

Aus dem Institut für Virologie der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Leiter: Univ.-Prof. Dr. Jörg Timm

**Charakterisierung MHC Klasse II-restringierter  
Prozessierungs- und Präsentationswege von MVA-  
produzierten Antigenen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Patricia Manuela Kamolz

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Ingo Drexler

Zweitgutachter: Prof. Dr. Walter Däubener

## Zusammenfassung

Bei Infektionskrankheiten und bei der Immuntherapie von Tumoren sind Impfstoffe auf Basis von rekombinanten MVA als Vektorvakzine in klinischer Erprobung. Neben den CD8<sup>+</sup> T-Zellen kommt den CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der Immunantwort eine besondere Bedeutung zu. Etwa 20% der Peptide, die über MHC Klasse II Komplexe an CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert werden, stammen aus intrazellulären Quellen. Verschiedene Studien ließen den Schluss zu, dass dies auf Autophagie zurückzuführen sein könnte.

Da bisher nicht genau bekannt ist, wie pockenvirale Antigene prozessiert werden müssen, um effizient CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren, wurde im Folgenden versucht, die MHC Klasse II restringierten Prozessierungs- und Präsentationswege von MVA-produzierten Antigenen näher zu charakterisieren. Hierfür koppelten wir das Modelantigen Ovalbumin, dessen Sekretionssequenz entfernt wurde, an das autophagosomal-assoziierte Membranprotein LC3-II. Das entstandene Fusionsgen wurde in das Genom (Deletion VI) von MVA integriert, so dass das Virus MVA-nsOVA/LC3\_P11 entstand. Wir erhofften uns, das Fusionsprotein über Autophagie gezielt in den MHC Klasse II Präsentationsweg einschleusen zu können.

Wir konnten zeigen, dass das Fusionsgen nsOVA/LC3 erfolgreich in das Genom von MVA eingefügt werden konnte. Des Weiteren wurde das Fusionsprotein nicht sekretiert; allerdings war die gebildete Proteinmenge sehr gering und die Proteinproduktion verspätet. Unsere Analysen zeigten, dass dieser Umstand wahrscheinlich zum einen auf die Entfernung der Sekretionssequenz und zum anderen auf die Eigenschaften des späten Promotor P11 zurückzuführen ist. Sowohl Proteasom- als auch Autophagieinhibitoren führten zu einer Abnahme der gebildeten Proteinmenge. Beide Abbauewege könnten daher für die MHC Klasse II Präsentation relevant sein. Teilweise gelang der Nachweis einer Integration des Fusionsproteins in eine membranöse Struktur. Hinsichtlich der Aktivierung von OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte MVA-nsOVA/LC3\_P11 gegenüber dem Kontrollvirus MVA-nsOVA\_P11 keine signifikanten Vorteile. Insgesamt zeigten die OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine nur geringe Aktivität. Hierbei konnten sowohl eine nicht adäquate Infektion der APZs sowie ein Versagen der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen als ursächlich ausgeschlossen werden. Der Nachweis der Kolo-kalisierung zwischen LC3 und Ovalbumin in der Konfokalmikroskopie gestaltete sich schwierig.

Letztendlich muss diskutiert werden, ob die ausbleibende CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung auf das Viruskonstrukt an sich selbst zurückzuführen ist oder ob MVA alternative Wege der Autophagie verwendet, die unabhängig von der Bildung von Autophagosomen sind.

## Summary

Vaccines based on modified vaccinia virus Ankara (MVA) are in clinical testing as vector vaccines for therapy of infectious diseases and immunotherapy of cancer. For protective immune responses both, CD 8<sup>+</sup> T-cells as well as CD 4<sup>+</sup> T-cells are considered relevant. Nearly 20% of the peptides which are presented by MHC class II complexes to CD 4<sup>+</sup> T-cells are derived from intracellular sources. Several studies concluded that this may be traced back to autophagy. It is not known exactly by which antigen processing routes poxviral antigens have to be processed in order to activate CD4<sup>+</sup> T-cells efficiently. This is the reason why we tried to characterize known MHC II-restricted processing and presentation pathways for MVA-delivered antigens. For this purpose we removed the secretory sequence from the model antigen ovalbumin and linked it to LC3-II, which is an essential autophagosome-associated membraneprotein. Afterwards, we integrated an expression cassette encoding this recombinant fusion gene into the genome (deletion VI) of MVA resulting in the recombinant virus MVA-nsOVA/LC3\_P11. By this method we expected to target viral antigens directly to the autophagy-mediated pathway of MHC II class loading.

