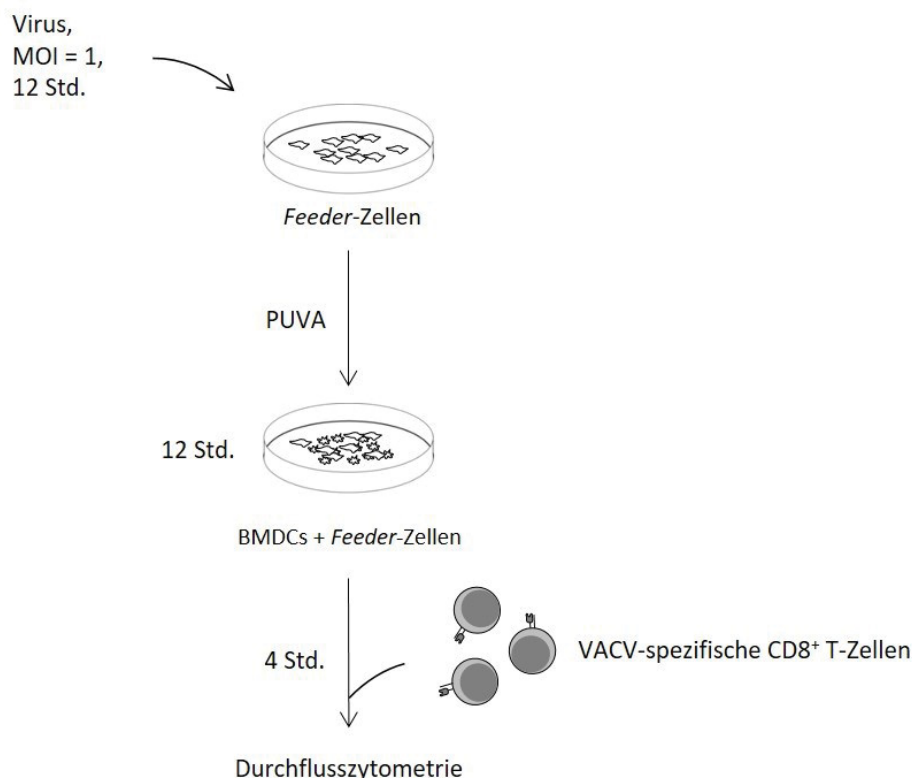


Abb. 6: Strategie zur Kreuzpräsentation

Cloudman S91 Zellen wurden mit einem Virus infiziert und für 12 Stunden inkubiert. Vor der Koinkubation mit isolierten BMDCs wurden die infizierten Cloudman-Zellen mit PUVA behandelt. Eine weitere vierstündige Inkubation mit Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen sowie eine funktionelle Analyse mittels Durchflusszytometrie schlossen sich an.

Oberflächen- und intrazelluläre Färbung von Biomarkern

Vitalitätsfärbung

Wahlweise wurde EMA oder ein Vitalitätsfarbstoff (Viability Dye eFluor660™, eFluor506™ der Firma eBioscience verwendet. Zur Färbung mit EMA wurden die Zellen in eine 96-Well Zellkulturplatte überführt und mit FACS Puffer gewaschen. Anknüpfend folgte eine Inkubation mit 1µg/mL EMA (1:2000) unter hellem Licht für 20 Minuten, um tote Zellen zu markieren. Nach dreimaligem Waschen in einem Endvolumen von 180 µL FACS Puffer (V_{1400} rpm, 2 Min., 4 °C) wurden die Zellen ggf. für weitere Färbungsschritte verwendet. EMA diffundiert in tote oder beschädigte Zellen (permeabilisiert) und interkaliert mit der DNA. Unter Lichteinfluss bindet EMA kovalent und irreversibel an die DNA. Dies verhindert das Ausdiffundieren von EMA aus der Zelle, während anschließender intrazellulärer Färbung bzw. Analyse.

Für die Färbung mit dem Vitalitätsfarbstoff wurden die Zellen, wie bereits für EMA beschrieben, in eine 96-Well Zellkulturplatte überführt und gewaschen. Das Färbeprotokoll erfolgte nach Herstellerangaben. eFluor660-gekoppelter Vitalitätsfarbstoff wurde mit einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. eFluor506-gekoppelter Vitalitätsfarbstoff wurde 1:500 in PBS verdünnt. Wie bei der Färbung mit EMA wurde drei Mal gewaschen (V_{1400} rpm, 2 Min., 4 °C) und ggf. für weitere Färbungsschritte verwendet.

Oberflächen- und intrazelluläre Färbung

Nach der Vitalitätsfärbung wurden die Zellen einzeln oder in Kombination und je nach Experiment gegen verschiedene Oberflächenmarker gefärbt (α -CD8 α [1:300], α -CD11c [1:200], α -CD86 [1:200], α -CD127 [1:200], α -CD62L [1:200], α -CD107 α [1:200]). Eingesetzt wurden 50 µL pro Well und für 30 Minuten auf Eis und im Dunkeln inkubiert.

Anschließend folgte ein Permeabilisierungsschritt mit dem BD Cytofix/Cytopern™ Fixierungskit nach Herstellerangaben.

Nach der Permeabilisierung wurden zellinterne Zytokine angefärbt. Hierfür wurden erneut einzelne oder mehrere Antikörper (α -TNF α [1:300], α -IFN γ [1:400], α -MIP1- α [1:40]) verwendet und für 30 Minuten mit den Zellen im Dunkeln auf Eis inkubiert.

Abschließend wurden die Zellen drei Mal mit 180µL FACS Puffer gewaschen (V_{1400} rpm, 2 Min., 4 °C) und mit 1% PFA fixiert.

FACS Puffer

500 mL DPBS

10 % BSA

0,1 % NaN₃**Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die simultane Messung und Analyse mehrerer physikalischen Eigenschaften einzelner Teilchen, meist Zellen, welche in einer Flüssigkeit durch einen Lichtstrahl fließen. Die gemessenen Eigenschaften umfassen die relative Größe, die relative Granularität oder die innere Komplexität und die relative Fluoreszenzintensität. Diese Eigenschaften werden unter Verwendung eines optisch-elektronischen Kopplungssystems bestimmt, welches aufzeichnet, wie die Zelle das Laserlicht streut und Fluoreszenz emittiert.

In dieser vorliegenden Studienarbeit wurde im Normalfall zuerst die Vitalität mittels EMA oder dem Vitalitätsfarbstoff bestimmt. Anknüpfend wurde gegen spezifische Oberflächenmarker gefärbt und ggf. abschließend intrazelluläre Zytokine angefärbt.

Bestimmung der Endozytoseaktivität und Endosomenfunktionalität

Vier Mal 10⁶ „Tag 7“ *Knockout* und Wildtyp BMDCs wurden in je ein 6-Well überführt und mit 10 µL OVA-AF594 oder OVA-DQTM (1:100; 10 ng/mL) für zwei Stunden bei 37 °C und 4 °C inkubiert. DQ-Ovalbumin ist ein selbst-quenches Konjugat, das bei proteolytischem Abbau eine hellgrüne Fluoreszenz aufzeigt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und, wie in Abschnitt 4.2.4 (Oberflächen und Intrazelluläre Färbung von Biomarkern) beschrieben, gefärbt. Verwendet wurde für die Färbung der Vitalitätsfarbstoff Viability Dye eFluor660TM sowie der Farbmarker gegen CD11c (CD11c-PeCy7). Die Analyse der Zellen erfolgte mittels der Durchflusszytometrie.

Bestimmung des Phänotyps von BMDCs

Sieben Tage alte Knockout und Wildtyp BMDCs wurden, wie unter Punkt 4.2.3 Virusinfektion *in vitro* beschrieben, mit MVA-NP-SIIN-eGFP-P7.5 infiziert.

MVA-NP-SIIN-eGFP-P7.5 ermöglicht zwischen infizierten und nicht-infizierten (*Bystander*-Zellen) zu differenzieren. Anschließend wurden 2×10^6 BMDCs in eine 6-Loch Zellkulturplatte überführt und für weitere 10 Stunden bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte BMDCs. Nach der Inkubation wurden die Zellen gelöst und 200 µL (4×10^5) in Löcher einer 96-Well Zellkulturplatte überführt. Es folgten drei Waschschriffe mit PBS ($V_{1200 \text{ rpm}}$, 4 °C, 2 Min.). Anschließend wurden die Zellen mit dem Vitalitätsfarbstoff Viability Dye eFluor506™ gefärbt. Ferner wurde gegen MHC-II Moleküle, CD11c, CD86 sowie K^bSIIN (SIIN beladene MHC-I Moleküle) gefärbt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

Analyse von murinem (m)IFN-I in Überständen mit Hilfe eines ELISAs

Zur Bestimmung von mIFN α und mIFN β in Überständen aus Direkt- und Kreuzpräsentationen wurden die Überstände nach der Infektion und nach der Koinkubation bei der Kreuzpräsentation gesammelt. Die gesammelten Überstände wurden mit dem Kit LumiKine mIFN α und LumiKine xPress m-IFN β nach Herstellerangaben analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Luminometers.

Analyse funktioneller und phänotypischer Eigenschaften von T-Zellen *in vivo*

Knockout und Wildtyp Mäuse wurden, wie unter Punkt 4.2.3 beschrieben, immunisiert. Zur Bestimmung der Eigenschaften während der Akutphase wurde die Milz sieben Tage und zur Analyse von einer Gedächtnisantwort 30 Tage nach der Immunisierung entfernt. Jeweils 4×10^6 isolierte Splenozyten wurden mit Vacciniavirus-spezifischen Peptiden (Endkonz.: $10^{-8} \pm 1 \mu\text{g/mL}$) und Brefeldin A (Endkonz.: $1 \mu\text{L/mL}$) für fünf Stunden bei 37 °C stimuliert. Als Positivkontrolle wurden CD3 ϵ Antikörper und als Negativkontrolle das nicht im Virus vorkommende Antigen β -Galaktosidase verwendet. Für die funktionelle Analyse wurde, während der Inkubation, gegen den Degranulationsmarker CD107 α gefärbt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit dem Viability Dye eFluor506™ gefärbt sowie gegen CD8 α , IFN γ , TNF α und MIP1- α . Zur phänotypischen Analyse wurden die isolierten Splenozyten direkt und ohne weitere Inkubationsschritte für die Färbung verwendet.

Gefärbt wurde mit B8R- und OVA-spezifischen Tetrameren. Dies erlaubte die Markierung von CD8 α -positiven Zellen ohne eine direkte Aktivierung der Zellen. Neben der Färbung mit dem Viability Dye eFluor506TM wurde des Weiteren gegen CD127 sowie CD62L gefärbt. Dies ermöglicht die Differenzierung der Zellen in Effektorzellen sowie in Effektor- und Zentralgedächtniszellen.

Die Analyse der Zellen erfolgte bei der funktionellen sowie der phänotypischen Bestimmung mittels Durchflusszytometrie.

4.2.5 Proteinbiochemische Arbeiten

Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen MiniProtean®-TetraCell-Elektrophoresekammer durchgeführt. Die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele wurde nach der Nomenklatur von [Hjerten 1962] gekennzeichnet. Hierbei gibt T die prozentuale Konzentration der Gesamtacrylamidmenge im Gel an (Acrylamid und Bisacrylamid) und C kennzeichnet den prozentualen Anteil des Quervernetztes Bisacrylamid an der Gesamtacrylamidmenge.

Für die SDS-Glycin-PAGE wurden die im Folgenden aufgeführten Lösungen verwendet:

Acrylamid-Stammlösung (29:1-Mix)	30% T, 3% C
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4% (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4% (w/v) SDS
Laufpuffer	0,4% M Tris/HCl, 0,1 M Glycin, pH 8,25, 0,1% (w/v) SDS, ($\approx$ pH 8,25)
Probenpuffer (4-fach)	0,4 M Tris/HCl pH 6,8, 40% (v/v) Glycerin, 8% (w/v) SDS, 65 mM β -Mercaptoethanol, 0,02% (w/v) Bromphenol Blau
Ammoniumperoxodisulfat-(APS-) Lösung	10% (w/v) APS in H ₂ O _{dd}

Die Herstellung von Trenn- und Sammelgel mit einer Stärke von 1,0 oder 1,5 mm erfolgte anhand des aufgeführten Schemas:

Lösung	Trenngel 12% T / 2,6% C	Sammelgel 4% T / 2,6% C
Acrylamid-Stammlösung	1,6 mL	0,266 mL
Gelpuffer	10 mL	0,5 mL
H ₂ O _{dd}	1,2 mL	1,234 mL
Glycerin (99%, w/v)	0,2 mL	-----
TEMED	2 μ L	1,6 μ L
APS-Lösung	20 μ L	16 μ L

Die mit der entsprechenden Menge an Probenpuffer versetzten Proteinproben wurden vor dem Beladen durch Aufkochen (10 min, 95°C) denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 95 Volt (SDS-Glycin-PAGE) durchgeführt. Die Kalibrierung der Gele erfolgte mit einem Gemisch aus Standardproteinen mit bekannten Molekulargewichten (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific).

Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot)

Die Proteine wurden mittels Elektrotransfer im Semi-Dry-Blotting Verfahren [Khyse-Andersen 1984] von den Polyacrylamidgelen auf eine Nitrozellulosemembran [Matsudaira 1987] übertragen und immobilisiert. Hierfür wurde zunächst die hydrophobe Nitrozellulosemembran mittels Methanol aktiviert. Der Elektrotransfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte mit 100 mA/cm² für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Membran sowie das verwendete Filterpapier wurden zuvor in Transferpuffer getränkt.

Transferpuffer (für Western Blot):

25 mM Tris	15 g
SDS	0,1%
192 mM Glycin	72 g
Methanol	20%
H ₂ O _{dd}	ad 5 L

Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Antikörperinkubation

Zuerst wurde die Nitrozellulosemembran für mindestens zwei Stunden in einer Lösung, bestehend aus 5% Magermilchpulver, in TBS-T inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem entsprechenden primären Antikörper in einer 1%igen BSA-Lösung oder 5%igen Magermilchlösung über Nacht bei 4°C unter ständigem Invertieren. Im weiteren Verlauf wurde die Membran 3 x 5 min in TBS-T gewaschen und mit dem sekundären, HRP (engl. *horseradish peroxidase*)-gekoppelten Antikörper in 5% Magermilchlösung für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten noch weitere Waschschr

2 x 10 min in TBS-T und 1 x 10 min mit PBS. Der sekundäre Antikörper ist ein IRDye-konjugierter Immunglobulin-G-Antikörper und muss eine Spezifität für diejenige Spezies besitzen, in der der primäre Antikörper generiert wurde (z. B. anti-Kaninchen-IgG).

Die Antigen-Antikörper-Komplexe konnten über die IRDye-Aktivität anhand von Fluoreszenz im Infrarot und im nahen Infrarot-Bereich mit dem Fluoreszenzdetektionsgerät der Firma Li-COR detektiert und nachgewiesen werden.

Blockierungslösung

5% Milchpulver	2 g
1x TBS-T	ad 50 mL

10x Tris Buffered Saline (TBS)

1 M Tris/HCl (pH 7,5)	500 mL
NaCl	90 g
H ₂ O _{dd}	ad 1 L

TBS-T

10x TBS	100 mL
Tween20	1 mL
H ₂ O _{dd}	ad 1 L

5 Ergebnisse

5.1 *In vitro*

5.1.1 AraC Behandlung von Feeder-Zellen inhibiert die Kreuzpräsentation von frühen Antigenen

Ausgangspunkt dieser Forschungsarbeit war folgendes Experiment, das von Tao [2013] bereits durchgeführt und während dieser Arbeit wiederholt und erweitert wurde:

Aus C57BL/6N Mäusen wurde das Knochenmark zur Isolierung von dendritischen Zellen, wie in Abschnitt 4.2.4 *BMDC Präparation* beschrieben, entnommen. Cloudman-Zellen, die hierbei als *Feeder*-Zellen fungieren, wurden mit einem rekombinanten MVA-Konstrukt infiziert (MOI = 1), welches das Modellprotein Ovalbumin in der Frühphase der Infektion exprimiert (MVA-früh-OVA).

Die Infektion der Cloudman-Zellen erfolgte über 12 Stunden unter bzw. ohne Einfluss von Cytarabin (araC). Cytarabin ist ein Isomer des Nukleosids Cytidin, das als „falscher Baustein“ während der DNA-Replikation in die virale DNA eingebaut wird und somit die intermediäre sowie späte Antigenexpression verhindert. Es ist hierbei explizit zu erwähnen, dass araC keinen Einfluss auf die frühe virale Genexpression hat [Tao 2013, *unpublished*]. Ferner hat Tao [2013] aufgezeigt, dass die direkte Zugabe von araC zu Antigen-präsentierenden Zellen die Aktivierung von Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nicht inhibiert oder einschränkt.

Nach der Infektion wurden die Cloudman-Zellen mit Psoralen und UVA behandelt und für weitere 12 Stunden mit den isolierten BMDCs koinkubiert. Abschließend wurde die Koinkubation mit OVA- und B8R-spezifischen T-Zellen für 4 Stunden inkubiert. Die Analyse der Zellen erfolgte mittels der Durchflusszytometrie. Untersucht wurden die vitalen aktivierten T-Zellen auf die IFN γ -Produktion (Abb. 7; TNF α : Anhang. Abb. 1). Ferner ist zu erwähnen, dass beide untersuchten Antigene (OVA, B8R) früh während des viralen Zyklus exprimiert werden.

So zeigte die Kreuzpräsentation nach Inkubation ohne araC die zu erwartende Aktivierung der VACV-spezifischen CD8 T-Zellen sowohl für Ovalbumin als auch für B8R (Abb. 7A). Konträr dazu, wurde nach der Inkubation mit araC keine OVA- sowie B8R-sepzfische Aktivierung beobachtet (Abb. 7B). Wie bereits erwähnt, sind die analysierten Antigene

frühe virale Proteine und somit sollte die Inkubation mit araC keinen Einfluss auf Aktivierung der T-Zellen aufzeigen (Anhang Abb. 2). Schlussfolgernd hebt die Inhibition der viralen DNA-Synthese und die darauffolgende späte Genexpression in *Feeder*-Zellen die Aktivierung von B8R- und OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auf.

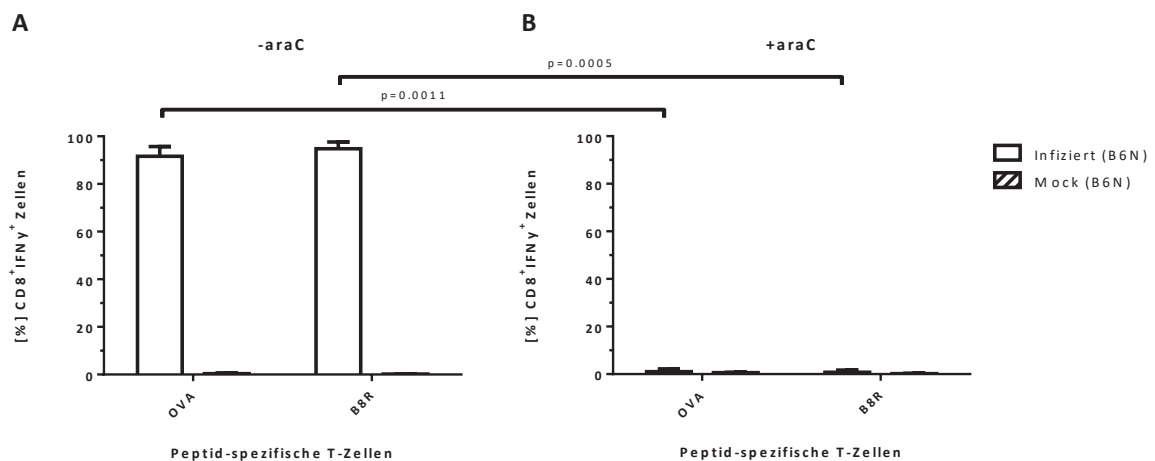


Abb. 7: IFN γ Produktion von Vacciniavirus-spezifischen T-Zellen nach Kreuzpräsentation mit und ohne araC.

Cloudman-Zellen (2×10^6) wurden mit MVA-früh-OVA mit einer MOI = 1 infiziert. OVA- und B8R-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden, nach einer 4 stündigen Koinkubation mit kreuzpräsentierenden WT-BMDCs, auf ihre IFN γ Produktion analysiert. Dabei wurden die Cloudman „Feeder-Zellen“ ohne (A) und mit (B) araC (40 μ g/mL) inkubiert.

Als Kontrolle dienten nicht infizierte Cloudman-Zellen (Mock).

n=2; Durchschnitt + SD.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde vermutet, dass für diesen inhibitorischen Effekt ein angeborener unbekannter Immunfaktor verantwortlich ist. Dieser unbekannte Faktor wird benötigt, um benachbarte nicht-infizierte Antigen-präsentierenden Zellen für eine effiziente Kreuzpräsentation zu stimulieren. Um einen genauen Einblick zu bekommen, warum die Kreuzpräsentation von MVA-Antigenen durch nicht-infizierte dendritische Zellen von der viralen DNA-Replikation in infizierten antigenproduzierenden Zellen abhängt, wurden im Folgenden die Immunfaktoren STING, TLR9 und IFNAR1 untersucht.

5.1.2 STING hat keinen Einfluss auf die direkte- sowie Kreuz-Präsentation

STING nimmt, wie in Punkt 3.3.1 beschrieben, eine wichtige immunregulatorische Aufgabe bezüglich der Erkennung von cytosolischer Fremd-DNA ein. Da araC in den Replikationszyklus von MVA eingreift und somit der Effekt der aufgehobenen CD8⁺ T-Zellantwort mit der Erkennung von viraler DNA möglicherweise verbunden sein könnte, wurde STING in den Fokus der primären Untersuchungen gefasst.

Um die Rolle von STING während der Antigenpräsentation zu untersuchen, wurden STING-defiziente dendritischen Zellen aus dem Knochenmark von STING^{-/-} Mäusen als APC sowohl für die Kreuzpräsentation als auch für die direkte Präsentation verwendet. Hierfür wurden Cloudman-Zellen (Kreuzpräsentation) bzw. BMDCs (direkte Präsentation) mit einer MOI von 1 mit rekombinanten MVA infiziert, welche Ovalbumin entweder früh (MVA-f-OVA) oder spät (MVA-s-OVA) während des viralen Replikationszyklus exprimieren. Als Kontrolle dienten jeweils nicht-infizierte Cloudman-Zellen sowie STING^{-/-} und STING^{+/+} BMDCs.

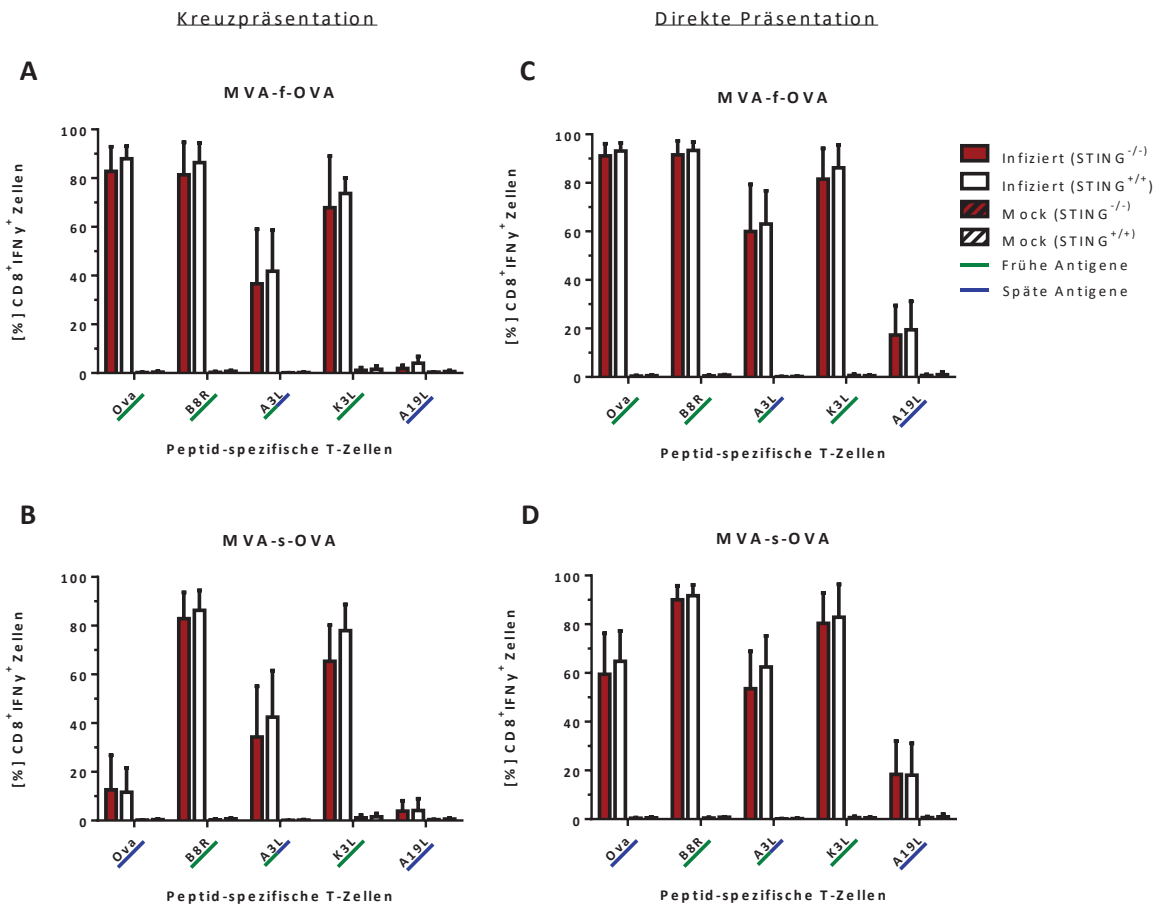


Abb. 8: Die CD8⁺ T-Zell Aktivierung ist unabhängig von STING in BMDC.

Vacciniavirus-spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden nach einer direkten- oder Kreuz-Präsentation auf ihre IFNγ Produktion analysiert. Dabei wurden bei der Kreuzpräsentation Cloudman-Zellen als *Feeder* (2×10^6) als auch BMDCs (4×10^6) bei der direkten Präsentation mit MVA infiziert (MOI = 1), welches Ovalbumin entweder früh (A+C) oder spät (B+D) während des Replikationszyklus exprimiert. Die eingesetzten dendritischen Zellen wurden aus STING^{-/-} und STING^{+/+} Mäusen generiert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Cloudman- und BMDCs (Mock). n=3; Durchschnitt + SD.

Abbildung 8 zeigt die IFNγ Produktion der aktivierten Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Sowohl die Kreuzpräsentation als auch die direkte Präsentation der viralen Antigene zeigte keinen Unterschied zwischen STING-positivem (rote Balken) und STING-negativem (weiße Balken) Genotyp. Der Vergleich der CD8⁺ T-Zell Aktivierung durch frühe bzw. späte Antigene weist auf eine deutlich verminderte CD8⁺-Antwort bei den späten (blau) Antigenen, im Gegensatz zu den früh (grün) im Replikationszyklus exprimierten Antigenen, auf. Dieser Effekt ist für die Kreuzpräsentation besonders ausgeprägt

(Abb. 8A und B) und deutlich am Modelantigen Ovalbumin zu beobachten (Früh: ~80%; Spät: ~10%). Ausgehend von diesen *in vitro* Ergebnissen (TNF α : Anhang Abb. 3) kann vermutet werden, dass STING keinen Einfluss auf die Aktivierung von CD8+ T Zellen durch Kreuzpräsentation oder direkte Präsentation hat.

5.1.3 Die MVA-induzierte Produktion von Typ-I-Interferonen ist STING abhängig und araC beeinflusst stark die IFN-I-Induktion während der Kreuzpräsentation

Wie bereits von Dai *et. al* [2014] dargestellt, zeigten dendritische Zellen aus STING-defizienten (STING^{GT/GT}-Mäusen (*Goldenticket*) eine aufgehobene IFN-I Produktion während einer Infektion mit MVA. Um zu untersuchen, ob die IFN-I-Produktion während der Kreuzpräsentation bzw. direkten Präsentation in diesem Versuchsaufbau beeinflusst ist, wurden Cloudman-Zellen sowie dendritische Zellen aus STING^{+/+} und STING^{-/-} Mäusen mit MVA-f-OVA ohne oder unter Einfluss von araC (40 μ g/ml) infiziert (MOI = 1).

Nach 12 Stunden wurden die Überstände aus der Cloudman- (Abb. 9A) und DC-Infektion geerntet (Abb. 9B). Ferner wurde bei der Kreuzpräsentation der Überstand nach der Koinkubation der Cloudman mit dendritischen Zellen analysiert (Abb. 9C). Nicht-infizierte Cloudman und dendritische Zellen des jeweiligen STING-Genotyps wurden als Kontrolle verwendet. Mittels eines Lumineszenz-ELISAs konnte gezeigt werden, dass STING eine kritische Rolle bei der IFN-I Induktion sowohl während der direkten- als auch während der Kreuzpräsentation einnimmt (Abb. 9B und 9C). Demnach konnte kein Interferon- α in den STING^{-/-}-Überständen nachgewiesen werden. Anknüpfend zeigten auch infizierte Cloudman-Zellen keine nachweisbare IFN-I Produktion. Interessanterweise war während der Kreuzpräsentation die Typ-I-Interferonproduktion im höchsten Maß an die virale DNA-Replikation verknüpft (Abb. 9C, +araC). Des Weiteren wurde die IFN-I-Induktion durch die durch araC eingeschränkte virale DNA-Replikation auch während der direkten Präsentation beeinflusst. Wie in Abb. 9B (Vgl.: -araC vs. +araC) aufgezeigt, war die IFN α -Produktion beim STING^{+/+} Phänotypen um etwa 85% (p= 0.0147) reduziert.

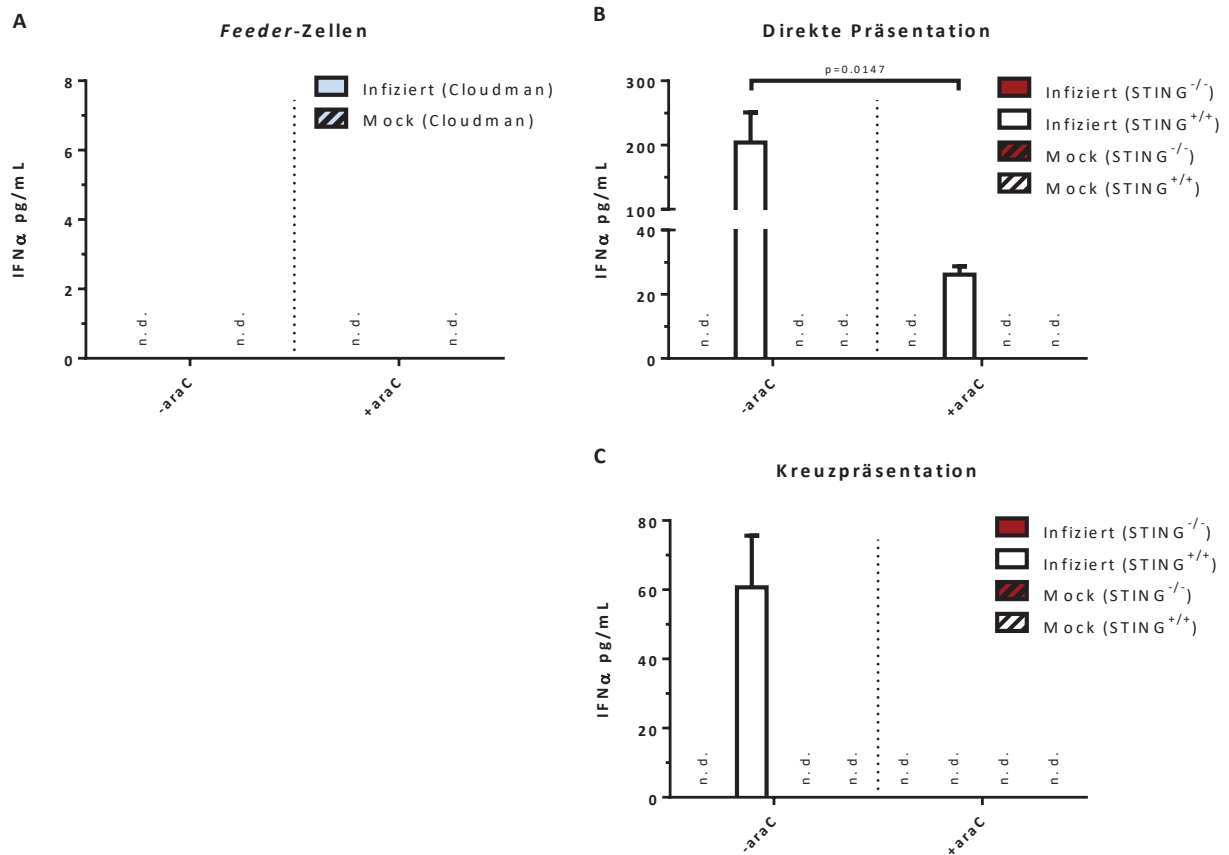


Abb. 9: MVA-induzierte IFN-I Produktion in BMDC ist strikt STING abhängig und die virale DNA-Replikation beeinflusst im hohen Maß die IFN-I Induktion.

Zwei Mal 10^6 Cloudman-Zellen (Kreuzpräsentation) sowie 4×10^6 DCs aus STING^{-/-} und STING^{+/+} Mäusen wurden mit MVA-f-OVA mit einer MOI von 1 infiziert.

Nach der Infektion (Abb. 9A und 9B) und nach der Koinkubation (Abb. 9C), wurde der Überstand geerntet und mittels eines Lumineszenz-ELISAs der IFN- α -Gehalt gemessen. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Cloudman- und dendritische Zellen (Mock).

n=3 für die Kreuzpräsentation; n=2 für die direkte Präsentation; Durchschnitt + SD; n.d. = nicht detektierbar.

5.1.4 Löslichen Faktoren haben keinen Einfluss auf frühe antigenspezifische CD8⁺ T-Zellaktivierung.

Wie in Abschnitt 5.1.1 beschrieben, ist die Vacciniavirus-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort komplett aufgehoben, wenn man die virale DNA-Replikation mit araC in den *Feeder*-Zellen inhibiert. Um den Einfluss eines löslichen Faktors auf die CD8⁺ T Zellantwort zu untersuchen, wurden die Überstände (nach 12-stündiger Infektion) von araC-behandelten Cloudman-Zellen zu einer araC-unbehandelten Kokultur (araC-neg. Cloudman + BMDCs) hinzugefügt. Des Weiteren wurde die Kokultur (araC-behandelte Cloudman-Zellen + BMDCs) mit araC-negativen Überständen von infizierten Cloudman-Zellen inkubiert.

Als Kontrolle dienten araC-positive und araC-negative Überstände, die jeweils passend zu Kokulturen mit araC-behandelten bzw. unbehandelten *Feeder*-Zellen hinzugegeben wurden. Alle Cloudman-Zellen wurden mit MVA-f-OVA infiziert (MOI = 1). Der genaue Versuchsaufbau ist in Abbildung 10 aufgeführt.

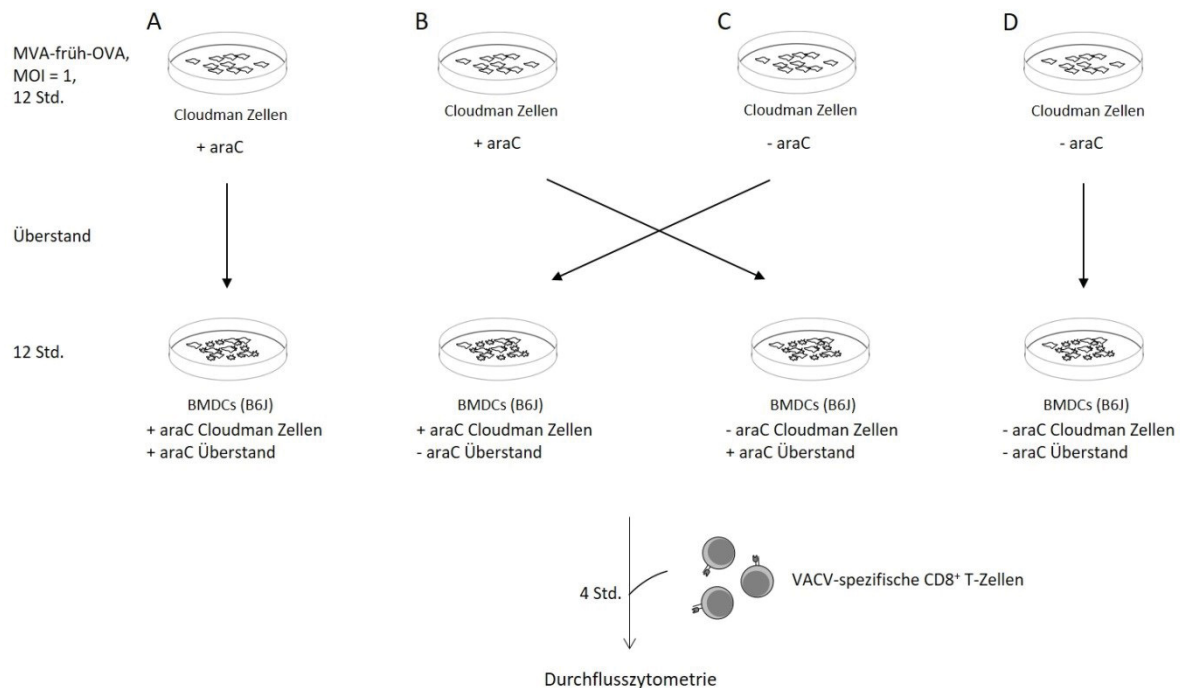


Abb. 10: Antigenpräsentationsversuch mit gekreuzten Überständen.

Zwei Mal 10^6 Cloudman-Zellen wurden mit MVA-f-OVA mit einer MOI von 1 für 12 Std. infiziert.

Nach der Infektion und PUVA-Behandlung wurden die infizierten *Feeder*-Zellen mit 2×10^6 C57BL/6J BMDCs wie folgt kokultiviert:

- (A) Überstand von araC-behandelten (araC-pos.) Cloudman-Zellen mit araC-pos. Cloudman-Zellen und BMDCs (Kontrolle 1)
- (B) Überstand von araC-pos. Cloudman-Zellen mit araC-unbehandelten (araC-neg.) Cloudman-Zellen und BMDCs.
- (C) Überstand von araC-neg. Cloudman-Zellen mit araC-pos. Cloudman-Zellen und BMDCs.
- (D) Überstand von araC-neg. Cloudman-Zellen mit araC-neg. Cloudman-Zellen und BMDCs (Kontrolle 2)

Die Kokulturen wurden mit Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen für weitere 4 Std. inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Analyse der Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zell Aktivierung ist in Abbildung 11 dargestellt und weist für die früh im viralen Replikationszyklus exprimierten Antigene (OVA, B8R, A3L) auf keinen Einfluss eines löslichen Faktors hin, der die virus-spezifische CD8⁺ Immunantwort inhibiert bzw. reaktiviert (+ - vs. - -). Lediglich für die späten Antigene D13L und A19L scheint die CD8⁺ T-Zellantwort nicht signifikant reduziert zu sein (+ - vs. - -).

Dieser Effekt ist interessant, da Tao [2013] dargestellt hat, dass araC nur einen Effekt auf die *Feeder*-Zellen hat und keinen Einfluss auf die CD8⁺ T-Zellantwort bei späterer Zugabe zu den antigenpräsentierenden Zellen (Daten nicht gezeigt). Dies bedarf deshalb weiterer Untersuchungen. Überdies beinhaltet der Überstand ohne araC keinen löslichen Faktor, der den Effekt von araC hinsichtlich der aufgehobenen IFN γ -Induktion in den BMDC wiederherstellt (- +). Die gleichen Ergebnisse wurden hinsichtlich der TNF α -Produktion beobachtet (TNF α : Anhang Abb. 4).

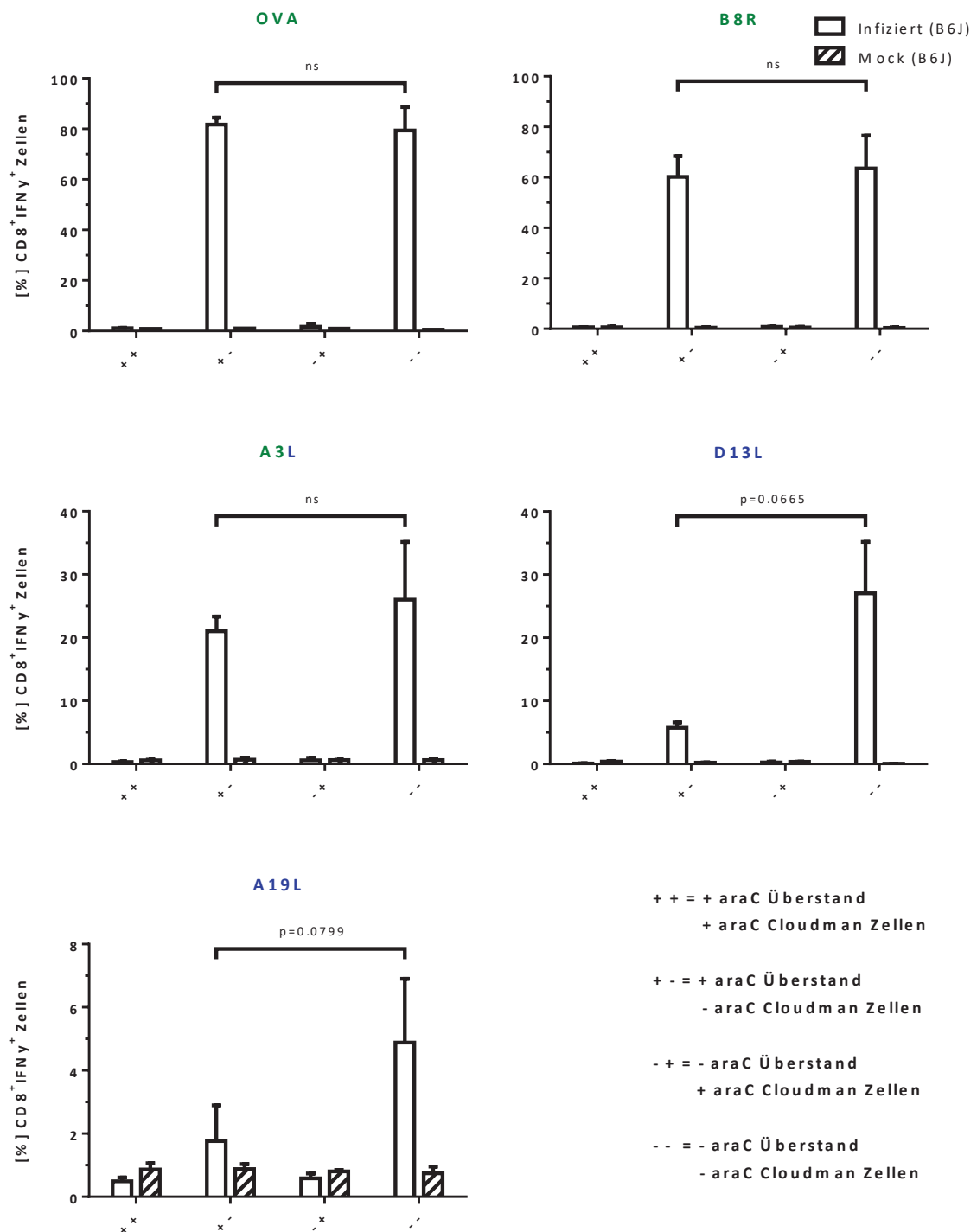


Abb. 11: Lösliche Faktoren beeinflussen möglicherweise die CD8⁺ T-Zellantwort gegen späte Antigene während der Kreuzpräsentation

Cloudman-Zellen wurden mit MVA-früh-OVA (MOI = 1) infiziert. Nach der 12 stündigen Infektion wurden Cloudman- mit dendritischen Zellen, wie in Abbildung 10 beschrieben, kokultiviert und abschließend jeweils mit OVA-, B8R-, A3L-, D13L-, und A19L-spezifischen CD8⁺ T-Zellen für weitere vier Stunden kokultiviert.

Die Auswertung der IFN γ -Induktion erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

OVA, B8R, A3L: n=3; Durchschnitt + SD.

D13L, A19L: n=2; Durchschnitt + SD.

5.1.5 Die IFN-I-Induktion während der Kreuzpräsentation ist abhängig von STING in Feeder-Zellen.

Um die Abhängigkeit der IFN-I-Induktion von STING während der Kreuzpräsentation zu untersuchen, wurden 2×10^6 BMDCs aus STING^{-/-} Mäusen mit MVA-früh-OVA (MOI = 1) für 12 Stunden infiziert. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben, mit PUVA behandelt und mit weiteren nicht-infizierten 2×10^6 STING^{+/+} sowie STING^{-/-} BMDCs zusammengefügt und für weitere 12 Stunden koinkubiert.

Die Überstände wurden jeweils nach der MVA-f-OVA Infektion der STING^{-/-} *Feeder*-Zellen sowie nach der Koinkubation mit den antigenpräsentierenden Zellen geerntet und mittels eines Lumineszenz-ELISAs analysiert. Zur besseren Darstellung und zum besseren Vergleich der IFN-I-Werte sind in Abbildung 12B und 12E auch die Überstände der direkten Präsentation dargestellt.

Dabei zeigten sowohl die *Feeder*-Zellen (Abb. 12A) als auch die Mock-Kontrollen (Abb. 12B und 12C) keine IFN α -Produktion. Überdies bewegte sich der IFN β -Gehalt in den Überständen für die *Feeder*-Zellen und der Mock-Kontrolle auf basalem Niveau (Abb. 12D – 12F).

Überdies konnte keine IFN α bzw. nur eine basale IFN β -Produktion bei der Kokultivierung mit den STING^{+/+}- bzw. ^{-/-}-APCs gemessen werden, wenn die als *Feeder*-Zellen verwendeten BMDCs aus STING-negativen Mäusen generiert wurden (Abb. 12C und 12F). Dieser Effekt ist besonders interessant, da die IFN-I-Produktion sogar mit STING^{+/+}-APCs nicht induziert wird (Vgl: Abb. 9C (STING^{+/+}; -araC) vs. 12C und 12F (STING^{+/+})). Damit zeigt sich durch die ausbleibende IFN-I-Induktion der gleiche Phänotyp wie bei der Kreuzpräsentation mit inhibierter viraler DNA-Replikation (Vgl: Abb. 9C (STING^{+/+}; +araC)). Somit lässt sich resümieren, dass die Produktion von Typ-I-Interferonen von STING in *Feeder*-Zellen abhängig ist.

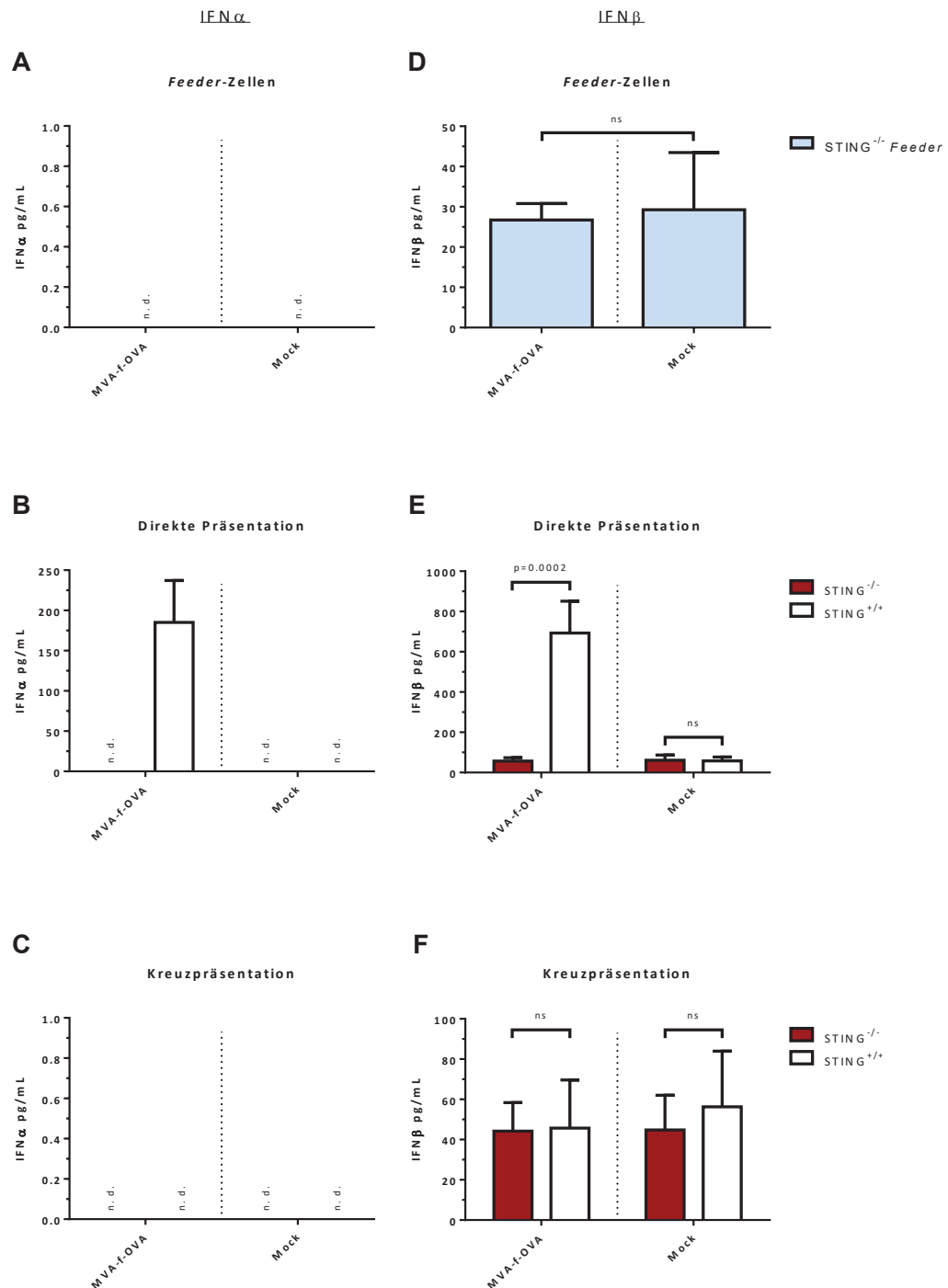


Abb. 12: Die Induktion von Typ-I-Interferonen ist strikt STING-gekoppelt

Für die Kreuzpräsentation wurden 2×10^6 STING $^{-/-}$ -BMDCs mit MVA-f-OVA (MOI = 1) infiziert. Infizierte STING $^{-/-}$ -BMDCs wurden zu 2×10^6 nicht-infizierten STING $^{-/-}$ oder STING $^{+/+}$ -BMDCs überführt und für 12 Std. koinkubiert. Der Überstand wurde sowohl nach der Infektion der *Feeder*-Zellen als auch nach der Koinkubation auf den IFN-I-Gehalt mittels eines Lumineszenz-ELISAs analysiert. Für die direkte Präsentation wurden 4×10^6 STING $^{-/-}$ und STING $^{+/+}$ - BMDCs mit MVA-f-OVA (MOI = 1) infiziert und die Überstände ebenfalls mittels eines ELISAs untersucht.

Als Kontrolle dienten Überstände von nicht-infizierten STING $^{-/-}$ bzw. STING $^{+/+}$ - BMDCs (Mock).

n=3; Durchschnitt + SD.

5.1.6 STING in humanen *Feeder*-Zellen hat vermutlich keinen signifikanten Einfluss auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit von Vacciniavirus-spezifischen Antigenen

Die jeweiligen HEK-Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe um Veit Hornung mittels des pRP-Retrovirus transduziert und unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Sowohl bei cGAS als auch bei STING handelt es sich um den murinen Genotyp. Wildtyp-HEK-Zellen (HEK-cG⁻ST⁻) sind sowohl cGAS- als auch STING-negativ.

Neben den Cloudman-Zellen sowie BMDCs konnten diese HEK-Zellen als *Feeder*-Zellen während der Kreuzpräsentation verwendet werden. Hierfür wurden 2×10^6 HEK-Zellen mit MVA-f-OVA infiziert und nach einer 12 stündigen Infektion für weitere 12 Stunden mit Wildtyp-BMDCs (B6J) koinkubiert. Abschließend erfolgte eine Koinkubation mit Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen sowie die Analyse mittels Durchflusszytometrie.

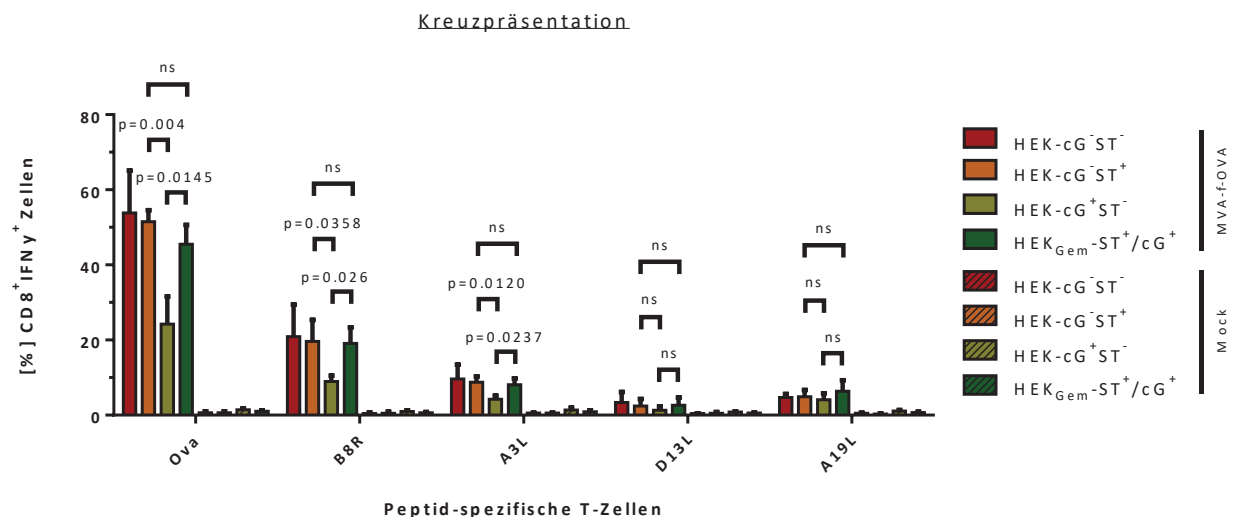


Abb. 13: Die Kreuzpräsentation mit HEK-Zellen als *Feeder* ist vermutlich STING-unabhängig

Für die Kreuzpräsentation wurden jeweils 2×10^6 HEK-Zellen mit MVA-f-OVA (MOI = 1) für 12 Std. infiziert. Infizierte HEK-Zellen wurden zu 2×10^6 B6J-BMDCs überführt und für weitere 12 Std. koinkubiert. Nach der Koinkubation erfolgte die vierstündige Inkubation mit CD8⁺ T-Zellen und die abschließende Analyse der CD8⁺ T-Zellantwort (IFN γ) mittels der Durchflusszytometrie.