We were able to show that the fusion gene was successfully integrated into the genome of MVA. As expected, the fusion protein was not secreted but the amount of protein was very low and the production started with a marked delay. Our studies showed this was not only due to the removal of the secretory sequence potentially leading to instability but also because of the characteristics of the late promoter P11. Both, proteasome inhibitors and autophagy inhibitors resulted in a reduced amount of protein. Therefore, we drew the conclusion that both pathways might be important for MHC class II presentation. The integration of nsOVA into a membranous structure by LC3-II was inconsistently detectable – depending on the cell type. Regarding the activation of OVA-specific CD4<sup>+</sup> T-cells, we saw no significant difference between MVA-nsOVA/LC3\_P11 and the control virus MVA-nsOVA\_P11. It should be mentioned that after infection with both viruses the activity of the OVA specific CD4<sup>+</sup> T-cells was unexpectedly low. Both, inadequate infection of the APCs and malfunction of OVA-specific CD4<sup>+</sup> T-cells could be excluded as a reason for this problem. Moreover it was very difficult to see colocalisation between LC3 and OVA by confocal microscopy.

Taken together, it is still an open question if the missing activation of CD4<sup>+</sup> T-cells was caused by the low recombinant target gene expression or if MVA takes alternative autophagic pathways which are independent of autophagosomes or the lipidation of LC3. In order to answer this question further studies will be necessary.

## Abkürzungsverzeichnis:

μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
3-MA	3-Methyladenin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AMPK	AMP aktivierte Proteinkinase
APC	Allophycocyanin
APZ(s)	Antigen präsentierende Zelle(n)
AraC	Arabinosid C
Atg	<i>autophagy-related gene</i>
BFA	Brefeldin A
BMDC	Knochenmark-abgeleitete Dendritische Zelle
BSA	Rinderserumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CEF	<i>chicken embryo fibroblast</i> (Hühnerfibroblasten)
CVA	<i>chorioallantosis vaccinia virus Ankara</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	<i>Ethidium monoazide bromide</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszein 5-Isothiocyanat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-2	Interleukin-2
Kb(p)	Kilobasen(paar)
kDa	Kilodalton
LC3	<i>microtubule-associated protein light chain 3</i>

LIR	<i>LC3-interacting region</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIIC	MHC Klasse II Kompartiment
Min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimol
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
M	Mol
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
MVA	<i>Modified vaccinia virus Ankara</i>
nM	Nanomol
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salinelösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PO	Peroxidase
PRR	Mustererkennungszepetor
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns3KC3 oder PI3K	<i>autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex</i>
PtdIns(3)P oder PI3P	Phosphatidylinositol 3-Phosphat
RAPTOR	<i>regulatory-associated protein of TOR</i>
RFV	<i>Rabbit fibroma virus</i>
RPMI-Medium	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline</i>
TCGF	T-Zell-Wachstumsfaktor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TZR	T-Zell Rezeptor
UBD	Ubiquitin-Bindungs-Domäne
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VACV	Vaccinia Virus
WIPI	<i>WD-repeat protein interacting with phosphoinosides</i>
wt	Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Vaccinia Virus</i> .....	1
1.2 <i>Autophagie</i> .....	2
1.2.1 Die Bedeutung der Autophagie für den Organismus.....	2
1.2.2 Ubiquitin-Proteasom-System vs. Autophagie.....	3
1.2.3 Autophagie – Eine komplexe Signalkaskade.....	3
1.2.4 Autophagie und Viren.....	10
1.3 <i>Das Immunsystem</i> .....	11
1.3.1 Die angeborene Immunität.....	11
1.3.2 Die erworbene Immunität.....	12
1.3.3 T-Zellen.....	12
1.3.4 MHC Moleküle.....	13
1.3.5 MHC Klasse II Präsentation.....	14
1.4 <i>Ziele der Arbeit</i> .....	14
<b>2 Material.....</b>	<b>16</b>
2.1 <i>Chemikalien</i> .....	16
2.2 <i>Puffer und Lösungen</i> .....	17
2.3 <i>Verbrauchsmaterial</i> .....	18
2.4 <i>Zellkulturmedien</i> .....	19
2.5 <i>Antikörper</i> .....	20
2.5.1 Western Blot (WB)/ Konfokales Mikroskop (KM).....	20
2.5.2 FACS.....	20
2.5.3 Konfokales Mikroskop.....	21
2.6 <i>Fluoreszierende Farbstoffe</i> .....	21
2.7 <i>Kits</i> .....	21
2.8 <i>Software</i> .....	21
2.9 <i>Zelllinien</i> .....	22
2.10 <i>Mäuse</i> .....	23
2.11 <i>Peptide</i> .....	23
2.12 <i>Laborequipment</i> .....	23
2.13 <i>Primersequenzen</i> .....	25
2.14 <i>Viren</i> .....	25
2.15 <i>Statistik</i> .....	26
<b>3 Methoden.....</b>	<b>27</b>
3.1 <i>Zellkultur</i> .....	27
3.1.1 Kultivierung von Zellen.....	27
3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	27
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl.....	27