Als Kontrolle dienten nicht-infizierte HEK-Zellen (Mock).

HEK-cG⁻ST⁻ = HEK-Wildtyp (ohne cGAS und STING)

HEK-cG⁻ST⁺ = HEK mit STING-*Knockin*

HEK-cG⁺ST⁻ = HEK mit cGAS-*Knockin*

HEK-cG⁺/ST⁺ = Zellgemisch aus HEK-cG⁻ST⁻ und HEK-cG⁻ST⁺ im Verhältnis 1:1

n=3; Durchschnitt + SD.

OVA: HEK-cG⁻ST⁺ vgl. HEK-cG⁺ST⁻ p=0.004, HEK-cG⁺ST⁻ vgl. HEK_{Gem}-ST⁺/cG⁺: p=0.0145;

B8R: HEK-cG⁻ST⁺ vgl. HEK-cG⁺ST⁻: p=0.0358, HEK-cG⁺ST⁻ vgl. HEK_{Gem}-ST⁺/cG⁺: p=0.026;

A3L: HEK-cG⁻ST⁺ vgl. HEK-cG⁺ST⁻ p=0.0120, HEK-cG⁺ST⁻ vgl. HEK_{Gem}-ST⁺/cG⁺: p=0.0237;

ns = nicht signifikant

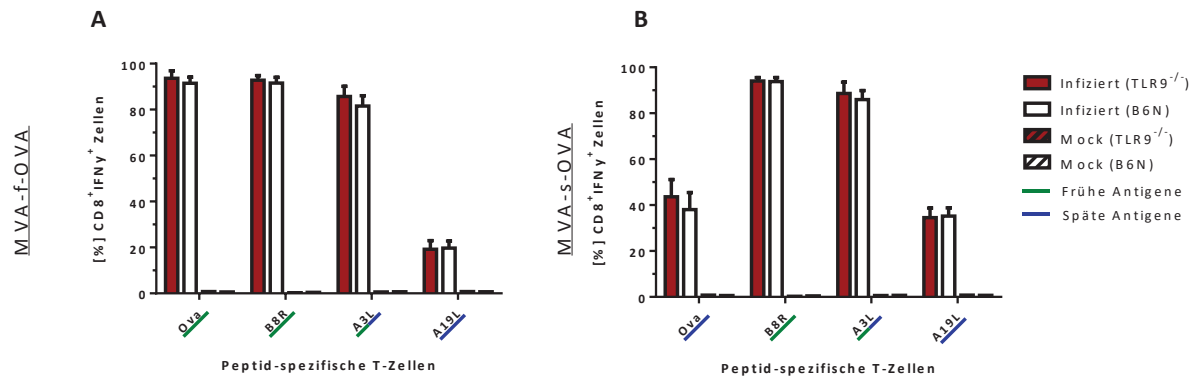
Wie in Abbildung 13 dargestellt (TNF α : Anhang Abb. 7), zeigte die Kreuzpräsentation mit HEK-cG⁺ST⁻ *Feeder*-Zellen eine signifikant reduzierte T-Zellantwort gegenüber HEK-cG⁻ST⁺ und HEK-cG⁺/ST⁺. Die eingeschränkte Kreuzpräsentation bei HEK-cG⁺ST⁻ konnte für jedes virale Antigen beobachtet werden (OVA – A19L). D13L sowie A19L zeigen jedoch hierbei nur eine Tendenz statt einer Signifikanz.

Überraschenderweise zeigt die Kreuzpräsentation mit HEK-cG⁻ST⁻ Zellen keine eingeschränkte CD8⁺ T-Zellaktivierung. Damit ist die Ergebnislage in diesem Experiment widersprüchlich und erfordert weitere Untersuchungen (z.B. mit anderen *Feederzellen*).

5.1.7 TLR9 in Antigen-präsentierenden Zellen haben keinen Einfluss auf die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen

Wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, spielt TLR9 eine große Rolle bei der Erkennung und Bekämpfung einer viralen Infektion. Um den Einfluss weiterer angeborener Immunfaktoren auf die Induktion einer Vacciniavirus-spezifischen T-Zell-Immunität zu untersuchen, wurde neben STING auch der CpG-DNA-bindende TLR9, ein pathogene Muster erkennender Rezeptor, im Folgenden analysiert. Hierzu wurden BMDCs aus TLR9-*Knockout*- und C57BL/6N- (Wildtyp) Mäusen isoliert und für die Kreuzpräsentation als APCs verwendet. Im Fokus der weiteren Untersuchungen stand nur die Kreuzpräsentation, da der Effekt der ausbleibenden CD8⁺-T-Zellantwort für frühe Antigene nur während der Kreuzpräsentation beobachtet wurde (Siehe Abschnitt 5.1.1). Es wurden 2x10⁶ Cloudman-Zellen, die als *Feeder*-Zellen fungierten, mit MVA-f-OVA und MVA-s-OVA infiziert (MOI = 1) und mit jeweils 2x10⁶ TLR9^{-/-} sowie TLR9^{+/+}-BMDCs (Wildtyp) inkubiert.

Die Abschließende Koinkubation mit OVA-, B8R-, A3- und A19-spezifischen T-Zellen erfolgte für vier Stunden. Die CD8⁺ T-Zellaktivität wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.



Feeder-Zellen = Cloudman Zellen

Abb. 14: TLR9 beeinflusst nicht die Kreuzpräsentation-induzierte CD8⁺ Aktivierung

Zwei mal 10^6 Cloudman-Zellen wurden mit MVA-f-OVA bzw. MVA-s-OVA (MOI = 1) infiziert und jeweils zu 2×10^6 nicht-infizierten TLR9^{-/-} bzw. B6N-BMDCs überführt und koinkubiert. Die Feeder-APC Kokulturen wurden überdies für weitere vier Stunden mit Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen inkubiert und anknüpfend mittels Durchflusszytometrie auf Aktivität analysiert (CD8⁺IFNγ⁺).

Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Cloudman-Zellen (Mock).

n=3 für TLR9; Durchschnitt + SD.

Abbildung 14 stellt die Vacciniavirus-spezifische CD8⁺IFNγ⁺ T-Zellantwort dar (TNFα: Anhang Abb. 8). TLR9 zeigte keinen Einfluss auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit und somit auf die davon induzierte CD8⁺ Immunität *in vitro*.

5.1.8 Exklusiv STING und nicht IFNAR1 oder TLR9 beeinflusst die Reifung von Bystander-BMDCs während einer MVA-Infektion

Im Jahre 2011 haben Pascutti *et al.* beschrieben, dass während einer MVA-Infektion vorwiegend *Bystander*-DCs ausreifen und funktionstüchtig werden.

Um besser verstehen zu können, welche Bedeutung die Immunfaktoren STING, TLR9 und IFNAR1 auf die Antigenpräsentationsmaschinerie bzw. auf eine Vacciniavirus-induzierte CD8⁺-Antwort besitzen, wurden BMDCs aus STING-, TLR9-, und IFNAR1-defizienten Mäusen hergestellt und auf ihre Funktionalität (Anhang Abb. 9) und Reifungseigenschaften analysiert. Da während der Kreuzpräsentation *Bystander*-BMDCs ebenfalls die Hauptrolle einnehmen, wurden die jeweiligen BMDCs mit einem eGFP-exprimierenden MVA infiziert (12 Std., MOI = 0.5 – 1). Die Infektion mit diesem rekombinanten MVA lässt die Distinktion zwischen Infizierten (eGFP_{pos}) und *Bystander* (eGFP_{neg}) BMDCs zu. Die Phänotypischen-Eigenschaften, wie die BMDC-Frequenz (CD11c; Anhang Abb. 9), die Infektionsrate

(eGFP_{pos}; Anhang Abb. 9), die MHC-I-Präsentationsfähigkeit (MHC-I/SIIN-Komplex; Anhang Abb. 9) sowie Reifungsmarker (CD86 und MHC-II) der STING-, TLR9- und IFNAR1-BMDCs wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

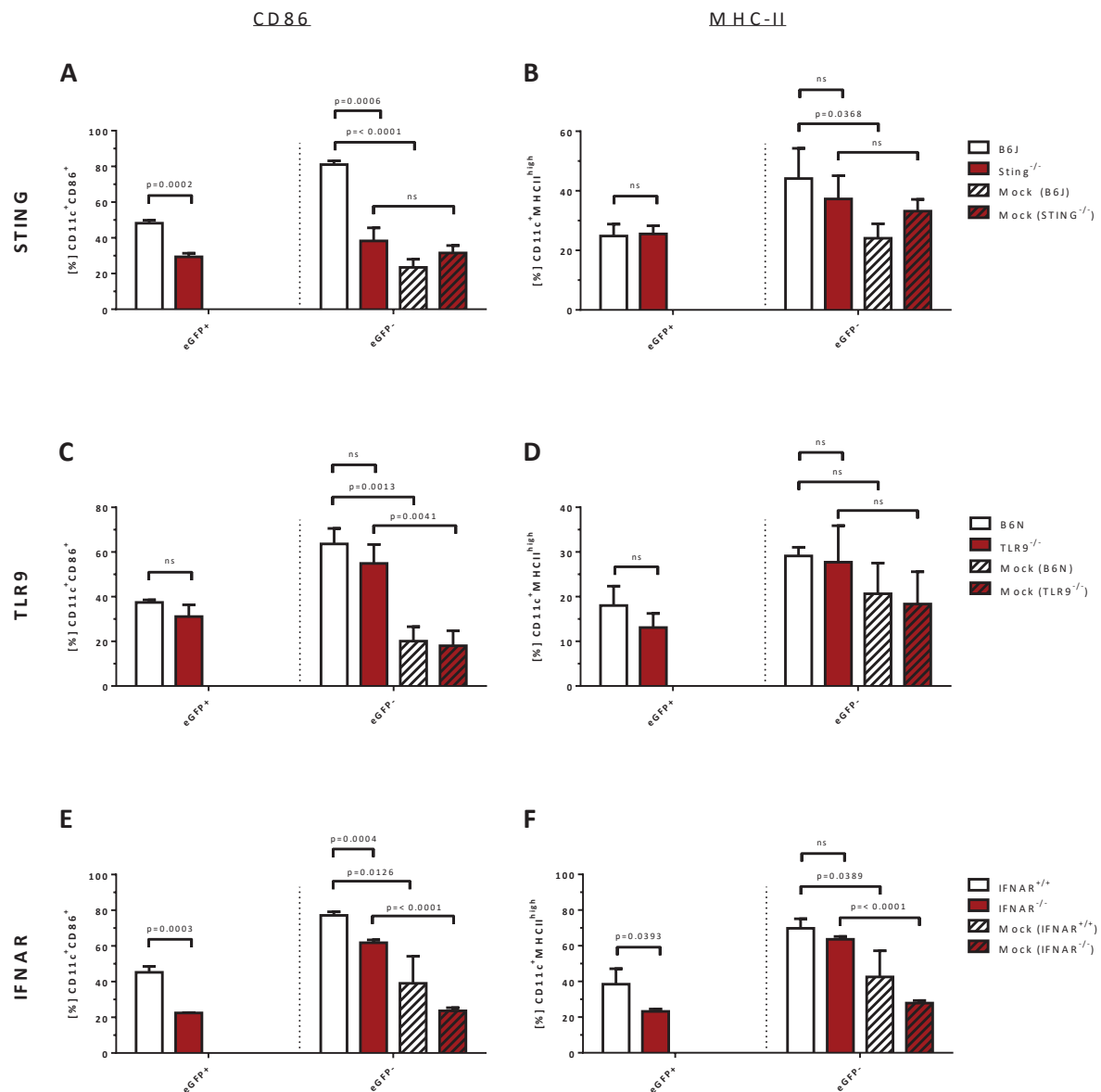


Abb. 15: STING beeinflusst die Reifung von *Bystander*-CD11c⁺-BMDCs

Zwei Mal 10^6 STING-, TLR9- oder IFNAR1-Wildtyp bzw. -*Knockout* BMDCs wurden mit MVA-NP-eGFP wahlweise mit einer MOI von 0,5 – 2 infiziert. Eine 12-stündige Inkubation sowie eine abschließende Analyse der Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie schloss sich an. Untersucht wurde hierbei die Reifung der BMDC durch Zunahme der Kostimulations- (CD86) und/oder der Präsentationsfähigkeit (MHC-II) der BMDCs.

Als Kontrolle dienten nicht infizierte BMDCs (Mock)
n=3; Durchschnitt + SD.

Der Kostimulator CD86, der zur Aktivierung von T-Zellen notwendig ist, ist bei STING-defizienten Genotypen signifikant reduziert (Abb. 15A). Dies gilt im hohen Maße für die *Bystander*-BMDCs (Vgl.: -eGFP: *Bystander*-STING^{-/-} vs. STING^{-/-} Mock, p=0.006) aber auch für die direkt-infizierten Zellen (Vgl.: +eGFP: STING^{-/-} vs. B6J, p=0.002). Die *Bystander*-BMDCs sind hierbei auf dem gleichen Reifungsniveau wie Mock-BMDCs. Im Falle der Oberflächenexpression von MHC-II (Abb. 15B) hat STING nur Einfluss auf *Bystander*-BMDCs (Vgl.: -eGFP: *Bystander*-STING^{-/-} vs. STING^{-/-} Mock, p=0.0368). Der Immunrezeptor TLR9 hingegen beeinflusst die BMDC-Reifung weder bei direkt-infizierten- (+eGFP) noch bei *Bystander*-Zellen (-eGFP) (Abb. 15C + 15D). Ausgehend von den Daten in Abbildung 15E + 15F kann vermutet werden, dass die Funktion des IFNAR1-Rezeptors mit der CD86 (p=0.0003) und der MHC-II Expression (p=0.0393) in direkt-infizierten Zellen (+eGFP) sowie exklusiv mit der MHC-II Expression in *Bystander*-Zellen (Abb. 15E, Vgl.: -eGFP: *Bystander*-IFNAR1^{-/-} vs. *Bystander*-IFNAR1^{+/+}, p=0.0004) verknüpft ist.

Bei allen getesteten Genotypen war die CD11c-Frequenz, die Antigenpräsentation (MHC-I/SIIN-Komplex) sowie die Infektionsrate gleich verteilt und ohne Defizite (Anhang Abb. 9). Die dargestellten Ergebnisse lassen die Konklusion zu, dass STING die für eine funktionell uneingeschränkte Kreuzpräsentation wichtige Reifung der *Bystander*-BMDCs im signifikant hohen Maß beeinflusst. Überdies steuern STING sowie IFNAR1 die CD86- und MHC-II-Oberflächenexpression von direkt infizierten (eGFP_{pos}) BMDCs, während TLR9 keinen Effekt auf die Reifung der BMDCs hat.

5.1.9 Die Endozytoseaktivität sowie die Endosomenfunktionalität von BMDCs ist nicht STING-, TLR9- und IFNAR1-abhängig

Die Phänotypenanalyse der verschiedenen Immundefizienten BMDCs zeigte einen besonderen Einfluss von STING auf die *Bystander*-BMDC-Reifung sowie den Einfluss von STING und IFNAR1 auf die Reifung der direkt-infizierten BMDCs (Abbildung 16). Um einen genaueren Einblick zu erlangen, in welchem Maß STING, TLR9 und IFNAR1 die funktionellen Eigenschaften der BMDCs beeinflussen, wurde die Endozytoseaktivität sowie die endosomale Funktionalität überprüft. Hierzu wurden BMDCs aus STING-, TLR9- und IFNAR1-defizienten Mäusen isoliert und mit Hilfe eines Fluoreszenz-markierten Ovalbumins (OVA-AF488) auf die Aktivität der Endozytose überprüft. Ferner wurde ein

Farbstoff-Ovalbumin-Konjugat (DQ-OVA) verwendet, das während einer endosomalen Digestion (pH-*shift* ins saure Milieu) fluoresziert, um so die Funktionalität der Endosomen zu überprüfen.

Zur Kontrolle wurden die isolierten BMDCs während der Inkubation mit dem spezifischen OVA-Konjugat bei 4 °C gelagert. Bei 4 °C bindet das Ovalbumin nur an die Zelloberfläche und eine Aufnahme in die Zelle verhindert. Die Analyse der BMDCs wurde mit Hilfe einer Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt und zeigen keine signifikanten Differenzen zwischen den Wildtyp- und *Knockout*-Gruppen. Sowohl die Endozytose als auch die endosomale Digestion von Antigenen sind durch die Absenz der hier analysierten Immunfaktoren nicht beeinträchtigt. Somit kann postuliert werden, dass *in vitro* die Immunfaktoren STING, TLR9 und IFNAR1 keinen Einfluss auf die Kreuzpräsentation über die Endozytose/Endosomen-Aktivität besitzen.

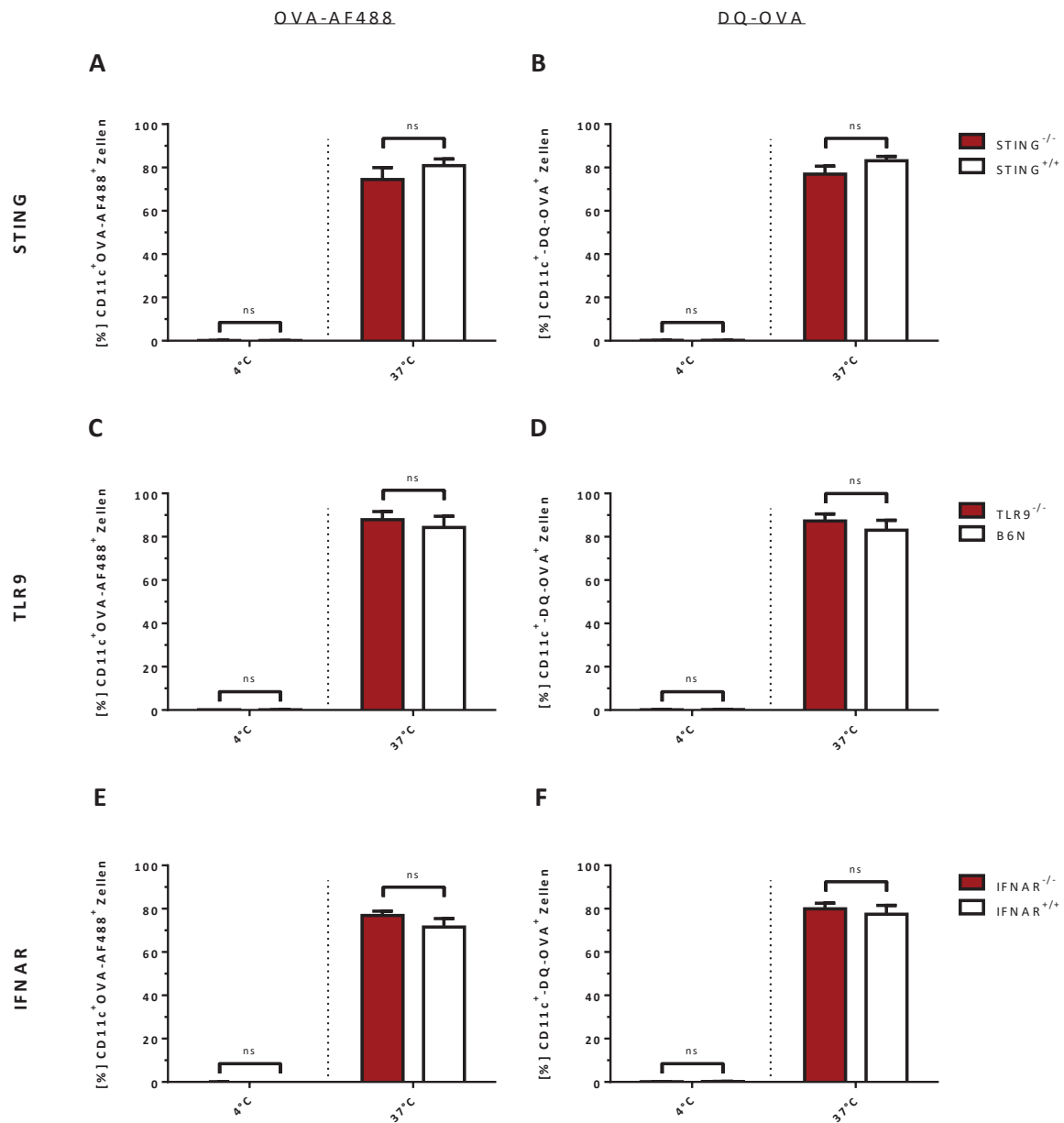


Abb. 16: STING-, TLR9 und IFNAR1-defiziente BMDCs haben keinen Nachteil bei der Endozytose sowie der endosomalen Degradation von markiertem Ovalbumin.

Vier mal 10^6 STING-, TLR9- oder IFNAR1-Wildtyp bzw. -*Knockout* BMDCs wurden mit OVA-AF488 (10 ng/mL) bzw. DQ-OVA (10 ng/mL) für zwei Stunden bei 37 °C sowie 4 °C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. n=3; Durchschnitt + SD; ns = nicht signifikant.

5.1.10 IFN γ hemmt im gleichem Maße die Vacciniavirus-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort wie araC

Interferon- γ spielt eine entscheidende Rolle bei dem angeborenen und adaptiven Immunsystem. Die große Bedeutung von IFN γ für das Immunsystem hängt zum Teil an der Fähigkeit, die virale Replikation direkt zu hemmen sowie von den immunstimulatorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften. Beispielsweise ist IFN γ für die Aktivierung von Makrophagen sowie die Induktion der Expression von MHC-II-Komplexen überaus kritisch. Wie die Arbeitsgruppe um Prof. Trilling gezeigt hat, blockiert IFN γ vorzugsweise die späte Gentranskription sowie die Replikation der Vacciniavirus-DNA. Die frühe Genexpression sowie frühe Schritte in der Vacciniavirus-Reifung sind hingegen nur marginal beeinflusst [Trilling *et al.* 2009]. Aufgrund dieser Analogie der Wirkungsweise von IFN γ zu araC, wurde im folgenden Kreuzpräsentations-Experiment araC mit IFN γ substituiert. Dies erlaubte ein stark immunbiologisch relevantes Zytokin im Kontext der Kreuzpräsentation zu untersuchen.

Hierfür wurden Cloudman-Zellen 24 Stunden mit IFN γ (5ng/mL) vorinkubiert und anschließend mit MVA-früh-OVA sowie MVA-spät-OVA für weitere 12 Stunden infiziert. Die infizierten Cloudman-Zellen wurden mit Wildtyp-BMDCs koinkubiert und abschließend mit Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zusammengeführt (Abbildung 17A). Überdies wurden die infizierten Cloudman-Zellen geerntet und mit Hilfe einer Western Blot Analyse die virale Genexpression bestimmt (Abbildung 17B). Der Aufbau ähnelt dem im Abschnitt 5.1.1 beschriebenen Versuch und soll den Vergleich zu araC im Kontext der Kreuzpräsentation zulassen.

Um den Einfluss von IFN γ auf die virale Genexpression genauer zu untersuchen, wurden zusätzlich Cloudman-Zellen mit IFN γ für 24 Stunden vorinkubiert und mit rekombinanten WR-eGFP-A5 sowie WR-dsRed infiziert. Da sowohl das Fusionsprotein eGFP-A5 als auch dsRed spät während des viralen Replikationszyklus exprimiert wird, konnte die Expressionsrate der späten Antigene mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert und visualisiert werden (Abbildung 17C). Als Kontrollversuch wurden Cloudman-Zellen unter gleichen Bedingungen mit araC (40 μ g/mL) inkubiert (Abbildung 17D).

Ähnlich zu den Ergebnissen aus Abschnitt 5.1.1, beeinflusst IFN γ im höchsten Maße die Aktivierung der Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ Immunität während der Kreuzpräsentation (Vgl.: Abb. 17A; -IFN γ vs. +IFN γ), obwohl die Verfügbarkeit der Antigene nicht

eingeschränkt ist (Abbildung 17B und C). Dies wurde ebenfalls für die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion beobachtet (Anhang Abb. 10). Ferner zeigte der Kontrollversuch mit araC, wie erwartet, eine vollständige Einschränkung der Expression der späten Antigene dsRed und eGFP-A5 (Vgl.: Abb. 17D; -araC vs. +araC).

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass $\text{IFN}\gamma$ den gleichen Effekt wie araC aufzeigt, jedoch der dahinterliegende Mechanismus vermutlich von araC differiert, da $\text{IFN}\gamma$ nicht direkt auf DNA-Ebene interagiert.

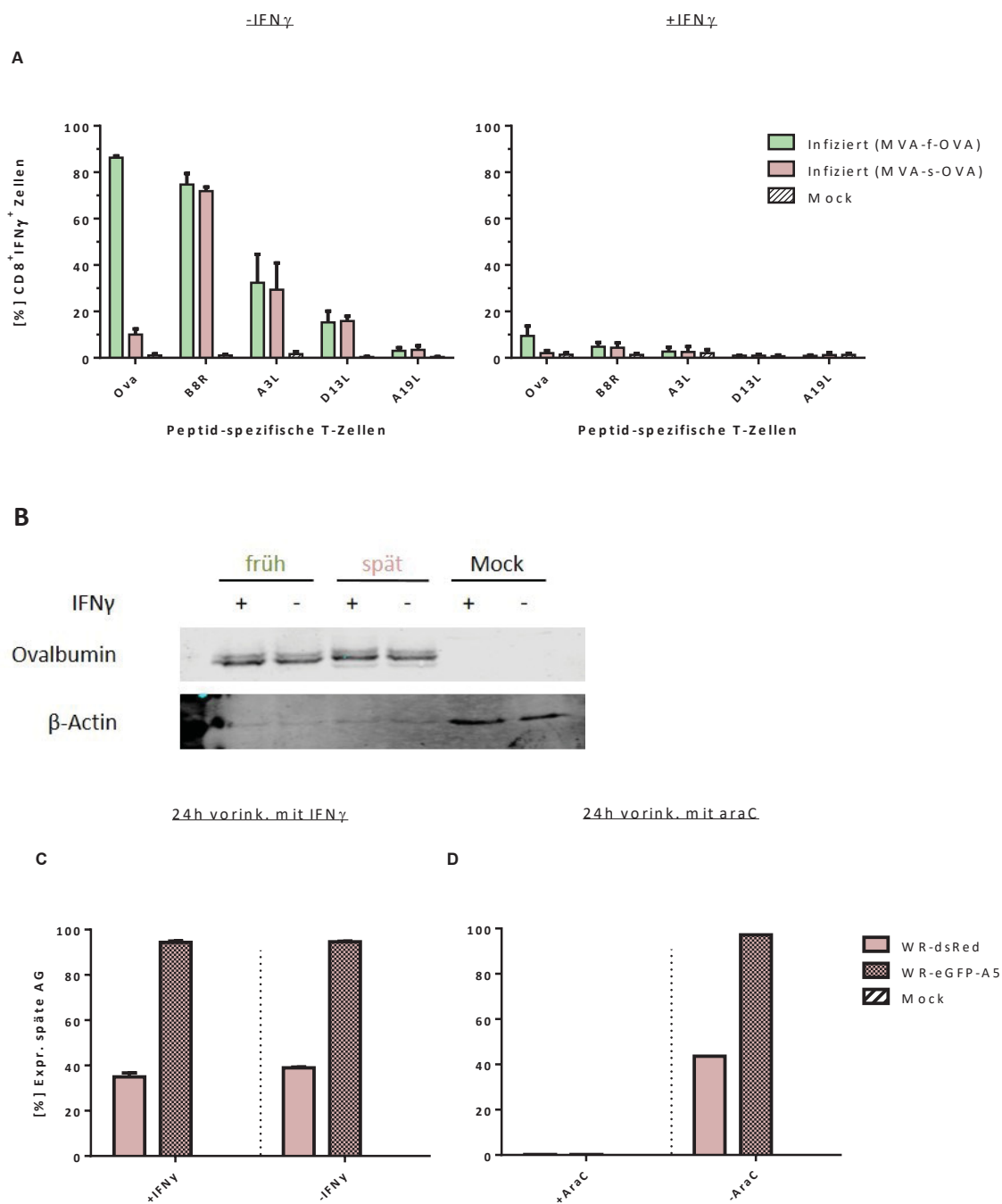


Abb. 17: IFN γ inhibiert die Kreuzpräsentation trotz der Verfügbarkeit viraler Antigene

- (A) Zwei mal 10^6 Cloudman-Zellen wurden vor der Infektion mit 5ng/mL IFN γ inkubiert und anschließend mit MVA-f-OVA oder MVA-s-OVA mit einer MOI von 1 für 12 Stunden infiziert. Die infizierten Cloudman-Zellen wurden mit 2×10^6 Wildtyp (B6N) BMDCs zusammengeführt und für weitere 12 Stunden koinkubiert. Abschließend wurden die T-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte sowie nicht mit IFN γ behandelte Cloudman-Zellen. n=3; Durchschnitt + SD.
- (B) Aus (A) infizierte- bzw. nicht-infizierte (Mock) Cloudman-Zellen wurden geerntet und lysiert. Von den erzeugten Lysaten wurden 25 μ g Gesamtprotein pro Geltasche geladen. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Proteine über Kaninchen-Ovalbumin- sowie Murin- β -Actin-Antikörper detektiert und mittels IRDye-Detektion visualisiert. Dargestellt ist eine repräsentative Antigenexpression aus drei unabhängigen Experimenten.
- (C) Zwei Mal 10^6 Cloudman-Zellen wurden vor der Infektion mit 5ng/mL IFN γ bzw. mit 40 μ g/mL araC inkubiert und anschließend mit WR-dsRed und WR-eGFP-A5 (MOI = 1) für 12 Stunden infiziert. Die Expression der Antigene wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie detektiert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte (Mock) sowie nicht mit IFN γ oder araC behandelte Cloudman-Zellen.
 +-IFN γ : n=3; Durchschnitt + SD
 +-araC: Dargestellt ist ein repräsentativer Kontrollversuch

5.2 *In vivo*

Die in Abschnitt 5.1 aufgezeigten Daten ermöglichten einen Einblick in die Relevanz bestimmter angeborener Immunfaktoren während einer Pockenvirusinfektion *in vitro*. Um diese Relevanz auch *in vivo* zu erörtern, wurde der systemische Einfluss einer Pockenvirusinfektion auf STING- und TLR9-defiziente Mausmodelle untersucht.

Hierfür wurden die Mäuse mit einem rekombinanten MVA intraperitoneal immunisiert und auf die funktionellen und phänotypischen Eigenschaften einer Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺-Immunantwort untersucht. Die funktionelle Analyse erfolgte sowohl während der Akutphase (Tag 7) als auch in der Gedächtnisphase (Tag 35). Die phänotypische Analyse in Bezug auf die Präsenz von Subtypen der Gedächtniszellpopulation wurde ebenfalls während der Akutphase untersucht. Eingesetzt wurden hierbei B8R- und OVA-spezifische Tetramere. Als Positivkontrolle zur Aktivierbarkeit der T-Zellen dienten CD3 ϵ Antikörper. Die T-Zellpopulation wird dabei nicht-antigenspezifisch aktiviert. Das nicht im Virus vorkommende Antigen β -Galaktosidase fungierte als Negativkontrolle.

5.2.1 Das Fehlen von STING resultiert in einem signifikanten Verlust der immundominanten B8R-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort

Im nachfolgenden wurden STING-*Knockout* und STING-Wildtyp Mäuse mit 10⁷ IU Ovalbumin-exprimierendem MVA intraperitoneal immunisiert. Am Tag 7 sowie am Tag 35 erfolgte die Ernte der Milz. Die Splenozyten wurden, wie unter Punkt 4.2.4 beschrieben, aufbereitet und nach Färbung mit markierten Antikörpern mittels der Durchflusszytometrie analysiert. Die CD8⁺ T-Zellen wurden hinsichtlich der IFN γ , TNF α , MIP1 α sowie CD107 α Expression untersucht (Abbildung 18). Darüber hinaus wurden die isolierten Splenozyten mit Hilfe Vacciniavirus-spezifischer Multimere auf die Gedächtniszellsubpopulationen analysiert (Abbildung 18B). Die Verwendung von Multimeren ermöglichte die spezifische Distinktion der CD8⁺ T-Zellen ohne deren Reaktivierung.

Interessanterweise war bei dem STING-defizienten Genotyp die spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort gegen das immundominante Antigen B8R signifikant reduziert. Die TNF α -Produktion bildete hierbei eine Ausnahme ohne signifikante Unterschiede, aber mit einer klaren Tendenz zur eingeschränkten Expression.

Die eingeschränkte Funktionalität bei STING-*Knockout* Mäusen wurde ebenfalls während der Gedächtnisphase am Tag 35 nach der Infektion beobachtet (Abbildung 18B).

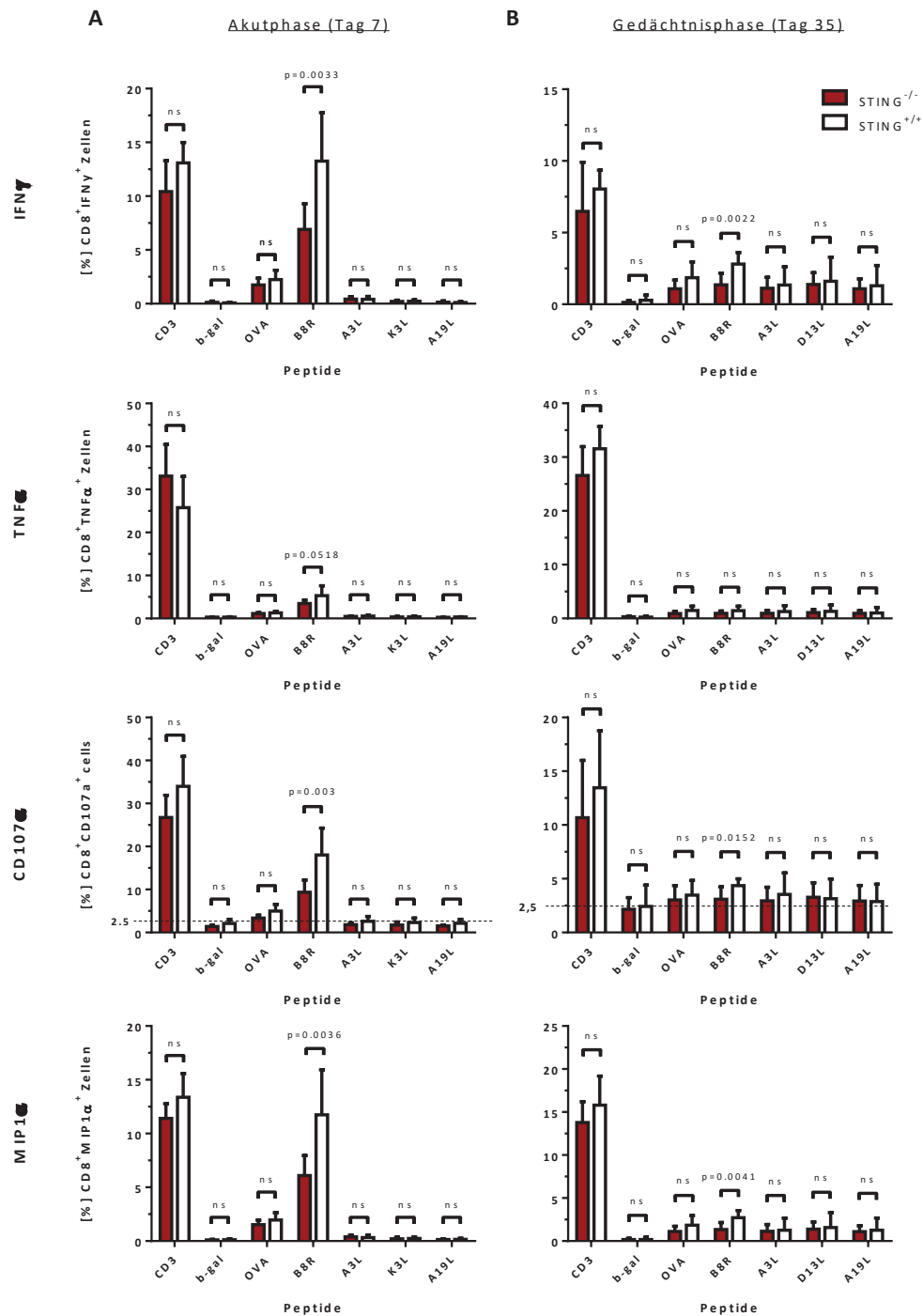


Abb. 18: STING hat einen starken Einfluss auf die Ausprägung einer MVA-spezifischen Immunantwort gegen das immundominante B8R-Antigen

STING^{-/-} und STING^{+/+} Mäuse wurden mit MVA-P7.5-OVA (10⁷ IU) intraperitoneal immunisiert. Die Milzernte und die folgende Splenozyten Aufbereitung erfolgte während der Akutphase (Tag 7; (A)) sowie der Gedächtnisphase (Tag 35; (B)). Analysiert wurde die Expression von MIP1 α , CD107 α , TNF α und IFN γ nach intrazellulärer Färbung mit spezifischen Antikörpern mittels Durchflusszytometrie nach Stimulation der Splenozyten mit den jeweiligen antigenen Peptid epitopen von OVA, B8R, A3L, D13L und A19L für vier Stunden.

Positivkontrolle: Anti-CD3 ϵ ; Negativkontrolle: β -Galaktosidase

n=9 gepoolt aus drei unabhängigen Experimenten; Durchschnitt + SD; ns = nicht signifikant.

Neben der funktionellen Analyse wurden zudem die Subtypen der Gedächtniszellpopulation während der Akutphase analysiert. Die Distinktion zwischen den Zentralen- und Effektor-Gedächtniszellen sowie den Effektor-T-Zellen konnte mit Hilfe der Aktivierungs- und Reifungs-Markern CD62L (L-Selektin) und CD127 (α -Untereinheit des Interleukin-7 Rezeptors) erreicht werden.

Die Einteilung der Subtypen erfolgte dabei wie folgt (Abbildung 19A):

Zentrale CD8 ⁺ Gedächtniszellen:	CD62L ^{hi} CD127 ^{hi}
Effektor CD8 ⁺ Gedächtniszellen:	CD62L ^{lo} CD127 ^{hi}
Effektor CD8 ⁺ T-Zellen:	CD62L ^{lo} CD127 ^{lo}

Wie in Abbildung 19B aufgezeigt, ist in STING-*Knockout* Mäusen – gegenüber dem STING-Wildtyp-Genotypen – die Frequenz von B8R-spezifischen CD8⁺ T-Zellen hoch signifikant reduziert (Tet; $p = <0.0001$). Ferner ist der prozentuale Anteil der B8R-spezifischen Effektor CD8⁺ T-Zellen signifikant reduziert (E; $p = 0.0197$). Der prozentuale Anteil der Effektor- sowie der Zentralen-Gedächtniszellen ist hingegen nicht eingeschränkt.

Die Frequenzen der T-Zellen gegen das rekombinante Antigen Ovalbumin sind in allen Fällen vergleichbar.

Der Einfluss von STING auf die Reifung bzw. Differenzierung wird bei Bestimmung der absoluten Anzahl der Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen Zellen noch deutlicher erkennbar.

Der STING^{-/-} Genotyp zeigte nun eine um zirka 50% hochsignifikant reduzierte absolute Anzahl der B8R-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Tet; $p = <0.0001$), v.a. der Effektor CD8⁺ T-Zellen (E; $p = <0.0001$) und der Effektor-Gedächtniszellen (EG; $p = 0.0002$), gegenüber dem Wildtyp. Die Anzahl der zentralen B8R-spezifischen Gedächtniszellen sowie aller CD8⁺ T-Zell-Subtypen gegen Ovalbumin waren vergleichbar mit denen im Wildtyp.

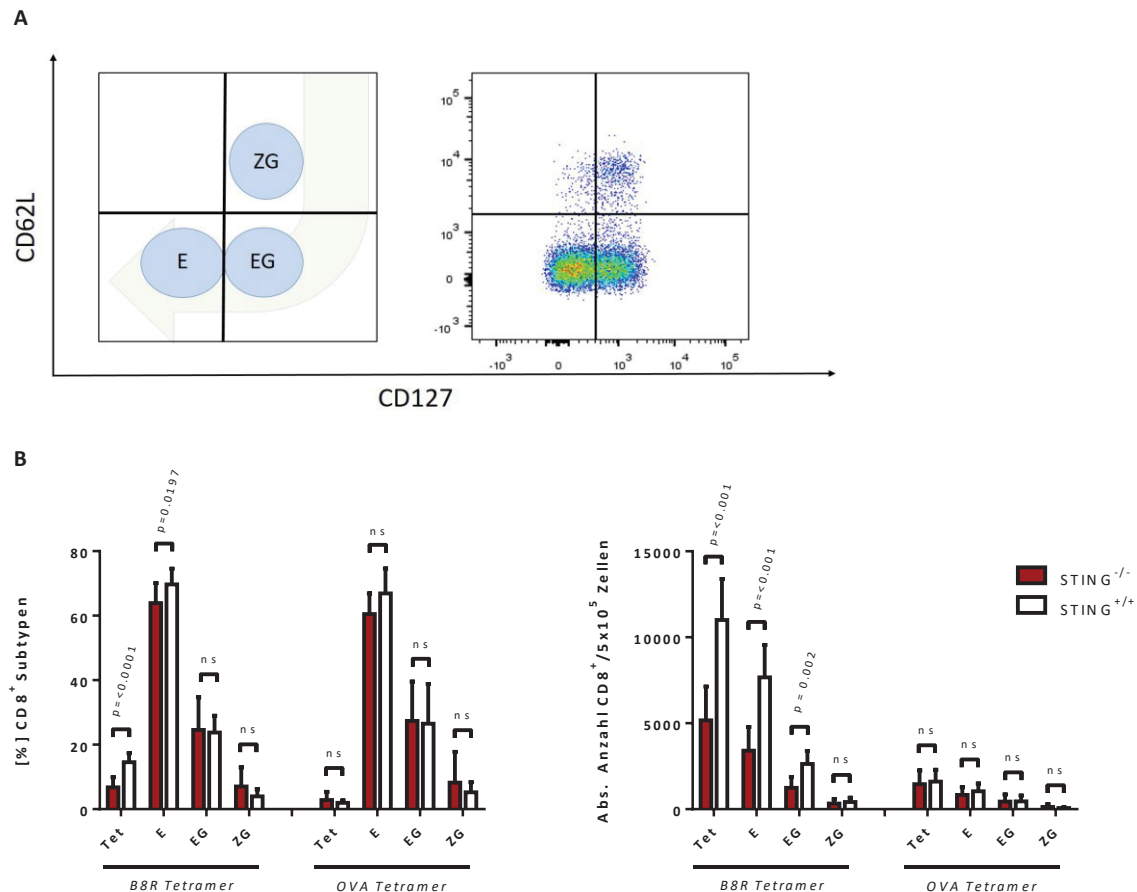


Abb. 19: Die Reifung und Ausdifferenzierung Vacciniavirus-spezifischer immundominanter CD8⁺ T-Zellen ist STING-abhängig

Der experimentelle Aufbau ist dem in Abb. 18 identisch. Die phänotypische Analyse erfolgte jedoch ausschließlich während der Akutphase (Tag 7).

(A) Darstellung der Gatingstrategie und Einteilung in die einzelnen Subtypen.

(B) Analyse der relativen sowie absoluten B8R- und OVA-spezifischen Gesamt-CD8⁺-T-Zellantwort (Tet) sowie der jeweiligen Subtypen (Effektor-T-Zellanzahl (E), Effektor-Gedächtnis-T-Zellanzahl (EG) und zentralen Gedächtnis-T-Zellanzahl (ZG))

B8R-Tetramer: n=13; OVA-Tetramer: n=11; Durchschnitt + SD.

5.2.2 TLR9 beeinflusst im hohen Maße die Entwicklung einer immundominanten B8R-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort

Da TLR9 ein wichtiges Glied in der antiviralen Immunantwort bildet, wurde neben dem Einfluss von STING im gleichen Kontext auch der systemische Einfluss eines TLR9-Defizits während einer MVA-Infektion analysiert. TLR9-defiziente sowie TLR9-Wildtyp Mäuse wurden ebenfalls mit MVA-P7.5-OVA (10⁷ IU) infiziert und, wie in 5.2.1 beschrieben, untersucht. Die funktionelle (Abb. 20A) sowie die phänotypische (Abb. 20B) Analyse erfolgte im Folgenden während der Akutphase (Tag 7).

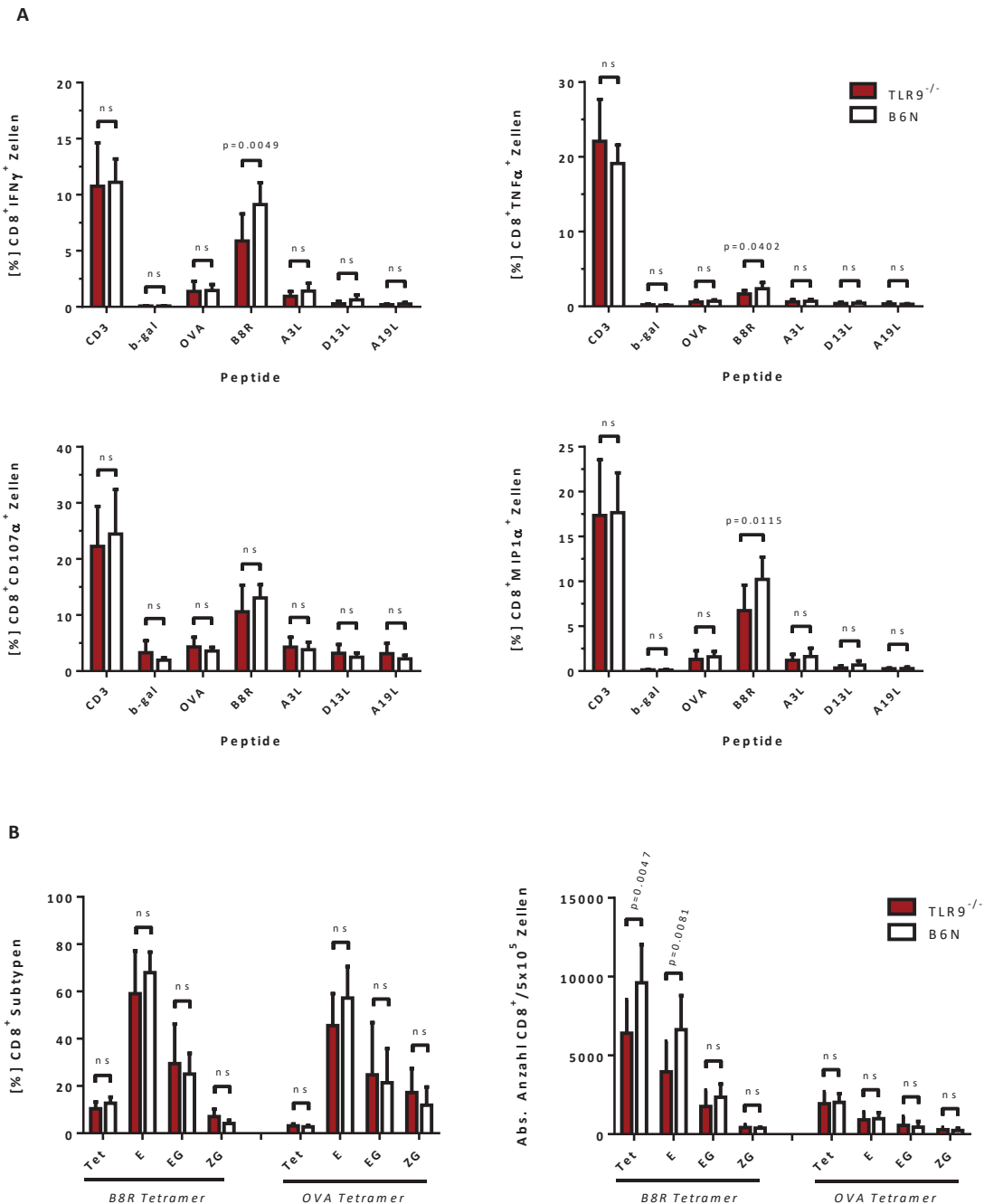


Abb. 20: Die Bildung einer Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ Immunantwort ist TLR9-abhängig
 TLR9^{-/-} und TLR9^{+/+} Mäuse wurden mit MVA-P7.5-OVA (10⁷ IU) intraperitoneal immunisiert. Die Milzernte und die folgende Splenozytenaufbereitung erfolgte während der Akutphase an Tag 7 nach Infektion.
 (A) Funktionelle Analyse der MVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Bestimmung der IFN γ -, TNF α -, CD107 α - und MIP1 α -Produktion *ex vivo* nach Restimulation mit den jeweiligen antigenen Peptiden (OVA, B8R, A3L, D13L und A19L).
 (B) Phänotypische Analyse der B8R- oder OVA-spezifischen CD8⁺ T Zell-Gedächtnissubtypen (Frequenz und absolute Anzahl) nach Multimerfärbung.
 Die Analyse der Zellen erfolgte mittels der Durchflusszytometrie.
 Positivkontrolle: Anti-CD3 ϵ
 Negativkontrolle: β -Galaktosidase
 TLR9: n=10, B6N: n=11; gepoolt aus drei unabhängigen Experimenten; SD; Signifikanz p < 0.05 ist angegeben; n.s. nicht signifikant.

Ähnlich wie bei STING zeigte das Fehlen von TLR9 einen negativen Einfluss auf die Ausbildung einer Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zell-Immunantwort. Die funktionellen Eigenschaften (Abb. 20A) waren wie beispielsweise bei der IFN γ -Produktion ($p=0.0049$) oder bei der Expression des Chemokins MIP1 α (0.0115) signifikant reduziert. Die TNF α -Produktion war weniger, aber signifikant eingeschränkt ($p=0.0402$). Ferner konnte auf die Ausbildung des Degranulationsmarkers CD107 α kein Einfluss nachgewiesen werden.

Überdies zeigte die phänotypische Analyse, dass TLR9 keinen Einfluss auf die Frequenz der B8R- sowie OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen hatte. Konträr dazu waren die absolute Gesamtanzahl der B8R-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Tet; $p=0.0047$) sowie die B8R-spezifische Effektor-T-Zellanzahl (E; $p=0.0081$) signifikant reduziert. Die Anzahl der OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen scheint hingegen TLR9-unabhängig.

6 Diskussion

Das Immunsystem schützt Organismen vor einer Infektion durch mehrschichtige Abwehrmechanismen mit zunehmender Spezifität. Wenn ein Pathogen die ersten Barrieren der Immunabwehr überwunden hat, liefert das angeborene Immunsystem eine sofortige unspezifische Antwort. Sobald dieser Abwehrmechanismus überwunden wird, interagiert das adaptive Immunsystem bei der weiteren Beseitigung des Pathogens. Dieses Zusammenspiel des angeborenen und des adaptiven Immunsystems ist entscheidend für den Aufbau einer wirksamen Immunität gegen Infektionen und Impfungen.

Eine virale Infektion triggert durch verschiedene Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) spezifische Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) im Wirt die schließlich die Expression antiviraler inflammatorischer Zytokine, wie Typ-I-Interferone, initiieren [Takeuchi *et al.* 2010]. Vacciniaviren interagieren mit diesen Kompartimenten, jedoch variiert die Aktivierung der Immunfaktoren durch das unterschiedliche immunmodulatorische Potential der verschiedenen Vacciniavirus-Stämme. Ferner ist der einzelne Beitrag der beteiligten Immunfaktoren bezüglich einer Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zell Antwort unzureichend definiert [Bowie *et al.* 2008; Frenz *et al.* 2010]. In der vorliegenden Arbeit sollte die Schnittstelle der angeborenen und adaptiven Immunität während einer Pockenvirusinfektion bzw. einer Vektor-basierten Immunisierung detailliert analysiert werden, welche eine effektive und dauerhafte Vacciniavirus-spezifische CD8⁺ T-Zell Immunität zulässt.

6.1 STING moduliert die IFN-I Produktion hat jedoch keinen Einfluss auf die Vacciniavirus-spezifische CD8⁺ T-Zell Aktivierung während der direkten- bzw. Kreuzpräsentation *in vitro*

Erste Ergebnisse haben dargelegt, dass die Kreuzpräsentation von frühen MVA Antigenen durch nicht infizierte dendritische Zellen strikt von einer intakten viralen DNA-Replikation in infizierten Zellen abhängt, welche als Antigenquelle dienen.

Wenn infizierte Zellen (die als *Feeder*-Zellen fungierten) nach der Behandlung mit Cytarabin (araC) mit dendritischen Zellen koinkubiert wurden, war die Kreuzpräsentation von frühen viralen Antigenen und die darauffolgende antigenspezifische-CD8⁺ T-Zellantwort vollständig inhibiert (Abbildung 7). Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass die Antigenverfügbarkeit der früh exprimierten Antigene durch araC Behandlung nicht

reduziert wird (Anhang Abbildung 2) [Tao 2013; *unpublished*]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein noch nicht charakterisierter angeborener Faktor aus infizierten Zellen benötigt wird, um benachbarte nicht-infizierte antigenpräsentierende Zellen für eine effektive Kreuzpräsentation zu aktivieren.

Der angeborene Immunfaktor *stimulator of inteferon genes* (STING) spielte eine kritische Rolle bei der Erkennung viraler DNA im Zytosol und ist somit ein essenzieller Teil in dieser Maschinerie.