3.1.4 Herstellung von BMDCs .....	28
3.2 <i>Virologische Methoden</i> .....	28
3.2.1 Infektion von Zellen .....	28
3.2.1.1 Adhärente Zellen .....	28
3.2.1.2 Semiadhärente Zellen .....	29
3.2.2 Amplifikation der Viren.....	29
3.2.2.1 Herstellung der <i>Crude Stocks</i> .....	29
3.2.2.2 Virusaufreinigung.....	29
3.2.3 Virustitration.....	30
3.2.4 Wachstumskurve (One step growth curve):.....	30
3.3 <i>Immunologische Methoden</i> .....	31
3.3.1 PCR.....	31
3.3.1.1 Virale DNA Extraktion von infizierten Zellen .....	31
3.3.1.2 Durchführung der PCR.....	31
3.3.1.3 Auftrennung der DNA-Fragmente im 1% Agarose TBE-Gel .....	32
3.3.2 Western Blots: .....	32
3.3.2.1 Herstellung der Zelllysate.....	32
3.3.2.2 Proteinauftrennung und -transfer auf die Membran.....	32
3.3.2.3 Inkubation mit Antikörpern: .....	34
3.3.3 Restimulation von T-Zellen .....	34
3.3.4 Peptidstimulation von T-Zellen im Versuch.....	35
3.3.5 T-Zellstimulation mit infizierten APC .....	35
3.3.6 Intrazelluläre Zytokinfärbung .....	36
3.3.7 Konfokale Mikroskopie .....	36
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
4.1 <i>Charakterisierung der MVA Viren</i> .....	38
4.1.1 Nachweis des Fusionsgens in Deletion VI.....	38
4.1.2 Ermittlung der Virustiter.....	39
4.1.3 Vergleichbares Wachstum von MVA-nsOVA/LC3_P11 und MVA-nsOVA_P11 .....	39
4.1.4 Proteinnachweis mit Hilfe der Western Blot Analyse .....	40
4.1.4.1 nsOVA/LC3 und nsOVA werden nicht sezerniert .....	40
4.1.4.2 nsOVA/LC3 und nsOVA werden in der Zelle synthetisiert .....	41
4.1.4.3 Die Synthese von nsOVA/LC3 und nsOVA wird - wie erwartet - von dem späten Promotor P11 kontrolliert.....	43
4.1.4.4 nsOVA/LC3 wird im Rahmen der Autophagie partiell in eine membranöse Struktur integriert; Autophagieinhibitoren zeigen eine ungenügende Wirksamkeit .....	44
4.2 <i>Aktivitätsnachweis von T-Zellen durch Zytokinproduktion</i> .....	47
4.2.1 Die Funktionalität der T-Zellen ist nicht eingeschränkt .....	47
4.2.2 Bafilomycin A1 führt zu einer stark reduzierten OVA-spezifischen CD4 <sup>+</sup> T-Zell Antwort.....	48
4.2.3 Weder Wortmannin noch 3-MA zeigen einen statistisch signifikanten Einfluss auf die OVA-spezifische CD4 <sup>+</sup> T-Zell Antwort.....	51
4.2.3.1 Wortmannin führt nicht zu einer signifikanten Reduktion der OVA-spezifischen CD4 <sup>+</sup> T-Zell Antwort .....	52
4.2.3.2 3-MA führt nicht zu einer signifikanten Reduktion der OVA-spezifischen CD4 <sup>+</sup> T-Zell Antwort .....	53
4.2.4 MRT67307 führt zu einer signifikanten Reduktion der CD4 <sup>+</sup> T-Zell Antwort.....	55
4.3 <i>Proteinnachweis mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie</i> .....	57
4.3.1 Hintergrund und Aufbau des Versuchs .....	57