Wie in Abbildung 8 aufgezeigt, stellte ein STING-Defizit in kreuzpräsentierenden BMDCs keinen Nachteil dar und zeigte eine Vacciniavirus-spezifische CD8⁺ T-Zell Aktivierung auf Wildtyp-Niveau. Wie beschrieben, findet die gesamte Genomreplikation des Vacciniavirus in sog. *viral factories* statt (Abbildung 2) [Tolonen *et al.* 2001; Katsafanas *et al.* 2007; Lin *et al.* 2010]. Dies erklärt auch, dass späte virale Antigene, wie z.B. A19L, A3L (früh und spät) oder das spät-exprimierte Ovalbumin eine verminderte CD8⁺ T-Zellantwort induzieren. Diese Antigene werden in den *viral factories* zurückgehalten und stehen der Erkennung bzw. für die Kreuzpräsentation durch das Immunsystem erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung [Tao 2013 *unpublished*].

Überdies konnte gezeigt werden, dass eine Kreuzpräsentation mit STING-Defizienten HEK-Zellen als *Feeder*-Zellen bei Verwendung von murinen WT-BMDCs als APCs durchaus zu einer signifikant verminderten Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zell Antwort führt (Abbildung 13; HEK-cG⁺ST⁻)

Ein weiteres Interessantes Detail bezieht sich auf den von Bridgeman *et al.* [2015] und Gentili *et al.* [2015] beschriebenen Effekt des cGAMPs-Transfers durch Virionen. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde MVA verwendet, dass in CEF-Zellen aus dem Haushuhn (*Gallus gallus*) generiert worden ist und eine starke Homologie zu murinem cGAMP aufzeigt [Wu *et al.* 2014]. Basierend auf den Ergebnissen von Bridgeman und Gentili kann cGAMP in das Viruspartikel inkorporiert werden. Dies kann als Schutzmechanismus der Zelle gewertet werden, um so den STING-Signalweg auch in nicht-infizierten Zellen initiieren zu können. Daran anknüpfend konnte gezeigt werden, dass eine MVA-Infektion von cGAS-STING⁺-HEK Zellen (als *Feeder*-Zellen) zu der Wiederherstellung einer potenten Kreuzpräsentation und daraus resultierenden CD8⁺ T-Zell Immunität führt (Vgl.: Abb. 13; HEK-cG⁻ST⁺ vs. HEK-cG⁺ST⁻).

Dieses Ergebnis verdeutlicht zum einen die Relevanz des *Upstream*-STING-Signalweges und unterstützt gleichzeitig die These der cGAMP-Virus-Inkorporation.

Überdies ist anzumerken, dass die Verwendung eines Zellgemisches aus HEK-cG⁺ST⁻- und HEK-cG⁻ST⁺-Zellen als *Feeder*-Zellen ebenfalls zu einer Wiederherstellung einer potenten Kreuzpräsentation führt (Abbildung 13; HEK_{Konn}-cG⁺/ST⁺). Dieses Ergebnis unterstützt zum einen die Postulierung des Zell-Zell cGAMP-Tansfers [Ablasser *et al.* 2013] sowie die cGAMP-Virus-Inkorporation [Bridgeman *et al.* 2015; Gentili *et al.* 2015].

Überraschenderweise zeigte die Kreuzpräsentation mit Wildtyp-HEK-Zellen als *Feeder*-Zellen eine uneingeschränkte Vacciniavirus-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort (Abbildung 13; HEK-cG⁻ST⁻). Dies ist deshalb interessant, da die dabei verwendeten *Feeder*-Zellen eigentlich keinen intakten Faktor eines cGAS/STING-Signalweges tragen [Sun *et al.* 2013; Wu *et al.* 2013]. Dieser Effekt konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht erklärt werden und unterliegt weiterer Forschungsansätze.

Da STING unter anderem bei der Genexpression von Typ-I-Interferonen eine entscheidende Rolle einnimmt [McWhirter *et al.* 2009; Chen *et al.* 2011], wurde der IFN-I Gehalt in den Überständen aus der direkten Präsentation als auch aus der Kreuzpräsentation untersucht. Es wurden zum einen Cloudman-Zellen, die mit bzw. ohne araC behandelt wurden (Abbildung 9) und zum anderen STING^{-/-}-BMDCs (Abbildung 12) während der Kreuzpräsentation als *Feeder*-Zellen verwendet. Als antigenpräsentierende Zellen wurden STING-*Knockout* sowie STING-Wildtyp BDMCs verwendet. Die IFN-I Induktion ist während der direkten Präsentation (Abbildung 9B, 12B und 12E) als auch während der Kreuzpräsentation (Abbildung 9C -araC, 12C und 12F) strikt von STING-abhängig. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Dai *et al.* [2014]. Dort verwendete STING^{GT/GT} BMDCs zeigten eine vollständig aufgehobene IFN-I Produktion während einer MVA Infektion. Interessanterweise zeigte zudem die Behandlung mit araC einen strikten Einfluss auf die IFN-I Expression während der Kreuzpräsentation mit Wildtyp-BMDCs (Abb. 9C; +araC). Daraus lässt sich schließen, dass fehlendes IFN α nicht für die ausbleibende CD8⁺ T-Zell Antwort verantwortlich ist, da die Kreuzpräsentation mit STING-*Knockout* BMDCs als APCs zu keiner eingeschränkten CD8⁺ T-Zellaktivierung führte und auch unter diesen Bedingungen kein IFN α -Stimulus vorhanden war (Abbildung 8). Jedoch wurde in diesem Versuchsaufbau nur auf die IFN α -Subtypen IFN α 1, IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5 und IFN α 6 untersucht. Demnach könnte durchaus ein anderer IFN α -Subtyp für eine effektive

CD8⁺ T-Zellantwort während der Kreuzpräsentation verantwortlich sein. Ein möglicher Ansatz wäre es, wie beschrieben, Cloudman-Zellen, die als *Feeder*-Zellen fungieren, mit araC zu inkubieren, um die eingeschränkte Kreuzpräsentation zu erreichen. Während der anschließenden Koinkubation mit BMDCs, könnten verschiedene IFN-I-Subtypen hinzugeführt werden, um so eventuell eine Wiederherstellung der CD8⁺ T-Zell Immunität zu erreichen und einen putativen „*Rescue*“-IFN-I-Subtyp zu identifizieren.

Ein funktionierender IFN-I Stimulus ist essentiell für ein effektives *cross-priming in vitro* als auch *in vivo* [Lorenzi *et al.* 2011; Spadaro *et al.* 2012; Schiavoni *et al.* 2013].

Die Arbeitsgruppe um Feng Ma [2015] hat ferner dargestellt, dass IFNAR1^{-/-}-Makrophagen eine geringere Induktion von IFNα4- sowie IFNβ-Transkripten gegenüber Wildtyp-Makrophagen aufzeigten. Zusammenfassend ist für eine optimale Produktion von cGAMP-abhängigem IFN-I ein intakter IFNAR-*feedback-loop* obligatorisch [Ma *et al.* 2015].

Ein weiterer Interessanter Aspekt ist, dass die Inkubation der Cloudman-Zellen mit araC die gleiche ausbleibende IFN-I-Produktion aufweist wie die Verwendung von STING^{-/-}-BMDCs als *Feeder*-Zellen während der Kreuzpräsentation mit STING^{+/-}-BMDCs als APCs (Vgl.: STING^{+/-}; Abb. 9C +araC vs. 12C + 12F).

6.2 Lösliche Faktoren beeinflussen die späte jedoch nicht die frühe Vacciniavirus-spezifische CD8⁺ T-Zell Aktivierung

Lösliche Faktoren, wie Interleukine, Zytokine, Chemokine, aber auch Bestandteile des Komplementsystems und Antikörper, besitzen einen substanziellen Einfluss sowohl auf das angeborene als auch auf das adaptive Immunsystem. Sie modulieren im höchsten Maß das Potential der Immunantwort und interagieren mit Pathogenen [Balkwill 1988; Akira *et al.* 2006; Pettengill *et al.* 2014].

Um den Einfluss löslicher Faktoren während einer MVA-Infektion zu untersuchen, wurden araC-positive und araC-negative Überstände von *Feeder*-Zellen, wie in Abbildung 10 dargestellt, auf die Modulation der Kreuzpräsentationsfähigkeit sowie die daraus resultierende CD8⁺ T-Zell Antwort analysiert.

Es konnte kein Einfluss löslicher Faktoren, die durch eine funktionierende virale DNA-Replikation in *Feeder*-Zellen induziert werden, auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit der frühen Antigene beobachtet werden (Abbildung 11; + -; OVA, B8R, A3L).

Die Kreuzpräsentation der späten Antigene scheint jedoch durch lösliche Faktoren beeinflusst zu sein (Abbildung 11; + -; D13L, A19L). Demnach sekretieren die *Feeder*-Zellen bestimmte lösliche Faktoren ins Medium, die durch eine funktionierende virale DNA-Replikation induziert werden und somit die Kreuzpräsentation und die daraus resultierende CD8⁺ T-Zellantwort gegen späte virale Antigene verstärkt.

Die in diesem Versuchsaufbau als *Feeder*-Zellen verwendeten Cloudman S91 Zellen sind Melanomzellen und haben ihren Ursprung aus Melanozyten. Melanozyten produzieren bei Stress diverse lösliche Faktoren, wie z.B. IL-1 α / β , -6, -8, TNF α oder IFN β , und sind auch gegen solche responsiv [Herlyn *et al.* 1994]. Die Induktion der IFN α -Expression konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 9A). Eine Postulierung eines genauen löslichen Faktors der für den Effekt der eingeschränkten Kreuzpräsentation gestaltet sich schwierig und muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Dies könnte mittels eines *Knockouts* auf DNA oder eines *Knockdowns* auf RNA-Ebene kritischer löslicher Faktoren geschehen. Putative Kandidaten wären wegen ihrer pro-inflammatorischen und chemoattraktorischen Eigenschaften beispielsweise IL-1, IL6 und TNF α [Turner *et al.* 2014]. IFN β ist hierbei zu vernachlässigen, da in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt wurde, dass bei Verwendung von STING^{-/-} BMDCs als *Feeder*-Zellen mit STING^{-/-} sowie STING^{+/+} BMDCs als APCs die IFN β Produktion auf basalem Niveau liegt und die Kreuzpräsentation trotzdem nicht eingeschränkt ist (Abbildung 12F).

Ferner ist zu erwähnen, dass der Effekt von der kreuzpräsentierenden APC Seite ausgehen muss, da die Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erst nach einem Waschschrift hinzugefügt werden und somit nicht mit dem *Feeder*-Zellmedium in Kontakt kommen.

Eine weitere mögliche Erklärung für die reduzierte CD8⁺ T-Zellantwort ist, dass die Verfügbarkeit der späten Antigene für die Kreuzpräsentation so gering ist, dass keine starke CD8⁺ Immunität aufgebaut werden kann. Die Verfügbarkeit wäre demnach nur auf die in den infizierten Cloudman-Zellen vorhandenen Antigene beschränkt, da die Zellen gewaschen und mit Überstand aus araC-behandelten Cloudman-Zellen, in dem keine späten Antigene vorhanden sind, inkubiert werden. Bei der „Normalsituation“ (Abbildung 11; - -) sind die späten Antigene auch im Überstand – Zellen sterben ab und Antigene gelangen in den Überstand – vorhanden.

Demgegenüber steht, dass bei einer uneingeschränkten viralen DNA-Replikation und die damit verbundenen löslichen Faktoren im Überstand keine Wiederherstellung der Kreuzpräsentationsfähigkeit erzielen können, wenn die *Feeder*-Zellen vorher mit araC inkubiert wurden (Abbildung 11; - +)

6.3 TLR9-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit und die CD8⁺ T-Zellantwort *in vitro*

Um den Einfluss weiterer Immunfaktoren auf die Kreuzpräsentation und den möglichen Effekt der eingeschränkten CD8⁺ Immunität (Abbildung 7B) zu untersuchen, wurde neben STING auch die Auswirkung einer TLR9-Defizienz analysiert (Abbildung 14).

Während der Kreuzpräsentation mit TLR9-defizienten APCs wurden Cloudman-Zellen als *Feeder*-Zellen eingesetzt. Eine TLR9-Defizienz zeigte hierbei keinen Einfluss auf die Kreuzpräsentation sowie die Vacciniavirus-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort.

6.4 Die Reifung von *Bystander*-BMDCs *in vitro* ist STING-abhängig und TLR9- sowie IFNAR1-unabhängig und hat keinen Einfluss auf die Endozytose-aktivität sowie -funktionalität

Wie unter Abschnitt 3.3 beschrieben, initiiert die Wahrnehmung eines pathogenen Stimulus ein komplexes Entwicklungsprogramm, welches die Morphologie und die Funktion der Zelle tiefgreifend verändert. Es erhöht beispielsweise die Expression kostimulatorischer Moleküle einschließlich CD86 und verursacht die Sekretion einer Vielzahl von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen [Takeuchi *et al.* 2010].

Ferner spielen *Bystander*-DCs die Hauptrolle während der Kreuzpräsentation und sind essentiell für ein intaktes *cross-priming* einer CD8⁺ T-Zell Immunität während einer MVA-Infektion [Pascutti *et al.* 2011].

In der vorliegenden Arbeit wurden drei hochrelevante Abwehrmechanismen analysiert: (I) Die cGAS/STING- bzw. (II) TLR9-initiierte IFN-I-Induktion sowie (III) ein ausbleibender IFN-I-Stimulus durch eine IFNAR1-Defizienz.

Hierfür wurden jeweils aus STING-, TLR9- und IFNAR1-defizienten Mäusen BMDCs generiert und auf ihre phänotypischen Eigenschaften analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl ein fehlender STING- als auch TLR9- sowie IFNAR1-Stimulus keinen Einfluss auf die BMDC-Frequenz (CD11c⁺), Infektionsrate (eGFP_{pos}) sowie

die MHC-I-abhängige Antigenprozessierungs- und -präsentationsfähigkeit (MHC-I/SIIN-Komplex) besitzt (Anhang Abb. 9).

Interessanterweise zeigte ein STING-Defizit eine signifikant reduzierte CD86-Induktion während einer MVA-Infektion sowohl bei *Bystander*-BMDCs (Abbildung 15A; -eGFP) als auch bei direkt infizierten BMDCs (Abbildung 15A; eGFP_{pos}). Darüber hinaus ist auffallend, dass MVA-infizierte Wildtyp-BMDCs (B6J; eGFP_{pos}) geringere Mengen an CD86 und MHC-II exprimieren als nicht-infizierte WT-BMDCs (B6J; eGFP_{neg}). Infizierte STING-*Knockout* BMDCs zeigten sogar CD86-Level auf Mock-Niveau (Abb. 15A; Vgl.: eGFP_{neg} vs.-eGFP_{pos}). Zudem stellte sich bei den STING-*Knockout* *Bystander*-BMDCs eine eingeschränkte MHC-II-Induktion dar (Abbildung 15B; eGFP_{neg}). Die direkten MVA-infizierten BMDCs waren davon jedoch nicht beeinflusst (Abb. 15B; eGFP_{pos}). Diese eingeschränkte Maturation ist möglicherweise durch das fehlende IFN β -Signal zu erklären (Abb. 12F). IFN β nimmt die Schlüsselrolle während einer funktionellen Reifung von BMDCs ein und wird normalerweise in großen Mengen von DCs produziert [Eitz Ferrer *et al.* 2011; Pascutti *et al.* 2011]. Überdies ist zu erwähnen, dass obwohl die *Bystander*-BMDCs ein signifikantes Defizit während der Reifung erfahren, die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation *in vitro* nicht eingeschränkt ist (Abbildung 8).

Besonders anzumerken ist außerdem, dass ein INFAR-*Knockout* keinen Einfluss auf die Reifung der *Bystander*-BMDC aufzeigt (Abb. 15E und 15F). Das bedeutet, dass zwar im System etwas IFN-I vorhanden ist, aber der rezeptorvermittelte Signalweg nicht initiiert werden kann. Der Unterschied zum STING-*Knockout* ist, dass bei einer STING-Defizienz im ganzen System kein IFN-I vorhanden ist und somit kein Stimulus über diese Achse erfolgen kann. Demnach ist ein intaktes rezeptorvermitteltes IFN-I-*Signaling* nicht alleinig für die Stimulation einer BMDC-Reifung verantwortlich.

Die Arbeitsgruppe um Daniel Stetson konnte bereits 2006 darstellen, dass eine Transfektion von TLR9-defizienten DCs mit synthetischer dsDNA zu keiner eingeschränkten IFN-I-Induktion führt [Stetson *et al.* 2006]. Ferner wurde aufgezeigt, dass auch *in vivo* die INF α -Produktion TLR9-unabhängig ist [Waibler *et al.* 2007]. Unsere Arbeitsgruppe konnte diese Ergebnisse 2014 bestätigen [Dai *et al.* 2014]. Anzumerken ist hierbei, dass die Auswirkung eines TLR9-*Knockouts* während der Kreuzpräsentation bezüglich der INF-I-Produktion noch nicht aufgeklärt ist. Diese Beobachtungen unterstreichen jedoch zum einen, dass eine TLR9-Defizienz keinen Einfluss auf die BMDC-Reifung während einer MVA-

Infektion ausübt und zum anderen, dass ein intakter IFN-I-Stimulus zur uneingeschränkten BMDC-Reifung führt (Abbildung 15C und 15D).

Darüber hinaus wurde während der Arbeiten von Stetson [2006] aufgezeigt, dass ein IRF3-*Knockout* in MEF-Zellen, verglichen mit WT-MEF-Zellen, zu einer 99% geminderten IFN β -Induktion führt. Dai *et al.* [2014] konnten dies auch für die IFN α - und IFN β -Produktion während einer MVA-Infektion in BMDCs darstellen. IRF3 ist ein Schlüsselfaktor im STING-Signalweg und verdeutlicht erneut die enorme Relevanz eines intakten *downstream*-STING-Signals für eine uneingeschränkte IFN α/β -Produktion und die anknüpfende dadurch initiierte BMDC-Reifung. Ein möglicher Ansatz zur weiteren Evaluation der Relevanz von IFN β auf die Maturation von BMDCs könnte außerdem die Auswirkung einer MVA-Infektion bei IFN β -*Knockout* darstellen und bietet somit Spielraum für weitere Forschungen.

Eine funktionierende Endozytose sowie die anschließende Degradation des Antigens sind für eine effektive (Kreuz-)Präsentation essentiell. Obwohl sich das Fehlen von STING sowie IFNAR1 negativ auf eine BMDC-Reifung während einer MVA-Infektion auswirkt, schränkt es nicht die Endozytose sowie die Degradation von Antigenen ein (Abbildung 16A, B, E, F). Auch das Fehlen von TLR9 hatte keinen Einfluss auf diese Fähigkeit (Abb. 16C und 16D).

6.5 IFN γ inhibiert die Kreuzpräsentation von viralen Antigenen

Das Zytokin IFN γ nimmt eine Schlüsselrolle bei der Verteidigung gegen eine Infektion mit Orthopoxviren ein. In humanen Zellen bindet das VACV-produzierte B8R IFN γ und inhibiert somit die Bindung von IFN γ an seinen Rezeptor [Mossman *et al.* 1995].

Dieser Effekt ist jedoch speziesspezifisch und zeigt bei Mäusen keine Wirkung [Alcami *et al.* 1995]. Die Arbeitsgruppe um Mirko Trilling konnte 2009 darstellen, dass IFN γ die Genomreplikation und die Transkription der späten VACV-Gene inhibiert [Trilling *et al.* 2009]. Basierend auf diesem Effekt, der dem von araC gleicht, wurde in der vorliegenden Forschungsarbeit araC mit IFN γ substituiert und die Auswirkungen auf die Kreuzpräsentation und die folgende Vacciniavirus-spezifische CD8⁺ T-Zell Antwort analysiert.

Wie in Abbildung 17A gezeigt, beeinflusste IFN γ die Kreuzpräsentation sowie die anknüpfende CD8⁺ Immunität gegen Vacciniavirus-spezifische Antigene im gleichen Maße wie araC (Vgl.: Abb. 17A; +IFN γ vs. 7B; +araC). Besonders interessant und explizit anzumerken ist hierbei, dass entgegen der Literatur neben der frühen auch die

Verfügbarkeit der späten Antigene nicht eingeschränkt war (Abbildung 17B und 17C). Der direkte Vergleich von IFN γ und araC auf die späte Antigenexpression nach einer WR-Infektion zeigt deutlich den Einfluss von araC auf die Antigenexpression der späten Antigene (Vgl.: 17C; +IFN γ vs. 17D; +araC). Ferner ist anzuführen, dass die eingeschränkte Kreuzpräsentationsfähigkeit nicht dem Mechanismus der arretierten viralen DNA-Replikation unterliegt, da IFN γ im Gegensatz zu araC nicht direkt mit der viralen DNA interagiert. Zudem sind intrinsische IFN γ -abhängige virale Verteidigungsmechanismen (z.B. Viperin, ADAR, PK-R, RNAi, MxGTPasen, ISG15) weitgehend auszuschließen, da die virale Transkription intakt war (Abb. 17B und 17C). Sie sollten jedoch weiter untersucht werden. Nicht auszuschließen ist ein IFN γ -induzierter Faktor, der erst nach der viralen DNA-Replikation (z. B. während des *Virusassemblies*) interveniert. Dies kann mit Hilfe von mRNA-/Protein-Analysen auf bestimmte IFN γ -induzierte Faktoren erfolgen (Hochregulierung der Translation/Transkription von bestimmten intrinsischen Verteidigungsfaktoren?). Darüber hinaus unterstreicht die aufgehobene Kreuzpräsentation erneut die Idee, dass der verantwortliche Mechanismus von der *Feeder*-Zellseite ausgeht. Die Studie von Trilling et al. hat zudem aufgezeigt, dass IRF1 essentiell für eine IFN γ -abhängige Inhibition der VACV Replikation ist. Daran anknüpfend ist STING ein wichtiger Mediator zur Aktivierung von IRF1 [Man et al. 2015; Sui et al. 2017] und zeigt somit einen putativen Schnittpunkt zwischen der IFN γ - und araC-inhibierten Expression der späten Antigene. Dieser IRF1-Schnittpunkt sollte demnach ein Bestandteil weiterer Untersuchungen im Kontext der eingeschränkten späten Antigenverfügbarkeit sein.

6.6 Ein intaktes IFN-Signaling induziert über die STING- bzw. TLR9-Achse ist essentiell um *in vivo* eine potente CD8⁺ Immunität zu induzieren

Die Induktion einer potenten virus-spezifischen CD8⁺ T-Zell Antwort *in vivo* ist ein grundlegendes Ziel von therapeutischen Vakzinierungsstrategien. Um diesem Ziel näher zu kommen, ist es von entscheidender Bedeutung, die Mechanismen und Faktoren, welche die Qualität und Quantität einer intakten und potenten CD8⁺ T-Zell Immunität formen, zu verstehen. Hierfür wurde der Einfluss einer MVA-Infektion bei STING- sowie TLR9-defizienten Mäusen auf die funktionellen und phänotypischen Eigenschaften der T-Zellantwort während einer Akut- sowie Gedächtnis-Phase analysiert.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl in der Akutphase als auch in der

Gedächtnisphase ein intakter STING- sowie TLR9-Signalweg für den Aufbau einer funktionellen Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ Immunität von entscheidender Bedeutung ist (Abb. 18 und 19B). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der phänotypischen Analyse bezüglich der BMDC-Reifung (Abbildung 15A – 15D). Während der Akutphase führte das Fehlen von STING zu einer insgesamt reduzierten CD8⁺ Immunität gegenüber einem TLR9-*Knockout*. Da die Kreuzpräsentation beim sog. *cross-priming* eine entscheidende Rolle bei der Generierung von spezifischen CD8⁺ T-Zellen einnimmt [Gasteiger *et al.* 2007], ist eine intakte und effektive *Bystander*-BMDC-Maturation in diesem Kontext essentiell. Anknüpfend daran konnten die Arbeitsgruppen um Eickhoff und Hor aufzeigen, dass die initiale Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowohl durch direkt infizierte als auch durch nicht infizierte *Bystander*-DCs stattfinden kann. Kritisch waren dabei XCR1⁺(CD8⁺)-DCs, die für die späte initiale Aktivierung von naiven CD8⁺ T-Zellen verantwortlich sind. Die Wechselwirkungen zwischen diesen dendritischen Zellen und den CD8⁺ T-Zellen finden im Paracortex der Lymphknoten statt und werden von vorher *geprimten* CD4⁺ T-Zellen unterstützt. Ferner konnten keine von pDCs ausgehenden unterstützenden Mechanismen nachgewiesen werden [Eickhoff *et al.* 2015; Hor *et al.* 2015]. Die Studie von Brewitz *et al.* konnte jedoch zeigen, dass pDCs eine Schlüsselrolle für eine potenten CD8⁺ T-Zellantwort während einer Virusinfektion einnehmen. Insbesondere durch eine Clec4c⁺/DTR-Mäuse induzierte pDC-Depletion, konnte eine signifikante Beeinträchtigung der Wirtsimmunantwort auf eine MVA-Infektion beobachtet werden. Hierbei zeigten Tiere ohne pDCs eine erheblich reduzierte B8R-spezifische IFN γ -produzierende CD8⁺ T-Zellen [Brewitz *et al.* 2017].

Darüber hinaus ist zu beobachten, dass die eingeschränkte Funktion der CD8⁺ T-Zellenaktivität nicht nur auf ein Zytokin/Chemokin beschränkt ist. Sowohl die IFN γ -, CD107 α - als auch MIP1 α -Induktion sind signifikant vermindert gegenüber dem Wildtyp. Dies lässt vermuten, dass die Entwicklung der CD8⁺ T-Zellen im Allgemeinen gestört ist. Wie unter Punkt 3.4.1 beschrieben, wird eine korrekte Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen, die zu einer klonalen Expansion sowie der Erlangung von Effektorfunktionen durch drei Signale erreicht: (I) TCR/Antigen/MHC-I-Komplexbildung (II) Kostimulatorische Rezeptor/Ligand-Bindungen (III) Zytokinsignale. Da bei der Analyse der dendritischen Zellen aus STING- sowie TLR9-*Knockout* Mäusen eine eingeschränkte Antigen/MHC-I-Präsentation weitgehend ausgeschlossen werden konnte, kommen als putative Ursache für die limitierte

CD8⁺-Immunität ein defizitärer kostimulatorischer Reiz sowie fehlende Zytokinsignale in Betracht. CD86 ist ein wichtiger Ligand (CD28- oder CTLA-4-Bindung; [Thiel *et al.* 2010; Crouse *et al.* 2015]) für die Kostimulation und wird auf STING-*Knockout*-BMDCs eingeschränkt exprimiert (Abbildung 15A). Neben CD86 sollten weitere Moleküle (z. B. CD80) untersucht werden und Bestandteil weiterer Forschungen bilden.

Dies kann jedoch nicht den alleinigen Grund für die eingeschränkte CD8⁺ Immunität *in vivo* darstellen, da TLR9-defiziente-BMDCs keine eingeschränkte Maturation aufzeigen (Abbildung 15B). Der hierbei wichtigste Faktor ist womöglich das fehlende dritte Signal von Zytokinen wie beispielsweise IFN-I. In T-Zellen löst IFN-I eine Reihe von wichtigen Signalkaskaden aus, die für das Überleben, die Proliferation sowie die Differenzierung zur Effektorzelle verantwortlich sind [Welsh *et al.* 2012; Crouse *et al.* 2015].