4.3.2 Geringe Kollokalisierung zwischen LC3 und nsOVA nach Infektion mit MVA-nsOVA/LC3_P11 und starkes Auswaschen der Proteine mit Saponin .....	60
4.3.3 Nahezu keine Kollokalisierung zwischen LC3 und nsOVA nach Infektion von HeLa-Zellen mit MVA-nsOVA_P11 .....	61
4.3.4 Keine unspezifische Bindung des OVA-Antikörpers .....	62
4.3.5 Starke Kollokalisierung zwischen dsRed-LC3 und endogenem LC3, jedoch nicht zwischen LC3 und nsOVA .....	62
<b>5 Diskussion: .....</b>	<b>65</b>
5.1 Ziele und Ergebnisse .....	65
5.2 Western Blots .....	65
5.2.1 Die Entfernung der Sekretionssequenz und der Promotor P11 führen zu einer schwachen und späten Expression von nsOVA/LC3 und nsOVA .....	65
5.2.2 Proteasominhibitoren führen zu einer abgeschwächten Proteinbiosynthese aufgrund einer Blockade der viralen DNA-Replikation und einer kompensatorischen Aktivierung der Autophagie .....	66
5.2.3 Späte Autophagieinhibitoren führen ebenfalls zu einem relevanten Proteinverlust.....	68
5.2.4 nsOVA/LC3 wird nur selten in eine membranöse Struktur integriert.....	69
5.3 T-Zell Versuche: .....	70
5.3.1 Sowohl Eigenschaften des viralen Vektorkonstrukts als auch alternative Wege der Autophagie können für die ausbleibende OVA-spezifische CD4 <sup>+</sup> T-Zellaktivierung verantwortlich sein .....	70
5.3.2 Neben Autophagie sind die späten lysosomalen und endosomalen Kompartimente für die MHC Klasse II Präsentation relevant .....	73
5.3.3 Autophagieinhibitoren der frühen Phase der Autophagie zeigen eine relevante und spezifische Wirkung .....	75
5.4 Unterschiedliche Lokalisation von nsOVA/LC3 und zellulärem LC3 in der konfokalen Mikroskopie .....	77
5.5 Mögliche Wege der alternativen Autophagie .....	81
5.6 Schlussfolgerung und Ausblick: .....	83

# 1 Einleitung

## 1.1 Vaccinia Virus

Das Vaccinia Virus gehört der Virusfamilie der Pockenviren an und ist hier der Gattung der Orthopockenviren zugehörig. Pockenviren sind lineare, doppelsträngige DNA-Viren mit einer Genomgröße von 130 bis 230 kbps (Kilobasenpaare), welche für ca. 200 Proteine codiert (1).

Pockenviren sind in gewisser Hinsicht besondere DNA-Viren, da sie sich ausschließlich im Zytoplasma, in so genannten Virusfabriken (*viral factories*) replizieren (2). Diese Virusfabriken können bereits zwei Stunden nach der Infektion fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden (1). Sie formen sich während der intermediären und späten Gentranskription und sind die Stelle, an der frühe Vaccinia Virus Proteine akkumulieren (3, 4). Erst mit dem Beginn der Virusmorphogenese lösen sie sich wieder auf. Die Transkription der Gene von Vaccinia Virus wird kaskadenartig reguliert (5) und kann in drei zeitlich koordinierte Phasen unterteilt werden: *early* (früh), *intermediate* (intermediär) und *late* (spät) (6).