Überdies ist anzumerken, dass neben IFN-I das Zytokin IL-12 ein wichtiger Mediator während der Differenzierung von T-Zellen darstellt [Agarwal *et al.* 2009] und sollte im Kontext einer Defizienz von innate Immunfaktoren während einer Vacciniavirus-Infektion *in vitro* als auch *in vivo* analysiert werden. Diesen Kontext aufgreifend konnten Frenz *et al.* nachweisen, dass während einer VACV-Infektion IL-12, aber kein IFN α induziert wird. Konträr dazu verhält sich die Induktion von IL-12 und IFN α während einer MVA-Infektion; IFN α wird induziert und IL-12 hingegen nicht [Frenz *et al.* 2010].

Ferner ist bereits bekannt, dass IFN die Expression verschiedener Zytokine, unter anderem auch IL-12, unterdrückt und die gleichzeitig Expression von IFN mittels eines positiven *feedback-loop* fördert [Cousens *et al.* 1999; Dalod *et al.* 2002]. Diesbezüglich konnten Frenz *et al.* überdies nachweisen, dass eine MVA-Infektion in IFNAR^{-/-}-Mäusen eine Induktion von IL-12 aber keine IFN Antwort auslöst. Zusammenfassend lässt sich ein Modell aufstellen, bei dem durch MVA induziertes IFN-I zeitgleich auf CD8⁺ T-Zellen als auch auf dendritische Zellen wirkt, welche die T-Zellexpansion fördern. Eine VACV-Infektion hingegen induziert IL-12 welches eine IFNAR-unabhängige T-Zellexpansion fördern kann.

Des Weiteren ist ein indirekter Einfluss auf die CD8⁺ Immunität über Kreuzpräsentation durch eine eingeschränkte Endozytosefunktion auszuschließen, da die BMDCs aus den getesteten *Knockout*-Genotypen kein Defizit gegenüber dem Wildtyp aufzeigten (Abbildung 16A – 16D).

Sowohl TLR9 als auch STING sind für die Expansion/Proliferation der CD8⁺ T-Zellen wichtig, da die Anzahl immundominanter B8R-spezifischer CD8⁺ T-Zellen beim TLR9- sowie STING-

Knockout signifikant reduziert war (Abbildung 19B und 20B; Abs.# Tet+E). Daran anknüpfend zeigten bereits Studien von Berard und Mattei [2003 & 2001], dass IFN-I zusammen mit IL-15 die homöostatische Proliferation und Erhaltung von CD8⁺ T-Gedächtniszellen *in vivo* verstärkt. Im Kontext eines stabilen Aufbaus einer CD8⁺ Gedächtnis-T-Zell Immunität, hat die Arbeitsgruppe um Ramos [2009] zudem dargestellt, dass IFN α die Entwicklung von humanen CD8⁺ T-Zellen zu Gedächtniszellen fördert.

Dies korreliert mit den hier aufgezeigten Ergebnissen eines gestörten Aufbaus bestimmter Gedächtniszellsubpopulationen und unterstreicht die Bedeutung einer STING-induzierten IFN-I-Produktion während einer MVA-Infektion (Abb. 19B; Abs.# EG). Die Entwicklung der Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zu einer potenten Effektor- sowie zentralen-Gedächtnispopulation scheint TLR9-unabhängig zu sein (Abb. 20B; Abs.# EG, ZG).

Wie dargestellt, spielen sowohl STING als auch TLR9 somit eine entscheidende Rolle in der Aktivierung und im Aufbau einer Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort *in vivo*. In diesem Kontext ist der STING- und der TLR9-Signalweg von entscheidender Bedeutung bei der Chemokin/Zytokin-vermittelten Immunabwehr, wie am Beispiel der defizitären Produktion von IFN γ -, TNF α -, CD107 α - und MIP1 α aufgezeigt. Dies korreliert zugleich mit der verminderten Anzahl der Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Demgegenüber scheint die Endozytoseaktivität und die Endosomenfunktionalität zumindest von löslichen Antigenen STING-unabhängig und beeinflusst in dieser Hinsicht nicht die Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort.

7 Aktuelle Untersuchungen und Ausblick

Das Ziel weiterführender *in vitro* Arbeiten wird es sein, unter anderem zu untersuchen, welcher genaue Mechanismus für den Effekt der inhibierten Kreuzpräsentation nach der Behandlung der *Feeder*-Zellen mit araC bzw. IFN γ verantwortlich ist. Dazu zählt die Analyse replikationskompetenter Pockenviren, die teilweise andere immunmodulatorische Mechanismen aufweisen. In dieser vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass IFN-I einen essentiellen Immunmodulator darstellt. Anknüpfend daran ist neben IFN-I, wie bereits in Abschnitt 6.6 diskutiert, IL-12 ein putativer Immunmodulator, welcher im Kontext einer geschwächten CD8⁺ T-Zellimmunität sowie der Entwicklung eines CD8⁺ T-Zellgedächtnisses *in vivo* agiert. VACV triggert beispielsweise, im Gegensatz zu MVA, statt einer IFN-I- eine IL-12-induzierte Immunantwort und steht somit im Fokus weiterer Arbeiten [Frenz *et al.* 2010].

Während dieser Forschungsarbeit konnte überdies ein strikt Virus-DNA-abhängiger Effekt ausgeschlossen werden, da eine Inkubation mit IFN γ einen identischen Effekt auf die Kreuzpräsentation ausübte wie araC.

Interessanterweise zeigte die Kombination von STING-negativen – jedoch cGAS-positiven – HEK-Zellen, die als *Feeder*-Zellen fungierten, mit Wildtyp-BMDCs als APCs eine eingeschränkte Kreuzpräsentationsfähigkeit, welche in einer abgeschwächten CD8⁺ T-Zellantwort resultiert. Um einen spezifischen Faktor für diesen Effekt zu finden und eine mögliche Übertragung von Komponenten (z.B. cGAS oder cGAMP) des cGAS/STING-Pathways auszuschließen, sollten sowohl *Feeder*-Zellen als auch APCs mit STING- und/oder cGAS-Defekten verwendet werden.

Überdies ist auszuschließen, dass araC einen Einfluss auf die Degradation der viral produzierten Proteine sowie andere zellulären Prozesse besitzt, welche den inhibierenden Kreuzpräsentationsphänotyp auslösen. Dies könnte mit Hilfe von stabil Ovalbumin-exprimierenden Cloudman-Zellen erreicht werden, die mit araC behandelt werden. Anknüpfend sollte der Einfluss verschiedenen Typ-I-Interferone auf eine araC-behandelte Kokultur untersucht werden, um idealerweise einen Interferonsubtyp zu identifizieren, der für eine Wiederherstellung der inhibierten Kreuzpräsentation verantwortlich ist.

Gleichzeitig sollte die Auswirkung von araC sowie IFN γ auf die Apoptose untersucht werden.

Hinsichtlich weiterer *in vivo* Arbeiten stehen die Schutzwirkung im intranasalen Belastungsmodell (VACV), andere Infektionsrouten (i.d.; s.c.) sowie Serumanalysen bezüglich der Zytokin/Chemokin Produktion während der Akut- und Gedächtnisphase im Fokus. Weitere Experimente können darüber hinaus um die Analyse der Bedeutung weiterer Immunfaktoren (TLR-2, -3, -4, -7, MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-}, MDA5^{-/-}, IFN β ^{-/-}) erweitert werden.

Als Ziel steht bei diesen Studien die Identifizierung zentraler Komponenten an der Schnittstelle des angeborenen und adaptiven Immunsystems im Vordergrund, die maßgeblich die Vacciniavirus-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort beeinflussen. Langfristig sollen die Erkenntnisse der Optimierung von Vakzinierungsstrategien unter Verwendung von pockenviralen Vektoren dienen.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung des CVA und MVA Virusgenoms (modifiziert nach Drexler).....	10
Abb. 2:	Replikationszyklus vom Vacciniavirus (modifiziert nach [Moss 2007])	14
Abb. 3:	Der cGAS/STING Signalweg (modifiziert nach [Chen <i>et al.</i> 2016]).....	18
Abb. 4:	Differenzierung von CD8 ⁺ T -Gedächtniszellen (modifiziert nach [Russ <i>et al.</i> 2013])	23
Abb. 5:	Schematische Darstellung der direkten Präsentation	46
Abb. 6:	Strategie zur Kreuzpräsentation	47
Abb. 7:	IFN γ Produktion von Vacciniavirus-spezifischen T-Zellen nach Kreuzpräsentation mit und ohne araC.....	56
Abb. 8:	Die CD8 ⁺ T-Zell Aktivierung ist STING unabhängig.....	58
Abb. 9:	MVA-induzierte IFN-I Produktion in BMDC ist strikt STING abhängig und die virale DNA-Replikation beeinflusst im hohen Maß die IFN-I Induktion.....	60
Abb. 10:	Antigenpräsentationsversuch mit gekreuzten Überständen.....	61
Abb. 11:	Lösliche Faktoren beeinflussen möglicherweise die CD8 ⁺ T-Zellantwort gegen späte Antigene während der Kreuzpräsentation	63
Abb. 12:	Die Induktion von Typ-I-Interferonen ist strikt STING-gekoppelt.....	65
Abb. 14:	Die Kreuzpräsentation mit HEK-Zellen als Feeder ist signifikant STING-abhängig	66
Abb. 15:	TLR9 beeinflusst nicht die Kreuzpräsentation-induzierte CD8 ⁺ Aktivierung	68
Abb. 16:	STING beeinflusst die Reifung von <i>Bystander</i> -CD11c ⁺ -BMDCs	69
Abb. 17:	STING-, TLR9 und IFNAR1-defiziente BMDCs haben keinen Nachteil bei der Endozytose sowie der endosomalen Degradation von markiertem Ovalbumin.. ..	72
Abb. 18:	IFN γ inhibiert die Kreuzpräsentation trotz der Verfügbarkeit viraler Antigene75	
Abb. 19:	STING hat einen starken Einfluss auf die Ausprägung einer MVA-spezifischen Immunantwort gegen das immundominante B8R-Antigen.....	78
Abb. 20:	Die Reifung und Ausdifferenzierung Vacciniavirus-spezifischer immundominanter CD8 ⁺ T-Zellen ist STING-abhängig.....	80
Abb. 21:	Die Bildung einer Vacciniavirus-spezifischen CD8 ⁺ Immunantwort ist TLR9-abhängig	81

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Nukleotidsequenzen der PCR-Primer für die Analyse der Cloudman-Zellen auf STING	40
---	----

10 Abkürzungsverzeichnis

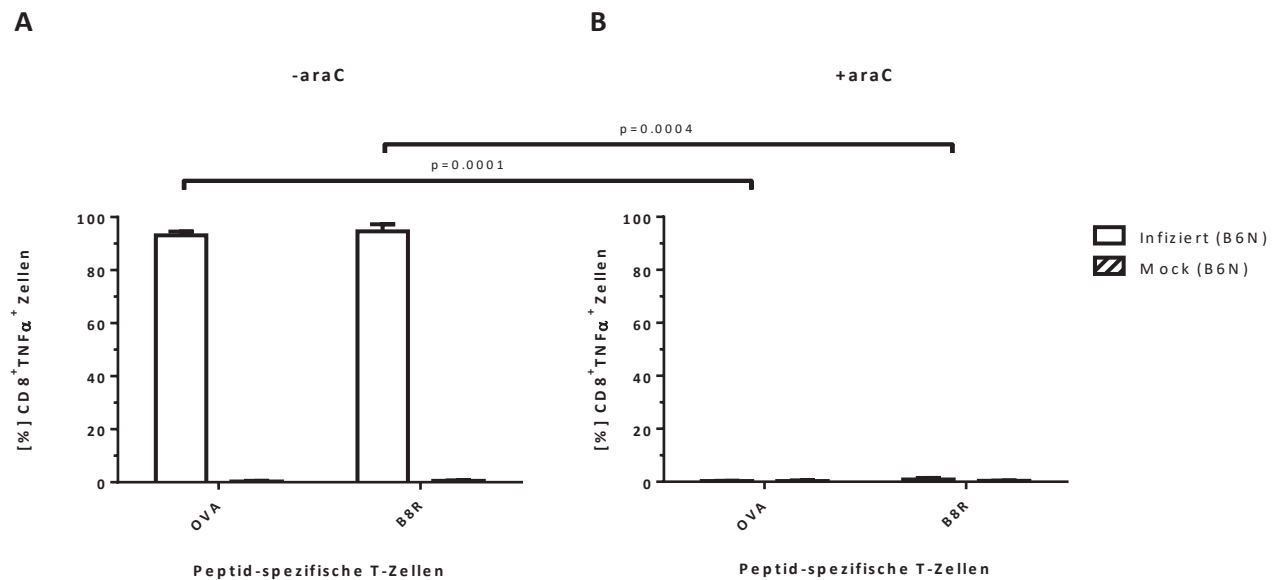
µL	Mikroliter
ADAR	Engl.: <i>adenosine deaminase acting on RNA</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle Engl.: <i>antigen presenting cell</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAC	Engl.: <i>bacterial artificial chromosomes</i>
BMDC	Knochenmark-abstammende dendritische Zelle (Engl.: <i>bone marrow-derived dendritic cell</i>)
bp (kb)	Basenpaar (Kilobasen)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
CEF	Hühnerembryofibroblasten Engl.: <i>chicken embryo fibroblast</i>
GMP-AMP	Guanosin monophosphat–adenosin monophosphat
CEV	Engl.: <i>cell-associated enveloped virus</i>
cGAS	Engl.: <i>cyclic GMP-AMP synthase</i>
CVA	Engl.: <i>Chorioallantois Vacciniavirus Ankara</i>
DMEM	Engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Effektorzellen
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetra acetic acid
EEV	Engl.: <i>extracellular enveloped virus</i>
EFC	Engl.: <i>entry fusion complex</i>
EG	Effektorgedächtniszelle
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EV	Engl.: <i>extracellular virions</i>
g	Gramm
<i>g</i>	<i>g</i> -Kraft
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IFN	Interferon
IRF3	Engl.: <i>interferon regulatory factor 3</i>
IFNAR	Engl.: <i>interferon-α/β receptor</i>

Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMV	Engl.: <i>intracellular mature virions</i>
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
Jak 1/2	Januskinase 1 und 2
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
L	Liter
LB	engl. <i>Lysogeny broth</i>
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute
mL	Milliliter
MLB	Engl. <i>Mild Lysis Buffer</i>
mM	Millimolar
MV	Engl.: <i>mature virions</i>
MVA	Modifizierter Vaccinia Ankara Virus
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Natrium orthovanadat
Na ₄ P ₂ O ₇	Natriumpyrophosphat Tet.
NaCl	Natriumchlorid
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
ORF	Engl. <i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Picogramm
PK-R	Proteinkinase R
RNA _i	RNA _{Interferenz}
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
STING	Engl.: <i>stimulator of interferon genes</i>
TBS	Engl.: <i>Tris Buffered Saline</i>
TBK1	Engl.: <i>TANK-binding kinase 1</i>
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
TLR	Engl.: <i>Toll-like receptor</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor α

	Engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyk	Tyrosinkinase
UV	Ultraviolett
VACV	Vacciniavirus
VARV	Variolavirus
WV	Engl.: <i>wrapped virions</i>
ZK	Zellkultur

11 Anhang

11.1 Ergänzende Abbildungen

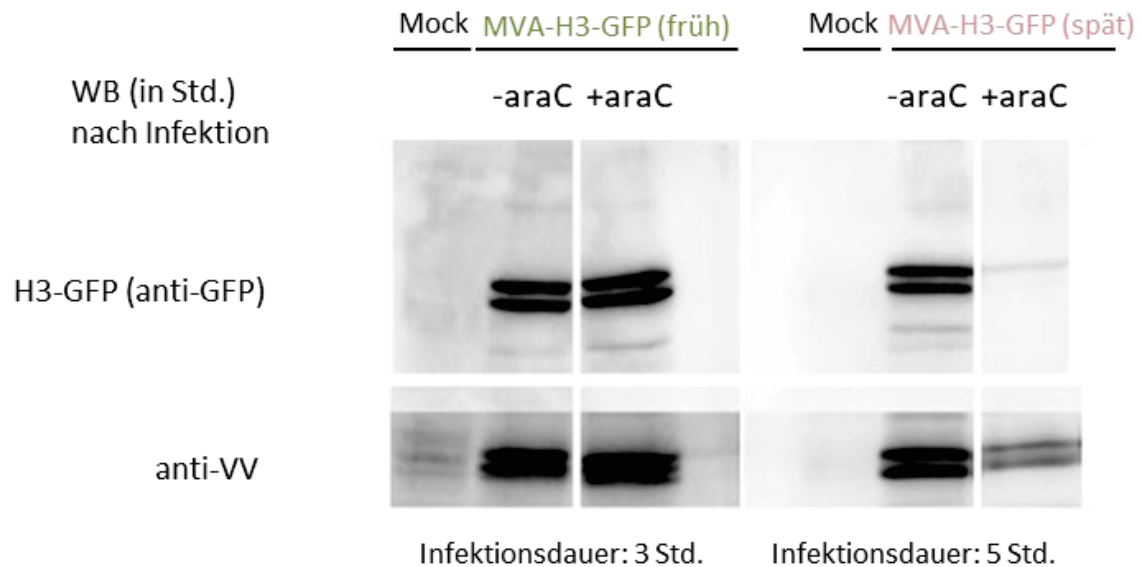


Anh. Abb. 1.: $TNF\alpha$ Produktion von Vacciniavirus-spezifischen T-Zellen mit und ohne araC

Cloudman „Feeder-Zellen“ (2×10^6) wurden mit MVA-früh-OVA mit einer MOI = 1 infiziert und dabei ohne (A) bzw. mit (B) araC (40 μ g/mL) inkubiert.

OVA- und B8R-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen wurden nach einer vierstündigen Koinkubation mit kreuzpräsentierenden WT-BMDCs auf ihre $TNF\alpha$ Produktion analysiert.

Als Kontrolle dienten nicht infizierte Cloudman-Zellen als *Feeder* (Mock).
 n=2; Durchschnitt + SD.

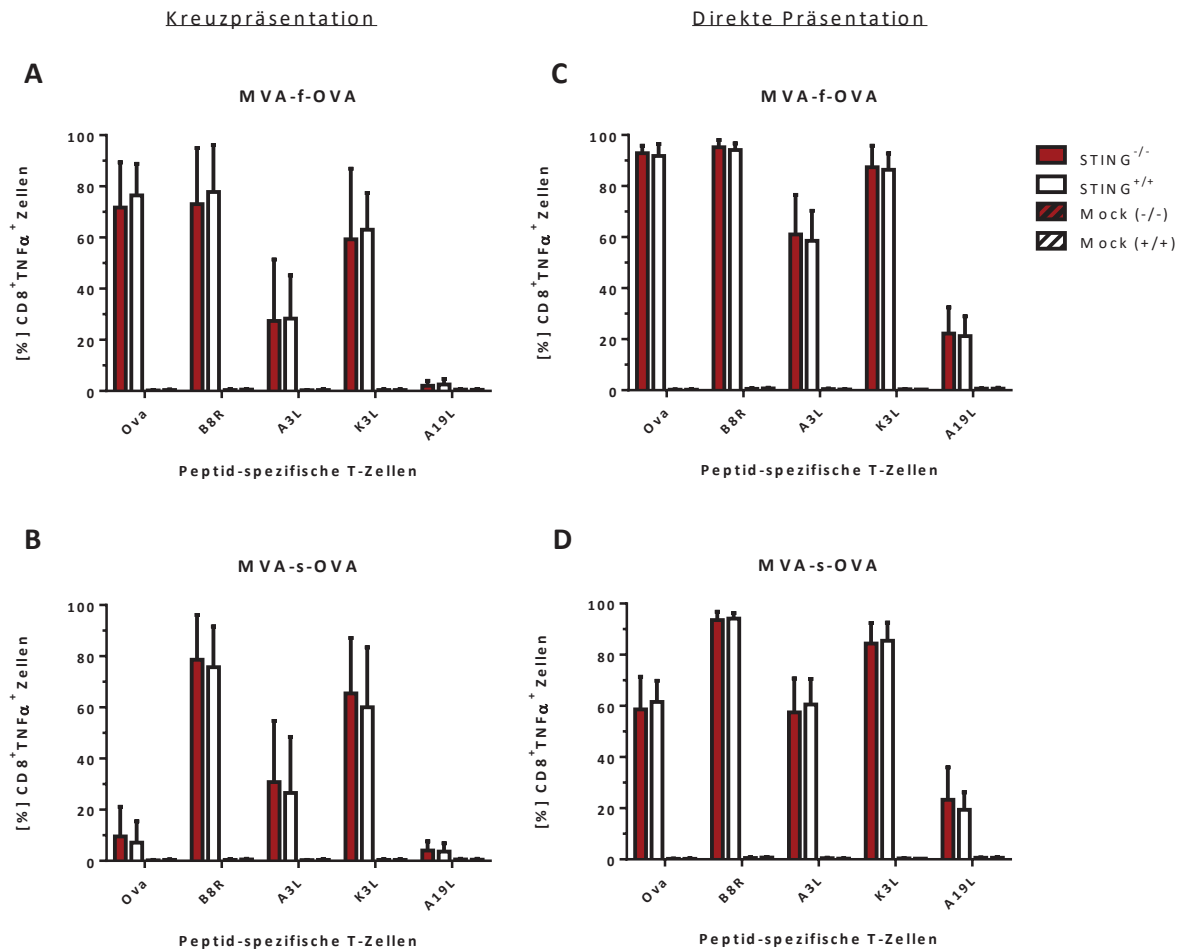


Anh. Abb. 2.: AraC hat keinen inhibitorischen Einfluss auf die Expression von frühen Antigenen (modifiziert nach Tao, nicht veröffentlicht)

HeLa-Zellen (1×10^6) wurden jeweils mit MVA-früh-H3-GFP oder MVA-spät-H3-GFP mit einer MOI = 10 mit oder ohne Zugabe von araC für jeweils drei Stunden (MVA-früh-H3-GFP) oder 5 Std. (MVA-spät-H3-GFP) infiziert.

Nach der Infektion wurden Infizierte- bzw. nicht-infizierte (Mock) Zellen geerntet und lysiert. Es folgte ein Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Die Proteine wurden mittels anti-GFP (erkennt ein Fusionsprotein (H3-GFP) aus viralem Membranprotein H3 und dem fluoreszierenden Protein GFP) bzw. anti-VV-Antikörpern (polyklonales Serum) (1000x verd.) detektiert und anschließend visualisiert.

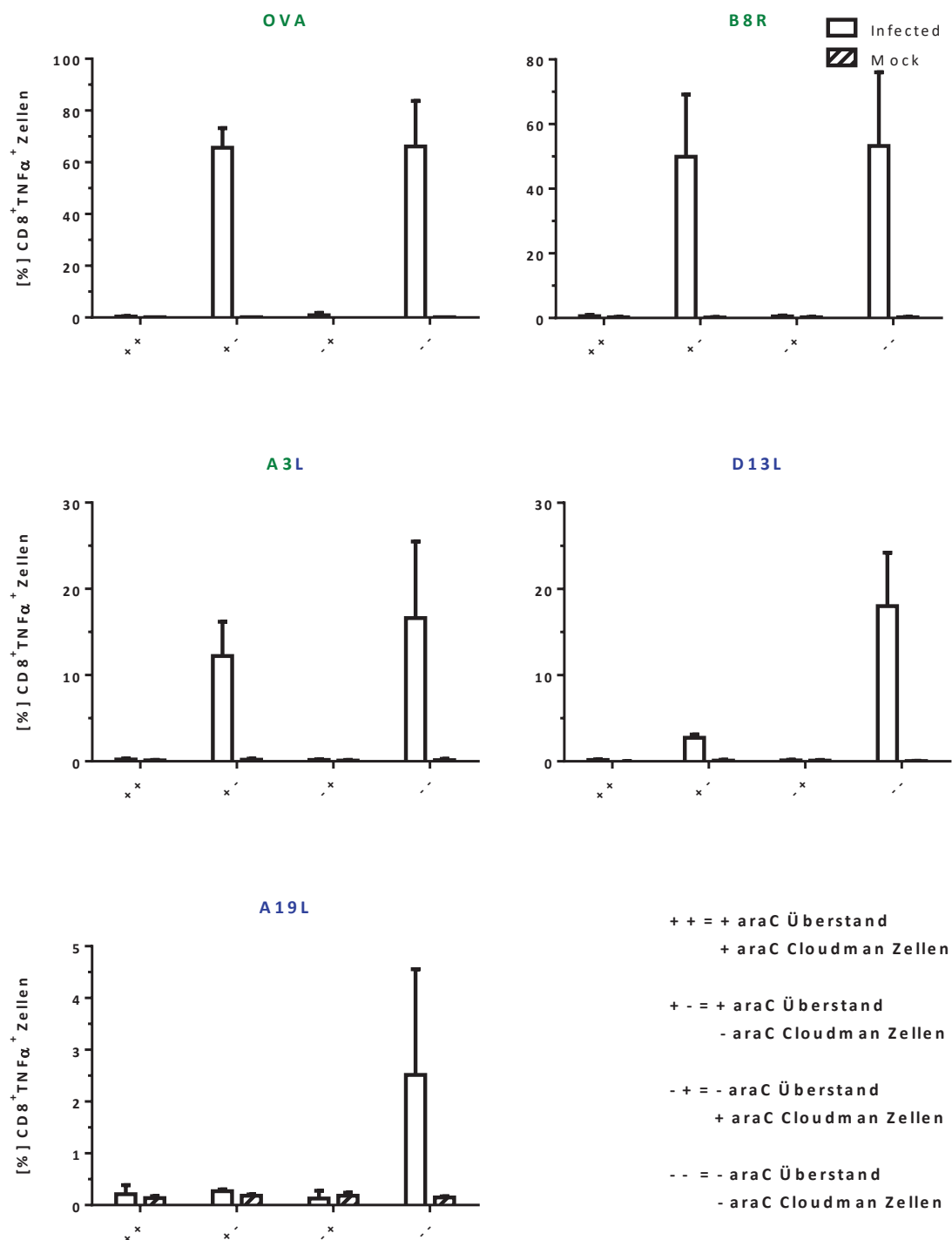
Dargestellt ist eine repräsentative Westernblot-Analyse aus drei unabhängigen Experimenten.



Anh. Abb. 3.: Die CD8⁺ T-Zell Aktivierung ist STING unabhängig

Vacciniavirus-spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden nach einer direkten- oder Kreuz-Präsentation auf ihre **TNFα** analysiert. Dabei wurden bei der Kreuzpräsentation die Cloudman-Zellen als (2×10^6) auch die BMDCs (4×10^6) bei der direkten Präsentation mit MVA infiziert (MOI = 1), dass Ovalbumin sowohl früh (A+C) als auch spät (B+D) während des Replikationszyklus exprimiert. Die eingesetzten dendritischen Zellen wurden aus STING^{-/-} und STING^{+/+} Mäusen generiert.

Als Kontrolle dienten nicht infizierte Cloudman- und dendritische Zellen (Mock). n=3; Durchschnitt + SD.