Nach der Aufnahme des Viruspartikels in die Wirtszelle beginnt die Transkription der frühen viralen Gene in mRNAs (2). Zu den daraus entstehenden Genprodukten gehören Proteine, die sowohl an der Replikation als auch an der Virus-Wirt-Interaktion beteiligt sind, aber auch metabolische Enzyme sowie Faktoren, die die Gentranskription der darauffolgenden Phase regulieren. Außerdem werden in dieser frühen Phase des Replikationszyklus die DNA-, RNA- und Proteinsynthese der Wirtszelle abgeschaltet sowie die antivirale Abwehr des Wirtes blockiert (7). Die Enzyme und Faktoren, welche der frühen Transkriptionsmaschinerie zugeordnet werden, befinden sich im Kapsid (*Core*) der infektiösen Viruspartikel (2), welches somit die frühe Genexpression im Virion erlaubt (8, 9). Erst danach wird die DNA aus der Kapsidhülle freigesetzt (*Uncoating*), wobei dieser Prozess auf die Produkte der frühen viralen Proteinsynthese angewiesen ist (10).

Es sind vergleichsweise wenige intermediäre virale Gene bekannt; die meisten von ihnen sind durch die Produktion von späten Transkriptionsfaktoren in die Regulation der späten Gene involviert (7).

Die späten viralen Gene sind am Zusammenbau der infektiösen neuen Viruspartikel beteiligt (Virusassemblierung). Außerdem werden durch sie Enzyme in das Viron verbracht, welche die frühe Genexpression in einer erneuten Infektionsrunde initiieren (2). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *Modified vaccinia virus Ankara* (MVA) handelt es sich um ein attenuiertes Virus. Es wurde vom „*chorioallantosis vaccinia virus Ankara*“ (CVA) durch mehr als 570 serielle Passagen auf Hühnerembryofibroblasten (*chicken embryo fibroblast*)

abgeleitet (11, 12). MVA hat ca. 31 kb (Kilobasen) seines ursprünglichen Genoms verloren. Dadurch sind sechs große Deletionsstellen entstanden, die 24 der 31 kb umfassen (13-16). Dies führte unter anderem dazu, dass es zu einer Blockade beim Zusammenbau der Viruspartikel kommt (17). Durch die Bildung von unreifen Vironen kann sich das Virus in den meisten Säugetierzellen nicht mehr oder nur bis zu einem bestimmten Punkt innerhalb des Replikationszyklus vermehren (abortive Infektion) und ist dadurch für den Menschen sehr sicher im Umgang. In die Deletionsstellen kann fremde DNA eingeführt und mit entsprechenden Promotoren ausgestattet anschließend exprimiert werden. Dies bietet den Vorteil, dass MVA trotz der abortiven Infektion effektiv alle viralen Genklassen exprimieren kann.

Da dieser attenuierte Virusstamm eine geringe Virulenz, aber hohe Expressionslevel von rekombinanten Fremdgenen aufweist, handelt es sich hier um einen idealen Vektor für sowohl prophylaktische als auch therapeutische Impfstrategien. MVA wird daher intensiv als Vektor für die rekombinante Genexpression und in diesem Zuge als Vakzine für immunologische Studien genutzt (18).

## 1.2 Autophagie

### 1.2.1 Die Bedeutung der Autophagie für den Organismus

Bei Autophagie handelt es sich um einen intrazellulären lysosomalen Abbauprozess. Es gibt zwei Arten der Autophagie: Die basale Autophagie, welche durchgehend auf einem niedrigen Level aktiv ist. Sie wird für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und Entwicklung benötigt. Dies gelingt durch die Vermeidung der Akkumulation von potentiell toxischen Substanzen, die als Resultat der normalen zellulären Funktion entstehen. Andererseits kann Autophagie durch Hunger oder Stress (Hypoxie, Genotoxizität, ER-Stress) (19) sowie durch Immunmediatoren (wie Zytokine), bei Infektionen (20) oder bei der Anwesenheit von mikrobiellen Produkten, die über PRRs (Mustererkennungsrezeptor) erkannt werden (21, 22), gezielt induziert bzw. verstärkt werden (23-28). Hier kann sie auch zur Antigenpräsentation und damit zur angeborenen und erworbenen Immunantwort beitragen (29).

In letzter Zeit konnte zunehmend ein Zusammenhang zwischen dysfunktionaler Autophagie und verschiedenen Erkrankungen, vor allem neurodegenerativen – wie M. Parkinson und M. Alzheimer - (30-33), aber auch M. Crohn (34, 35) hergestellt werden. Darüber hinaus sind pulmonale (36), kardiologische (37), metabolische (38), rheumatische (39), infektiöse und Autoimmunerkrankungen (40) mit einer Störung der Autophagie assoziiert. Ferner konnte

eine Parallele zwischen Autophagie und Alterung entdeckt werden (41-43). Außerdem spielt Autophagie bei Krebserkrankungen eine Rolle, wobei diese sowohl Tumoren unterdrücken als auch fördern kann (44, 45). Darüber hinaus können die an Autophagie beteiligten Gene als Tumorsuppressor agieren. Dies wurde am Beispiel von Beclin 1 nachgewiesen (46, 47).

Positive Auswirkungen der Autophagie wurden auch im Rahmen der Tuberkulose entdeckt. So konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Autophagie das intrazelluläre Überleben von Mykobakterien supprimiert (48).

### 1.2.2 Ubiquitin-Proteasom-System vs. Autophagie

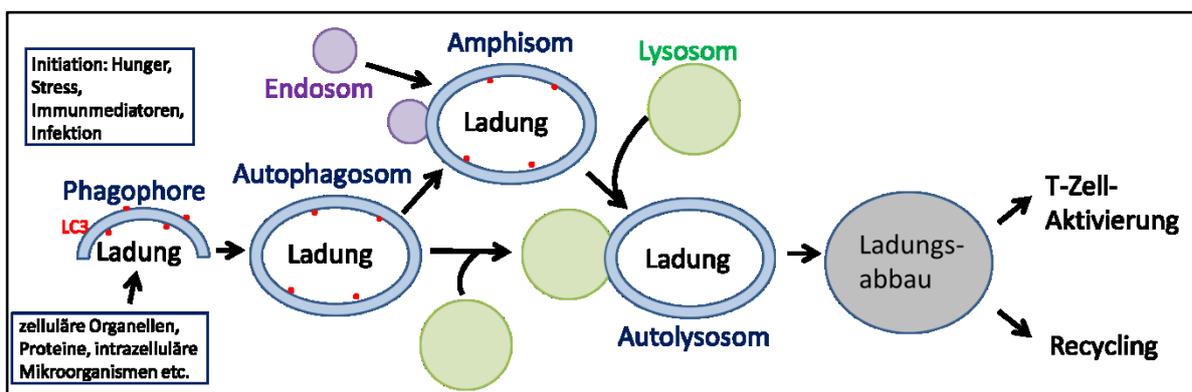
Die beiden prominenten Abbauwege von zellulären Proteinen in eukaryontischen Zellen sind das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) (ca. 80-90% der Proteine) und Autophagie. Das Proteasom baut eher lösliche, kurzlebige, abnormale, denaturierte, geschädigte, zytoplasmatische und regulatorische Proteine ab, die mittels Ubiquitinierung markiert wurden (Präsentation vorrangig über MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex) Klasse I an zytosolische CD8<sup>+</sup> T-Zellen). Autophagie zielt eher auf Zellorganellen (wie Mitochondrien, Peroxisomen, Ribosomen etc.) und Aggregate von langlebigen extrazellulären Proteinen ab (die über Endozytose aufgenommen wurden) sowie auf infektiöse Organismen (49) (Präsentation vorrangig über MHC Klasse II an CD4<sup>+</sup> T-Zellen) (50, 51). Auch intrazelluläre Mikroorganismen können durch Autophagie direkt eliminiert werden. Zusätzlich fördert die Fusion der Endosomen mit den Lysosomen die MHC Klasse II Präsentation. Damit leistet Autophagie einen Beitrag zur angeborenen und erworbenen Immunität. Es sollte allerdings beachtet werden, dass diese Unterscheidung nur relativ ist, so dass sich das Proteasom einige Substrate mit unterschiedlichen Formen der Autophagie teilt (52). Letztendlich sind beide Systeme miteinander verbunden und kommunizieren untereinander mit Hilfe verschiedener Mechanismen.