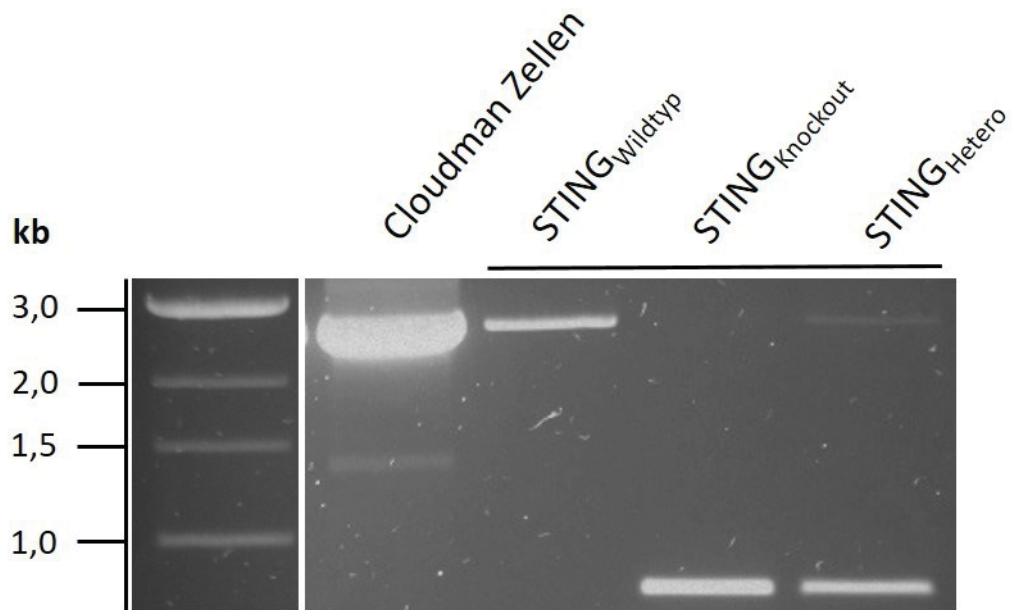
Anh. Abb. 4.: Löslicher Faktor beeinflusst möglicherweise die CD8⁺ T-Zellantwort gegen späte Antigene während der Kreuzpräsentation

Cloudman-Zellen wurden mit MVA-früh-OVA (MOI = 1) infiziert. Nach der 12 stündigen Infektion wurden Cloudman- mit dendritischen Zellen, wie in Abbildung 10 beschrieben, kokultiviert und abschließend jeweils mit OVA-, B8R-, A3L-, D13L-, und A19L-spezifischen CD8⁺ T-Zellen für weitere vier Stunden kokultiviert.

Die Auswertung der **TNFα**-Induktion erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

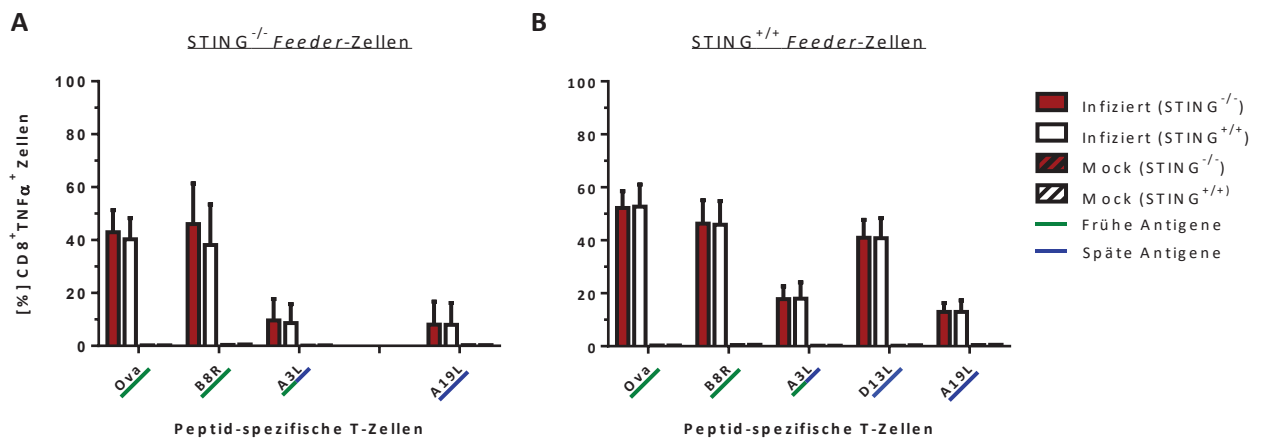
OVA, B8R, A3L: n=3; Durchschnitt + SD.

D13L, A19L: n=2, Durchschnitt + SD.



Anh. Abb. 5.: Analyse der Cloudman-Zellen auf STING.

Analyse der eingesetzten Cloudman-Zellen auf STING. Die Auswertung erfolgte im 1%igen Agarosegel. Hetero = heterozygot.
DNA-Marker: 1 kb DNA Ladder



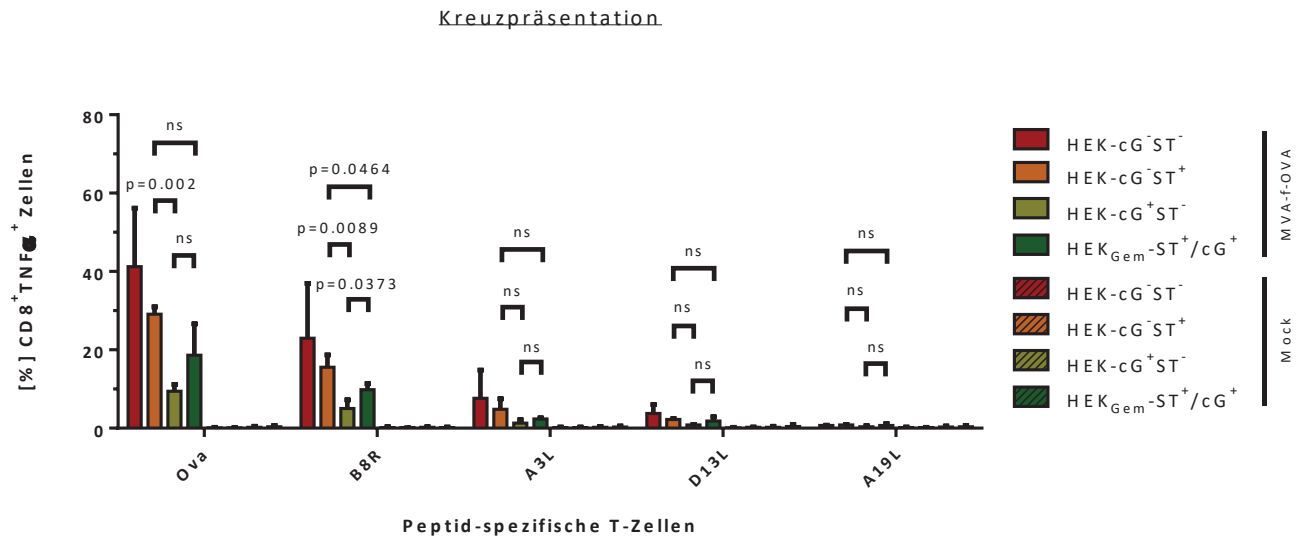
Anh. Abb. 6.: STING in *Feeder*-Zellen und in APCs hat keinen Einfluss auf die Kreuzpräsentation

Zwei mal 10^6 STING^{-/-} und STING^{+/+} BMDCs wurden mit **MVA-früh-OVA**, mit einer MOI von 1, infiziert. Infizierte STING^{-/-} sowie STING^{+/+}-BMDCs wurden zu 2×10^6 nicht-infizierten STING^{-/-} (A) und STING^{+/+}-BMDCs (B) transferiert und koinkubiert. Nach der Infektion wurde die jeweilige Koinkubation mit OVA-, B8R-, A3L-, D13L-, und A19L-spezifischen CD8⁺ T-Zellen für weitere vier Stunden inkubiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf die Vacciniavirus-spezifische CD8⁺ Antwort (**TNFα**) analysiert.

Die D13L-spezifische CD8⁺ Antwort ist bei der Gruppe mit STING^{-/-} BMDCs als *Feeder*-Zellen nicht dargestellt.

Als Kontrolle dienten nicht infizierte STING^{-/-} und STING^{+/+}- BMDCs (Mock).

n=3; Durchschnitt + SD.



Anh. Abb. 7.: Die Kreuzpräsentation mit HEK-Zellen als *Feeder* ist vermutlich STING-unabhängig

Für die Kreuzpräsentation wurden jeweils 2×10^6 HEK-Zellen mit MVA-f-OVA (MOI = 1) für 12 Std. infiziert. Infizierte HEK-Zellen wurden zu 2×10^6 B6J-BMDCs überführt und für weitere 12 Std. koinkubiert. Nach der Koinkubation erfolgte die 4-stündige Inkubation mit CD8⁺ T-Zellen und die abschließende Analyse der CD8⁺ T-Zellantwort (**TNFα**) mittels der Durchflusszytometrie.

Als Kontrolle dienten nicht-infizierte HEK-Zellen (Mock).

HEK-cG⁻ST⁻ = HEK-Wildtyp (ohne cGAS und STING)

HEK-cG⁻ST⁺ = HEK mit STING-*Knockin*

HEK-cG⁺ST⁻ = HEK mit cGAS-*Knockin*

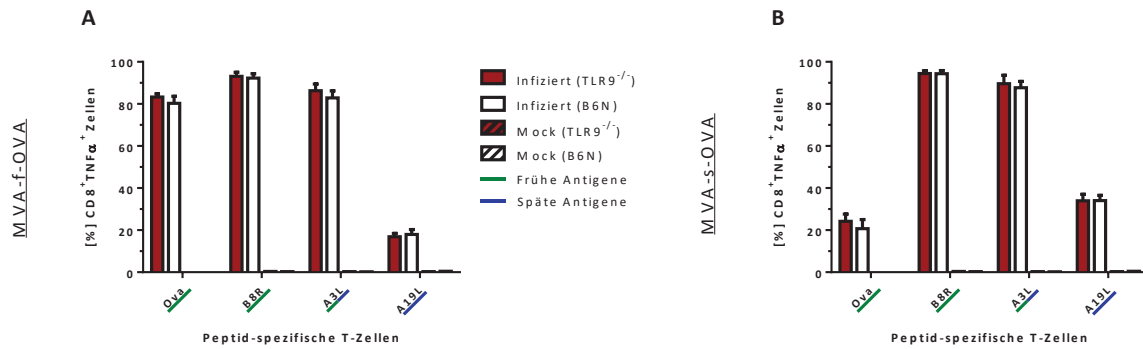
HEK-cG⁺/ST⁺ = Zellgemisch aus HEK-cG⁻ST⁻ und HEK-cG⁻ST⁺ im Verhältnis 1:1

n=3; Durchschnitt + SD;

OVA: HEK-cG⁻ST⁺ vgl. HEK-cG⁺ST⁻ p=0.002,

B8R: HEK-cG⁻ST⁺ vgl. HEK-Gem⁻ST⁺/cG⁺: p=0.0464, HEK-cG⁻ST⁺ vgl. HEK-cG⁺ST⁻: p=0.0089, HEK-cG⁺ST⁻ vgl. HEK-Gem⁻ST⁺/cG⁺: p=0.0373;

ns = nicht signifikant

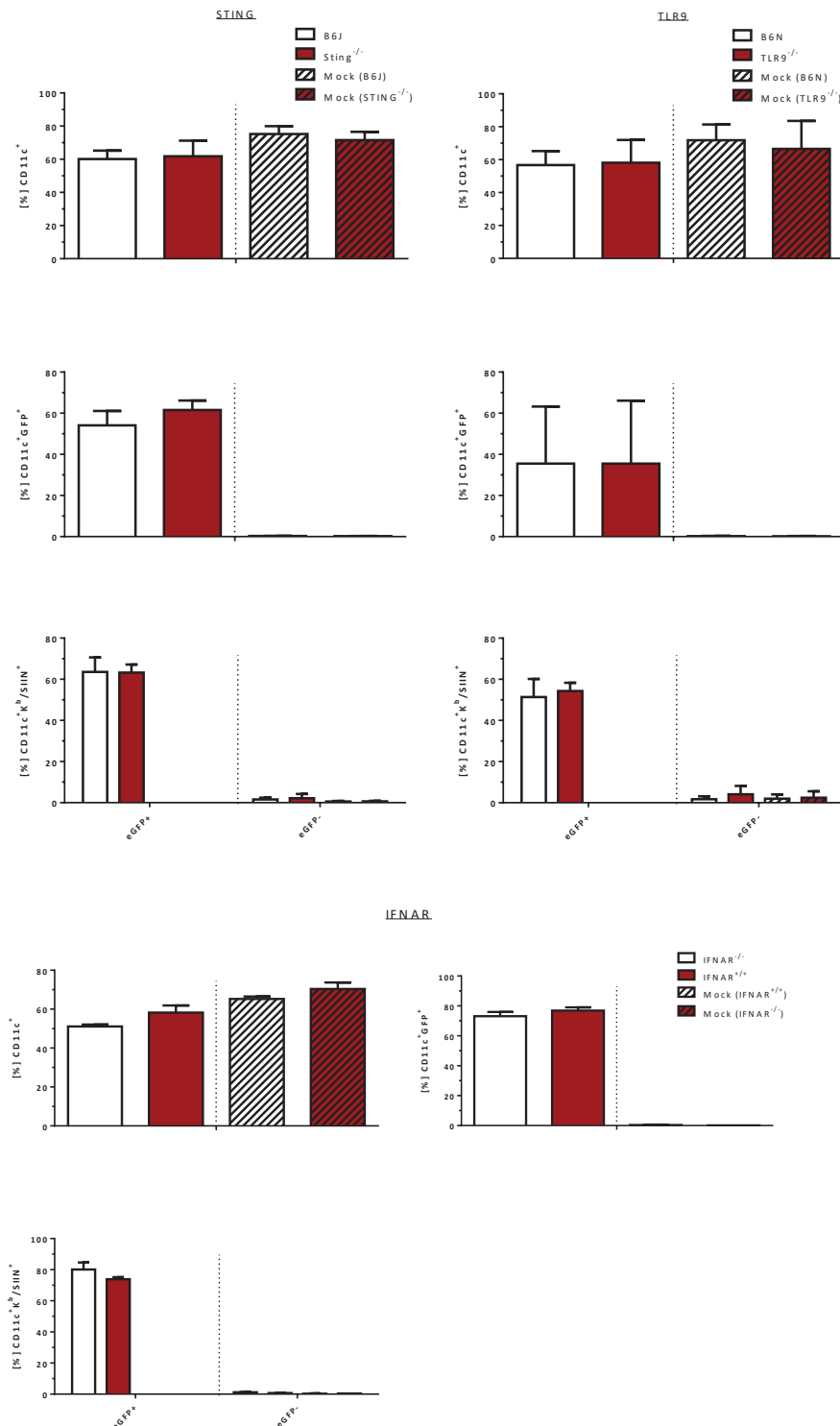


Anh. Abb. 8.: TLR9 beeinflusst nicht die Kreuzpräsentation-induzierte CD8⁺ Aktivierung

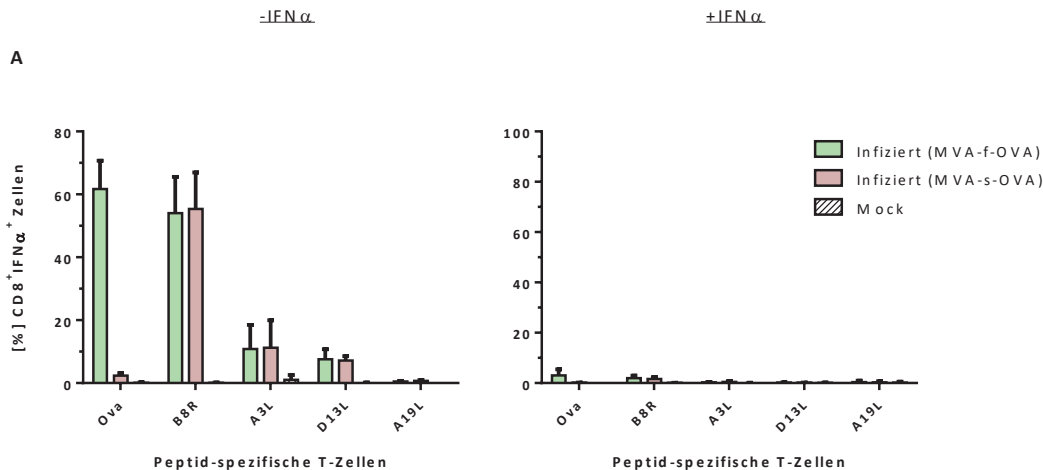
Zwei Mal 10^6 Cloudman-Zellen wurden mit MVA-f-OVA bzw. MVA-s-OVA (MOI = 1) infiziert und jeweils zu 2×10^6 nicht-infizierten TLR9^{-/-} bzw. B6N-BMDCs überführt und koinkubiert. Die Feeder-APC Kokulturen wurden überdies für weitere 4 Std. mit Vacciniavirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen inkubiert und anknüpfend mittels Durchflusszytometrie auf Aktivität analysiert (TNFα).

Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Cloudman-Zellen (Mock).

n=3 für TLR9; Durchschnitt + SD.



Anh. Abb. 9.: STING, TLR9 und IFNAR1 haben keinen Einfluss auf die Funktionalität von BMDCs
 Zwei Mal 10^6 STING-, TLR9- oder IFNAR1-Wildtyp bzw. -*Knockout* BMDCs wurden mit MVA-NP-eGFP wahlweise mit einer MOI von 0,5 – 2 infiziert. Eine 12 stündige Inkubation sowie eine abschließende Analyse der Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie schloss sich an. Untersucht wurden hierbei die Frequenz (CD11c⁺), die Infektionsrate (CD11c⁺GFP⁺) sowie die Beladungs- bzw. die Präsentationsfähigkeit (CD11c⁺K^b/SIIN⁺) der BMDCs.
 Als Kontrolle dienten nicht infizierte BMDCs (Mock). n=3; Durchschnitt + SD.

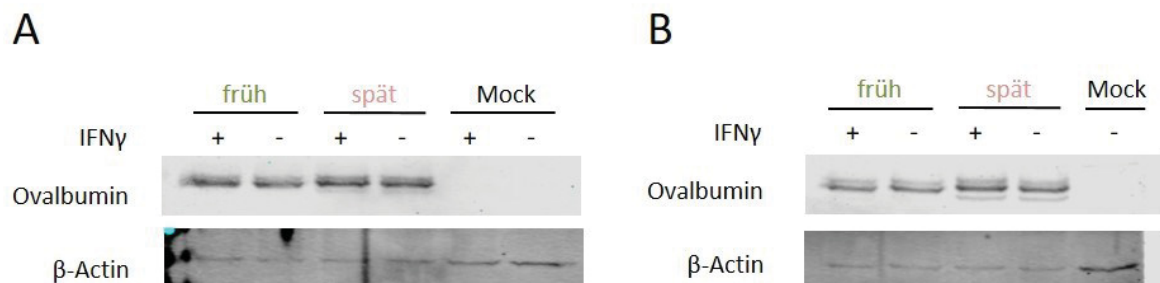


Anh. Abb. 10.: IFN γ inhibiert die Kreuzpräsentation

Zwei Mal 10^6 Cloudman-Zellen wurden vor der Infektion mit 5ng/mL IFN γ für 24 Stunden inkubiert und anschließend mit MVA-f-OVA oder MVA-s-OVA mit einer MOI von 1 für 12 Stunden infiziert. Die Cloudman-Zellen wurden mit 2×10^6 Wildtyp (B6N) BMDCs zusammengeführt und für weitere 12 Stunden koinkubiert. Abschließend wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (**TNF α**).

Als Kontrolle dienten nicht infizierte sowie nicht mit IFN γ behandelte Cloudman-Zellen.

n=3; Durchschnitt + SD.



Anh. Abb. 11.: IFN γ Vorbehandlung erlaubt frühe und späte Genexpression in infizierten Zellen.

MVA-s- und MVA-f-OVA Infizierte- und Mock-Cloudman-Zellen wurden geerntet und lysiert. Die Zellen wurden teilweise vor der Infektion mit 5ng/mL IFN γ für 24 Stunden inkubiert. Von den erzeugten Lysaten wurden 25 μ g Gesamtprotein pro Geltasche geladen. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Proteine über Ovalbumin-spezifische bzw. murin- β -Actin-spezifischen Antikörper detektiert und mittels IRDye-Detektion visualisiert (A + B).

12 Literaturverzeichnis

Abbas A., et al. (2015). **Cellular and molecular immunology**. Elsevier Saunders 8th Edition.

Abe T. & Barber G. N. (2014). **Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF-kappaB activation through TBK1**. *J Virol* 88(10): 5328-5341.

Ablasser A., et al. (2013). **cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING**. *Nature* 498(7454): 380-384.

Ablasser A., et al. (2013). **Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP**. *Nature* 503(7477): 530-534.

Agarwal P., et al. (2009). **Gene regulation and chromatin remodeling by IL-12 and type I IFN in programming for CD8 T cell effector function and memory**. *J Immunol* 183(3): 1695-1704.

Akira S., et al. (2006). **Pathogen recognition and innate immunity**. *Cell* 124(4): 783-801.

Albert M. L., et al. (1998). **Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes**. *J Exp Med* 188(7): 1359-1368.

Alcami A. & Smith G. L. (1995). **Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity**. *J Virol* 69(8): 4633-4639.

Allan R. S., et al. (2006). **Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming**. *Immunity* 25(1): 153-162.

Antoine G., et al. (1998). **The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses**. *Virology* 244(2): 365-396.

Armstrong J. A., et al. (1973). **The mode of entry of vaccinia virus into L cells**. *J Gen Virol* 21(3): 533-537.

Bajenoff M., et al. (2006). **Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes**. *Immunity* 25(6): 989-1001.

Baldick C. J., Jr. & Moss B. (1993). **Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by vaccinia virus intermediate-stage genes**. *J Virol* 67(6): 3515-3527.

- Balkwill F. (1988). **Cytokines--soluble factors in immune responses.** *Curr Opin Immunol* 1(2): 241-249.
- Basha G., et al. (2012). **A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway.** *Nat Immunol* 13(3): 237-245.
- Basu S. & Srivastava P. K. (2000). **Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses.** *Cell Stress Chaperones* 5(5): 443-451.
- Becker M., et al. (2014). **Ontogenic, Phenotypic, and Functional Characterization of XCR1(+) Dendritic Cells Leads to a Consistent Classification of Intestinal Dendritic Cells Based on the Expression of XCR1 and SIRPalpha.** *Front Immunol* 5: 326.
- Bedoui S., et al. (2009). **Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells.** *Nat Immunol* 10(5): 488-495.
- Beeton C. & Chandy K. G. (2007). **Preparing T cell growth factor from rat splenocytes.** *J Vis Exp*(10): 402.
- Belz G. T., et al. (2002). **CD36 is differentially expressed by CD8+ splenic dendritic cells but is not required for cross-presentation in vivo.** *J Immunol* 168(12): 6066-6070.
- Beutler B., et al. (2007). **Genetic analysis of resistance to viral infection.** *Nat Rev Immunol* 7(10): 753-766.
- Bevan M. J. (1976). **Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay.** *J Exp Med* 143(5): 1283-1288.
- Blancou J., et al. (1986). **Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus.** *Nature* 322(6077): 373-375.
- Bondanza A., et al. (2004). **Inhibition of phosphatidylserine recognition heightens the immunogenicity of irradiated lymphoma cells in vivo.** *J Exp Med* 200(9): 1157-1165.
- Bowie A. G. & Unterholzner L. (2008). **Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling.** *Nat Rev Immunol* 8(12): 911-922.
- Brewitz A., et al. (2017). **CD8+ T Cells Orchestrate pDC-XCR1+ Dendritic Cell Spatial and Functional Cooperativity to Optimize Priming.** *Immunity* 46(2): 205-219.
- Bridgeman A., et al. (2015). **Viruses transfer the antiviral second messenger cGAMP between cells.** *Science* 349(6253): 1228-1232.

Broyles S. S. & Fesler B. S. (1990). **Vaccinia virus gene encoding a component of the viral early transcription factor.** *J Virol* 64(4): 1523-1529.

Broyles S. S., et al. (1988). **Purification of a factor required for transcription of vaccinia virus early genes.** *J Biol Chem* 263(22): 10754-10760.

Burdette D. L. & Vance R. E. (2013). **STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol.** *Nat Immunol* 14(1): 19-26.

Cairns J. (1960). **The initiation of vaccinia infection.** *Virology* 11: 603-623.

Carroll M. W. & Moss B. (1997). **Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line.** *Virology* 238(2): 198-211.

Carter G. C., et al. (2005). **Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans.** *J Gen Virol* 86(Pt 5): 1279-1290.

Castellino F., et al. (2006). **Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8⁺ T cells to sites of CD4⁺ T cell-dendritic cell interaction.** *Nature* 440(7086): 890-895.

Cebrian I., et al. (2011). **Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells.** *Cell* 147(6): 1355-1368.

Cerovic V., et al. (2015). **Lymph-borne CD8 α ⁺ dendritic cells are uniquely able to cross-prime CD8⁺ T cells with antigen acquired from intestinal epithelial cells.** *Mucosal Immunol* 8(1): 38-48.

Chen H., et al. (2011). **Activation of STAT6 by STING is critical for antiviral innate immunity.** *Cell* 147(2): 436-446.

Chen Q., et al. (2016). **Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing.** *Nat Immunol* 17(10): 1142-1149.

Chiang M. C., et al. (2016). **Differential uptake and cross-presentation of soluble and necrotic cell antigen by human DC subsets.** *Eur J Immunol* 46(2): 329-339.

Civril F., et al. (2013). **Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS.** *Nature* 498(7454): 332-337.

Cochran M. A., et al. (1985). **In vitro mutagenesis of the promoter region for a vaccinia virus gene: evidence for tandem early and late regulatory signals.** *J Virol* 54(1): 30-37.

Cohen B., et al. (1995). **Ligand-induced association of the type I interferon receptor components.** *Mol Cell Biol* 15(8): 4208-4214.

Cohn L., et al. (2013). **Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation.** *J Exp Med* 210(5): 1049-1063.

Condit R. C., et al. (2006). **In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion.** *Adv Virus Res* 66: 31-124.

Cottingham M. G., et al. (2008). **Recombination-mediated genetic engineering of a bacterial artificial chromosome clone of modified vaccinia virus Ankara (MVA).** *PLoS One* 3(2): e1638.

Cousens L. P., et al. (1999). **Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection.** *J Exp Med* 189(8): 1315-1328.

Crouse J., et al. (2015). **Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons.** *Nat Rev Immunol* 15(4): 231-242.

Cyrklaff M., et al. (2007). **Whole cell cryo-electron tomography reveals distinct disassembly intermediates of vaccinia virus.** *PLoS One* 2(5): e420.

Dahl R. & Kates J. R. (1970). **Intracellular structures containing vaccinia DNA: isolation and characterization.** *Virology* 42(2): 453-462.

Dai P., et al. (2014). **Modified vaccinia virus Ankara triggers type I IFN production in murine conventional dendritic cells via a cGAS/STING-mediated cytosolic DNA-sensing pathway.** *PLoS Pathog* 10(4): e1003989.

Dales S. (1963). **The uptake and development of vaccinia virus in strain L cells followed with labeled viral deoxyribonucleic acid.** *J Cell Biol* 18: 51-72.

Dales S. & Kajioka R. (1964). **The Cycle of Multiplication of Vaccinia Virus in Earle's Strain L Cells. I. Uptake and Penetration.** *Virology* 24: 278-294.

Dales S. & Siminovitch L. (1961). **The development of vaccinia virus in Earle's L strain cells as examined by electron microscopy.** *J Biophys Biochem Cytol* 10: 475-503.

Dalod M., et al. (2002). **Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo.** *J Exp Med* 195(4): 517-528.

Davies M. L., et al. (2017). **A systemic macrophage response is required to contain a peripheral poxvirus infection.** *PLoS Pathog* 13(6): e1006435.

Decker T., et al. (2005). **The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection.** *Nat Rev Immunol* 5(9): 675-687.

den Haan J. M., et al. (2000). **CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo.** *J Exp Med* 192(12): 1685-1696.

Desch A. N., et al. (2011). **CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen.** *J Exp Med* 208(9): 1789-1797.

Diner E. J., et al. (2013). **The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING.** *Cell Rep* 3(5): 1355-1361.

Dobbins G. C., et al. (2008). **alpha-Actinin interacts with rapsyn in agrin-stimulated AChR clustering.** *Mol Brain* 1: 18.

Doglio L., et al. (2002). **The Vaccinia virus E8R gene product: a viral membrane protein that is made early in infection and packaged into the virions' core.** *J Virol* 76(19): 9773-9786.

Domi A. & Moss B. (2002). **Cloning the vaccinia virus genome as a bacterial artificial chromosome in Escherichia coli and recovery of infectious virus in mammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(19): 12415-12420.

Domi A. & Moss B. (2005). **Engineering of a vaccinia virus bacterial artificial chromosome in Escherichia coli by bacteriophage lambda-based recombination.** *Nat Methods* 2(2): 95-97.

Donaldson J. G. & Williams D. B. (2009). **Intracellular assembly and trafficking of MHC class I molecules.** *Traffic* 10(12): 1745-1752.

Dorner B. G., et al. (2009). **Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells.** *Immunity* 31(5): 823-833.

Drexler I., et al. (1998). **Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells.** *J Gen Virol* 79 (Pt 2): 347-352.

- Drexler I., et al. (2003). **Identification of vaccinia virus epitope-specific HLA-A*0201-restricted T cells and comparative analysis of smallpox vaccines.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1): 217-222.
- Eickhoff S., et al. (2015). **Robust Anti-viral Immunity Requires Multiple Distinct T Cell-Dendritic Cell Interactions.** *Cell* 162(6): 1322-1337.
- Eitz Ferrer P., et al. (2011). **Induction of Noxa-mediated apoptosis by modified vaccinia virus Ankara depends on viral recognition by cytosolic helicases, leading to IRF-3/IFN-beta-dependent induction of pro-apoptotic Noxa.** *PLoS Pathog* 7(6): e1002083.
- Esposito J., et al. (1987). **Vaccinia virus recombinants expressing rabiesvirus glycoprotein protect against rabies.** *Virus Genes* 1(1): 7-21.
- Ewer K., et al. (2016). **A Monovalent Chimpanzee Adenovirus Ebola Vaccine Boosted with MVA.** *N Engl J Med* 374(17): 1635-1646.
- Ewer K. J., et al. (2013). **Protective CD8+ T-cell immunity to human malaria induced by chimpanzee adenovirus-MVA immunisation.** *Nat Commun* 4: 2836.
- Frenz T., et al. (2010). **Concomitant type I IFN receptor-triggering of T cells and of DC is required to promote maximal modified vaccinia virus Ankara-induced T-cell expansion.** *Eur J Immunol* 40(10): 2769-2777.
- Gao P., et al. (2013). **Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase.** *Cell* 153(5): 1094-1107.
- Gasteiger G., et al. (2007). **Cross-priming of cytotoxic T cells dictates antigen requisites for modified vaccinia virus Ankara vector vaccines.** *J Virol* 81(21): 11925-11936.
- Gentili M., et al. (2015). **Transmission of innate immune signaling by packaging of cGAMP in viral particles.** *Science* 349(6253): 1232-1236.
- Gershon P. D. & Moss B. (1990). **Early transcription factor subunits are encoded by vaccinia virus late genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(11): 4401-4405.
- Goubau D., et al. (2013). **Cytosolic sensing of viruses.** *Immunity* 38(5): 855-869.
- Grant E. P. & Rock K. L. (1992). **MHC class I-restricted presentation of exogenous antigen by thymic antigen-presenting cells in vitro and in vivo.** *J Immunol* 148(1): 13-18.
- Guermonprez P., et al. (2003). **ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells.** *Nature* 425(6956): 397-402.

Haniffa M., et al. (2012). **Human tissues contain CD141^{hi} cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103⁺ nonlymphoid dendritic cells.** *Immunity* 37(1): 60-73.

Hemmi H., et al. (2000). **A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.** *Nature* 408(6813): 740-745.

Herlyn M. & Shih I. M. (1994). **Interactions of melanocytes and melanoma cells with the microenvironment.** *Pigment Cell Res* 7(2): 81-88.

Hickman H. D., et al. (2008). **Direct priming of antiviral CD8⁺ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes.** *Nat Immunol* 9(2): 155-165.

Hildner K., et al. (2008). **Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8 α ⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity.** *Science* 322(5904): 1097-1100.

Hjerten S. (1962). **"Molecular sieve" chromatography on polyacrylamide gels, prepared according to a simplified method.** *Arch Biochem Biophys* Suppl 1: 147-151.

Hollinshead M., et al. (1999). **Vaccinia virus intracellular mature virions contain only one lipid membrane.** *J Virol* 73(2): 1503-1517.

Hor J. L., et al. (2015). **Spatiotemporally Distinct Interactions with Dendritic Cell Subsets Facilitates CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Activation to Localized Viral Infection.** *Immunity* 43(3): 554-565.

Huang C. Y., et al. (2008). **A novel cellular protein, VPEF, facilitates vaccinia virus penetration into HeLa cells through fluid phase endocytosis.** *J Virol* 82(16): 7988-7999.

Huang Y. H., et al. (2012). **The structural basis for the sensing and binding of cyclic di-GMP by STING.** *Nat Struct Mol Biol* 19(7): 728-730.

Hwang S. Y., et al. (1995). **A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(24): 11284-11288.

Iborra S., et al. (2012). **The DC receptor DNGR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice.** *J Clin Invest* 122(5): 1628-1643.

Isaacs A. & Lindenmann J. (1957). **Virus interference. I. The interferon.** *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147(927): 258-267.

Ishikawa H. & Barber G. N. (2008). **STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling.** *Nature* 455(7213): 674-678.

Iwasaki A. & Medzhitov R. (2010). **Regulation of adaptive immunity by the innate immune system.** *Science* 327(5963): 291-295.

John B., et al. (2009). **Dynamic Imaging of CD8(+) T cells and dendritic cells during infection with Toxoplasma gondii.** *PLoS Pathog* 5(7): e1000505.

Joklik W. K. (1964a). **The Intracellular Uncoating of Poxvirus DNA. I. The Fate of Radioactively-Labeled Rabbitpox Virus.** *J Mol Biol* 8: 263-276.

Joklik W. K. (1964b). **The Intracellular Uncoating of Poxvirus DNA. II. The Molecular Basis of the Uncoating Process.** *J Mol Biol* 8: 277-288.

Joubert P. E. & Albert M. L. (2012). **Antigen Cross-Priming of Cell-Associated Proteins is Enhanced by Macroautophagy within the Antigen Donor Cell.** *Front Immunol* 3: 61.

Jung S., et al. (2002). **In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens.** *Immunity* 17(2): 211-220.

Kagi D., et al. (1994). **Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice.** *Nature* 369(6475): 31-37.

Kalia V., et al. (2010). **CD8 T-cell memory differentiation during acute and chronic viral infections.** *Adv Exp Med Biol* 684: 79-95.

Kalia V., et al. (2006). **Differentiation of memory B and T cells.** *Curr Opin Immunol* 18(3): 255-264.

Kalia V., et al. (2010). **Prolonged interleukin-2Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo.** *Immunity* 32(1): 91-103.

Kapulu M. C., et al. (2015). **Comparative assessment of transmission-blocking vaccine candidates against Plasmodium falciparum.** *Sci Rep* 5: 11193.

Katsafanas G. C. & Moss B. (2007). **Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions.** *Cell Host Microbe* 2(4): 221-228.

Kawai T. & Akira S. (2010). **The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.** *Nat Immunol* 11(5): 373-384.

Keck J. G., et al. (1990). **Role of DNA replication in vaccinia virus gene expression: a naked template is required for transcription of three late trans-activator genes.** *Cell* 61(5): 801-809.

Kerksiek K. M., et al. (2005). **Selective Rac1 inhibition in dendritic cells diminishes apoptotic cell uptake and cross-presentation in vivo.** *Blood* 105(2): 742-749.

Khatif H. (2017). **Regulation of autophagy upon vaccinia virus infection.** *Dissertation*.

Khyse-Andersen J. (1984). **Iectroblotting of Multiple Gels: A Simple Apparatus Without Buffer Tank for Rapid Transfer of Proteins from Polyacrylamide to Nitrocellulose.** *J. Biochem. Biophys. Methods* 10(2): 203-209.

Kitano M., et al. (2016). **Imaging of the cross-presenting dendritic cell subsets in the skin-draining lymph node.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(4): 1044-1049.

Konno H., et al. (2013). **Cyclic dinucleotides trigger ULK1 (ATG1) phosphorylation of STING to prevent sustained innate immune signaling.** *Cell* 155(3): 688-698.

Kovacsovics-Bankowski M., et al. (1993). **Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(11): 4942-4946.

Kovacsovics-Bankowski M. & Rock K. L. (1995). **A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules.** *Science* 267(5195): 243-246.

Kranzusch P. J., et al. (2013). **Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity.** *Cell Rep* 3(5): 1362-1368.

Krieg A. M. (2003). **CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?** *Nat Med* 9(7): 831-835.

Krug A., et al. (2004). **TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function.** *Immunity* 21(1): 107-119.

Krzewski K., et al. (2013). **LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity.** *Blood* 121(23): 4672-4683.

Latz E., et al. (2004). **TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome.** *Nat Immunol* 5(2): 190-198.

- Lei Y. & Takahama Y. (2012). **XCL1 and XCR1 in the immune system.** *Microbes Infect* 14(3): 262-267.
- Li X., et al. (2013). **Cyclic GMP-AMP synthase is activated by double-stranded DNA-induced oligomerization.** *Immunity* 39(6): 1019-1031.
- Lin Y. C. & Evans D. H. (2010). **Vaccinia virus particles mix inefficiently, and in a way that would restrict viral recombination, in coinfecting cells.** *J Virol* 84(5): 2432-2443.
- Lindquist R. L., et al. (2004). **Visualizing dendritic cell networks in vivo.** *Nat Immunol* 5(12): 1243-1250.
- Liu D., et al. (2009). **Integrin-dependent organization and bidirectional vesicular traffic at cytotoxic immune synapses.** *Immunity* 31(1): 99-109.
- Liu S., et al. (2015). **Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation.** *Science* 347(6227): aaa2630.
- Lorenzi S., et al. (2011). **Type I IFNs control antigen retention and survival of CD8alpha(+) dendritic cells after uptake of tumor apoptotic cells leading to cross-priming.** *J Immunol* 186(9): 5142-5150.
- Lutfalla G., et al. (1995). **Mutant U5A cells are complemented by an interferon-alpha beta receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster.** *EMBO J* 14(20): 5100-5108.
- Ma F., et al. (2015). **Positive feedback regulation of type I interferon by the interferon-stimulated gene STING.** *EMBO Rep* 16(2): 202-212.
- Mackett M., et al. (1982). **Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(23): 7415-7419.
- Man S. M., et al. (2015). **The transcription factor IRF1 and guanylate-binding proteins target activation of the AIM2 inflammasome by Francisella infection.** *Nat Immunol* 16(5): 467-475.
- Martinez-Campos C., et al. (2017). **Role of TLR9 in Oncogenic Virus-Produced Cancer.** *Viral Immunol* 30(2): 98-105.
- Matsudaira P. (1987). **Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes.** *J Biol Chem* 262(21): 10035-10038.

Mayr A. & Munz E. (1964). **[Changes in the vaccinia virus through continuing passages in chick embryo fibroblast cultures]**. *Zentralbl Bakteriol Orig* 195(1): 24-35.

Mayr A., et al. (1978). **[The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]**. *Zentralbl Bakteriol B* 167(5-6): 375-390.

McWhirter S. M., et al. (2009). **A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP**. *J Exp Med* 206(9): 1899-1911.

Medzhitov R. (2007). **Recognition of microorganisms and activation of the immune response**. *Nature* 449(7164): 819-826.

Medzhitov R. & Janeway C. A., Jr. (1997). **Innate immunity: impact on the adaptive immune response**. *Curr Opin Immunol* 9(1): 4-9.

Meisinger-Henschel C., et al. (2010). **Introduction of the six major genomic deletions of modified vaccinia virus Ankara (MVA) into the parental vaccinia virus is not sufficient to reproduce an MVA-like phenotype in cell culture and in mice**. *J Virol* 84(19): 9907-9919.

Mercer J. & Helenius A. (2008). **Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells**. *Science* 320(5875): 531-535.

Mercer J., et al. (2012). **RNAi screening reveals proteasome- and Cullin3-dependent stages in vaccinia virus infection**. *Cell Rep* 2(4): 1036-1047.

Mescher M. F., et al. (2006). **Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells**. *Immunol Rev* 211: 81-92.

Meyer H., et al. (1991). **Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence**. *J Gen Virol* 72 (Pt 5): 1031-1038.

Miyanishi M., et al. (2007). **Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor**. *Nature* 450(7168): 435-439.

Moss B. (2007). **Poxviridae: the viruses and their replication**. *Fields of Virology* 2: 2905-2946.

Mossman K., et al. (1995). **The myxoma virus-soluble interferon-gamma receptor homolog, M-T7, inhibits interferon-gamma in a species-specific manner**. *J Biol Chem* 270(7): 3031-3038.

Mount A. M., et al. (2008). **Multiple dendritic cell populations activate CD4+ T cells after viral stimulation.** *PLoS One* 3(2): e1691.

Munseri P. J., et al. (2015). **Priming with a simplified intradermal HIV-1 DNA vaccine regimen followed by boosting with recombinant HIV-1 MVA vaccine is safe and immunogenic: a phase IIa randomized clinical trial.** *PLoS One* 10(4): e0119629.

Nakayama M., et al. (2009). **Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation.** *Blood* 113(16): 3821-3830.

Neefjes J., et al. (2011). **Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation.** *Nat Rev Immunol* 11(12): 823-836.

Neijssen J., et al. (2005). **Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions.** *Nature* 434(7029): 83-88.

Nierkens S., et al. (2013). **Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants?** *Trends Immunol* 34(8): 361-370.

Nilsson C., et al. (2015). **HIV-DNA Given with or without Intradermal Electroporation Is Safe and Highly Immunogenic in Healthy Swedish HIV-1 DNA/MVA Vaccinees: A Phase I Randomized Trial.** *PLoS One* 10(6): e0131748.

Norbury C. C., et al. (2004). **CD8+ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates.** *Science* 304(5675): 1318-1321.

Norbury C. C., et al. (1995). **Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages.** *Immunity* 3(6): 783-791.

O'Neill L. A. (2013). **Immunology. Sensing the dark side of DNA.** *Science* 339(6121): 763-764.

Obar J. J., et al. (2011). **Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8+ T cell differentiation.** *J Immunol* 187(10): 4967-4978.

Ouyang S., et al. (2012). **Structural analysis of the STING adaptor protein reveals a hydrophobic dimer interface and mode of cyclic di-GMP binding.** *Immunity* 36(6): 1073-1086.

Palmowski M. J., et al. (2006). **Role of immunoproteasomes in cross-presentation.** *J Immunol* 177(2): 983-990.

Panicali D. & Paoletti E. (1982). **Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(16): 4927-4931.

Parish I. A. & Kaech S. M. (2009). **Diversity in CD8(+) T cell differentiation.** *Curr Opin Immunol* 21(3): 291-297.

Pascutti M. F., et al. (2011). **Interplay between modified vaccinia virus Ankara and dendritic cells: phenotypic and functional maturation of bystander dendritic cells.** *J Virol* 85(11): 5532-5545.

Payne L. G. & Kristensson K. (1985). **Extracellular release of enveloped vaccinia virus from mouse nasal epithelial cells in vivo.** *J Gen Virol* 66 (Pt 3): 643-646.

Peaper D. R. & Cresswell P. (2008). **Regulation of MHC class I assembly and peptide binding.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 343-368.

Pestka S., et al. (2004). **Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors.** *Immunol Rev* 202: 8-32.

Pettengill M. A., et al. (2014). **Soluble mediators regulating immunity in early life.** *Front Immunol* 5: 457.

Pfeifer J. D., et al. (1993). **Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells.** *Nature* 361(6410): 359-362.

Pipkin M. E., et al. (2010). **Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells.** *Immunity* 32(1): 79-90.

Pooley J. L., et al. (2001). **Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells.** *J Immunol* 166(9): 5327-5330.

Poon I. K., et al. (2014). **Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential.** *Nat Rev Immunol* 14(3): 166-180.

Putz M. M., et al. (2006). **Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination.** *Nat Med* 12(11): 1310-1315.

Ragimbeau J., et al. (2003). **The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression.** *EMBO J* 22(3): 537-547.

Rasmussen S. B., et al. (2011). **Activation of autophagy by alpha-herpesviruses in myeloid cells is mediated by cytoplasmic viral DNA through a mechanism dependent on stimulator of IFN genes.** *J Immunol* 187(10): 5268-5276.

Rock K. L., et al. (1990). **Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules.** *Science* 249(4971): 918-921.

Rosel J. L., et al. (1986). **Conserved TAAATG sequence at the transcriptional and translational initiation sites of vaccinia virus late genes deduced by structural and functional analysis of the HindIII H genome fragment.** *J Virol* 60(2): 436-449.

Ross P., et al. (1987). **Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid.** *Nature* 325(6101): 279-281.

Russ B. E., et al. (2013). **T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation.** *Front Genet* 4: 218.

Rutz M., et al. (2004). **Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner.** *Eur J Immunol* 34(9): 2541-2550.

Saitoh T., et al. (2009). **Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(49): 20842-20846.

Samie M. & Cresswell P. (2015). **The transcription factor TFEB acts as a molecular switch that regulates exogenous antigen-presentation pathways.** *Nat Immunol* 16(7): 729-736.

Sanderson C. M., et al. (2000). **The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles.** *J Gen Virol* 81(Pt 1): 47-58.

Sanz P. & Moss B. (1999). **Identification of a transcription factor, encoded by two vaccinia virus early genes, that regulates the intermediate stage of viral gene expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6): 2692-2697.

Sarkar S., et al. (2008). **Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates.** *J Exp Med* 205(3): 625-640.

Satheshkumar P. S., et al. (2009). **Inhibition of the ubiquitin-proteasome system prevents vaccinia virus DNA replication and expression of intermediate and late genes.** *J Virol* 83(6): 2469-2479.

- Schatz D. G. & Swanson P. C. (2011). **V(D)J recombination: mechanisms of initiation.** *Annu Rev Genet* 45: 167-202.
- Schiavoni G., et al. (2013). **Type I Interferons as Stimulators of DC-Mediated Cross-Priming: Impact on Anti-Tumor Response.** *Front Immunol* 4: 483.
- Schmidt F. I., et al. (2011). **Vaccinia extracellular virions enter cells by macropinocytosis and acid-activated membrane rupture.** *EMBO J* 30(17): 3647-3661.
- Schmidt F. I., et al. (2012). **Poxvirus host cell entry.** *Curr Opin Virol* 2(1): 20-27.
- Schramm B., et al. (2006). **Vaccinia-virus-induced cellular contractility facilitates the subcellular localization of the viral replication sites.** *Traffic* 7(10): 1352-1367.
- Schreibelt G., et al. (2012). **The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells.** *Blood* 119(10): 2284-2292.
- Schulz O., et al. (2002). **CD36 or alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins are not essential for MHC class I cross-presentation of cell-associated antigen by CD8 alpha+ murine dendritic cells.** *J Immunol* 168(12): 6057-6065.
- Segura E., et al. (2013). **Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells.** *J Exp Med* 210(5): 1035-1047.
- Semmling V., et al. (2010). **Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs.** *Nat Immunol* 11(4): 313-320.
- Serna A., et al. (2003). **Cutting edge: efficient MHC class I cross-presentation during early vaccinia infection requires the transfer of proteasomal intermediates between antigen donor and presenting cells.** *J Immunol* 171(11): 5668-5672.
- Shang G., et al. (2012). **Crystal structures of STING protein reveal basis for recognition of cyclic di-GMP.** *Nat Struct Mol Biol* 19(7): 725-727.
- Sheehan S., et al. (2015). **A Phase I, Open-Label Trial, Evaluating the Safety and Immunogenicity of Candidate Tuberculosis Vaccines AERAS-402 and MVA85A, Administered by Prime-Boost Regime in BCG-Vaccinated Healthy Adults.** *PLoS One* 10(11): e0141687.
- Shen Z., et al. (1997). **Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules.** *J Immunol* 158(6): 2723-2730.

- Shu C., et al. (2012). **Structure of STING bound to cyclic di-GMP reveals the mechanism of cyclic dinucleotide recognition by the immune system.** *Nat Struct Mol Biol* 19(7): 722-724.
- Spadaro F., et al. (2012). **IFN-alpha enhances cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing.** *Blood* 119(6): 1407-1417.
- Staib C., et al. (2004). **Construction and isolation of recombinant MVA.** *Methods Mol Biol* 269: 77-100.
- Stetson D. B. & Medzhitov R. (2006). **Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response.** *Immunity* 24(1): 93-103.
- Stickl H., et al. (1974). **[MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA) (author's transl)].** *Dtsch Med Wochenschr* 99(47): 2386-2392.
- Subramanian M., et al. (2014). **An AXL/LRP-1/RANBP9 complex mediates DC efferocytosis and antigen cross-presentation in vivo.** *J Clin Invest* 124(3): 1296-1308.
- Sui H., et al. (2017). **STING is an essential mediator of the Ku70-mediated production of IFN-lambda1 in response to exogenous DNA.** *Sci Signal* 10(488).
- Sun L., et al. (2013). **Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway.** *Science* 339(6121): 786-791.
- Sutter G. & Moss B. (1992). **Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22): 10847-10851.
- Takeuchi O. & Akira S. (2010). **Pattern recognition receptors and inflammation.** *Cell* 140(6): 805-820.
- Tapia M. D., et al. (2016). **Use of ChAd3-EBO-Z Ebola virus vaccine in Malian and US adults, and boosting of Malian adults with MVA-BN-Filo: a phase 1, single-blind, randomised trial, a phase 1b, open-label and double-blind, dose-escalation trial, and a nested, randomised, double-blind, placebo-controlled trial.** *Lancet Infect Dis* 16(1): 31-42.
- Tartaglia J., et al. (1992). **Highly attenuated poxvirus vectors.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 8(8): 1445-1447.
- Teale A., et al. (2009). **Orthopoxviruses require a functional ubiquitin-proteasome system for productive replication.** *J Virol* 83(5): 2099-2108.

- Tel J., et al. (2013). **Targeting uptake receptors on human plasmacytoid dendritic cells triggers antigen cross-presentation and robust type I IFN secretion.** *J Immunol* 191(10): 5005-5012.
- Thiel M., et al. (2010). **Efficiency of T-cell costimulation by CD80 and CD86 cross-linking correlates with calcium entry.** *Immunology* 129(1): 28-40.
- Toda S., et al. (2012). **Two-step engulfment of apoptotic cells.** *Mol Cell Biol* 32(1): 118-125.
- Tolonen N., et al. (2001). **Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei.** *Mol Biol Cell* 12(7): 2031-2046.
- Tonegawa S. (1983). **Somatic generation of antibody diversity.** *Nature* 302(5909): 575-581.
- 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): 959-968.
- Trilling M., et al. (2009). **Gamma interferon-induced interferon regulatory factor 1-dependent antiviral response inhibits vaccinia virus replication in mouse but not human fibroblasts.** *J Virol* 83(8): 3684-3695.
- Turner M. D., et al. (2014). **Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease.** *Biochim Biophys Acta* 1843(11): 2563-2582.
- van Hateren A., et al. (2017). **Recent advances in Major Histocompatibility Complex (MHC) class I antigen presentation: Plastic MHC molecules and TAPBPR-mediated quality control.** *F1000Res* 6: 158.
- Vos J. C. & Stunnenberg H. G. (1988). **Derepression of a novel class of vaccinia virus genes upon DNA replication.** *EMBO J* 7(11): 3487-3492.
- Wagner H. (2001). **Toll meets bacterial CpG-DNA.** *Immunity* 14(5): 499-502.
- Waibler Z., et al. (2007). **Modified vaccinia virus Ankara induces Toll-like receptor-independent type I interferon responses.** *J Virol* 81(22): 12102-12110.
- Wang J., et al. (2014). **The cross-priming capacity and direct presentation potential of an autoantigen are separable and inversely related properties.** *J Immunol* 193(7): 3296-3307.
- Welsh R. M., et al. (2012). **Type 1 interferons and antiviral CD8 T-cell responses.** *PLoS Pathog* 8(1): e1002352.

Wittek R., et al. (1980). **Expression of the vaccinia virus genome: analysis and mapping of mRNAs encoded within the inverted terminal repetition.** *Cell* 21(2): 487-493.

Wittek R. & Moss B. (1980). **Tandem repeats within the inverted terminal repetition of vaccinia virus DNA.** *Cell* 21(1): 277-284.

Wolint P., et al. (2004). **Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8+ T cells.** *J Exp Med* 199(7): 925-936.

Wu J., et al. (2013). **Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA.** *Science* 339(6121): 826-830.

Wu X., et al. (2014). **Molecular evolutionary and structural analysis of the cytosolic DNA sensor cGAS and STING.** *Nucleic Acids Res* 42(13): 8243-8257.

Yang Z., et al. (2013). **Cascade regulation of vaccinia virus gene expression is modulated by multistage promoters.** *Virology* 447(1-2): 213-220.

Yang Z. & Moss B. (2009). **Interaction of the vaccinia virus RNA polymerase-associated 94-kilodalton protein with the early transcription factor.** *J Virol* 83(23): 12018-12026.

Yi G., et al. (2013). **Single nucleotide polymorphisms of human STING can affect innate immune response to cyclic dinucleotides.** *PLoS One* 8(10): e77846.

Yuan M., et al. (2015). **Efficiently editing the vaccinia virus genome by using the CRISPR-Cas9 system.** *J Virol* 89(9): 5176-5179.

Zhang X., et al. (2013). **Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING.** *Mol Cell* 51(2): 226-235.

Zhang X., et al. (2014). **The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop.** *Cell Rep* 6(3): 421-430.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass der von mir vorgelegte Forschungsbericht

Role of innate immune triggers for the induction of poxviral T cell responses

von mir selbstständig verfasst und nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt wurde. Ich versichere, keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt zu haben sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche gekennzeichnet zu haben.

Ort, Datum

Unterschrift