### 1.2.3 Autophagie – Eine komplexe Signalkaskade

Autophagie existiert in drei unterschiedlichen Hauptformen: Mikroautophagie, chaperonvermittelte Autophagie und Makroautophagie (24). Letztere spielt bezüglich des lysosomalen Abbaus von zytoplasmatischen Bestandteilen die Hauptrolle. Durch diese (ab hier als Autophagie bezeichnet) wird mit Hilfe von doppelmembranösen Vesikeln (Autophagosomen) zytoplasmatisches Material, aber auch ganze Organellen (intrazelluläres Material) für den lysosomalen Abbau bereitgestellt (24).

Das Autophagosom entwickelt sich aus dem Phagophor. Hierbei handelt es sich um eine

halbmondförmige Membran (*isolation membrane*), welche sich schrittweise verlängert. Durch eine Spaltung der Membran wird nicht nur das Autophagosom geschlossen, sondern es kommt auch zu einer Separation der inneren und der äußeren Membran in zwei unterschiedliche Strukturen (53). Die äußere Membran des entstehenden Autophagosoms fusioniert mit Lysosomen, woraus das Autolysosom entsteht. An diesem Schritt sind verschiedene Moleküle beteiligt. Bisher konnte gezeigt werden, dass die Autophagosom-Lysosom-Fusion bei Säugetieren durch die Interaktion von Syntaxin 17, welches auf den Autophagosomen lokalisiert ist, mit SNAP 25 und lysosomalen VAMP8 vermittelt wird (54). Darüber hinaus wird die Interaktion von Syntaxin 17 mit dem HOPS-Komplex benötigt (55). Die Fusion wird durch Atg14 und EPG5 erleichtert (56, 57). Unabhängig von Syntaxin 17 scheint noch ein weiteres SNARE Protein für die Fusion verantwortlich zu sein, und zwar YKT6. Dieses bildet einen Komplex mit SNAP 29 und lysosomalen STX7 (58). Letztendlich gelangen durch die Fusion die lysosomalen Enzyme in den Spalt zwischen äußerer und innerer Membran. Letztere wird dadurch abgebaut. Im Anschluss kann es daher zum Abbau der autophagosomalen Einschlüsse kommen (59-62). Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass das Autophagosom zunächst mit einem Endosom verschmilzt, ehe das sich hierbei gebildete Amphisom (63, 64), welches die gleiche Morphologie wie MIICs (MHC Klasse II Kompartimente) aufweist (65), mit dem Lysosom zum Autolysosom fusioniert (66). Autophagosomen können darüber hinaus auch direkt mit MIICs verschmelzen (67). Da MHC Klasse II Komplexe mit lysosomalen (Abbau-)Produkten beladen werden, ist dieser über Autophagie vermittelte Abbauprozess insbesondere für die Präsentation von intrazellulären Antigenen über MHC Klasse II Komplexe und damit für die CD4<sup>+</sup> T-Zell Stimulation von besonderem Interesse (68, 69). Der schematische Ablauf wird in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1: Schematischer Ablauf der Autophagie**

Durch die schrittweise Verlängerung des Phagophors entsteht das Autophagosom. Dieses kann entweder mit einem Endosom zum Amphisom und im Anschluss daran mit einem Lysosom verschmelzen oder direkt mit einem Lysosom fusionieren. Der Abbau der Ladung erfolgt durch die lysosomalen Proteasen. Durch die Präsentation der Antigene über MHC Klasse II Komplexe kommt es zu einer CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung. Neben

der Unterstützung des Immunsystems kann die Zelle Autophagie zur Energiebereitstellung nutzen.

In letzter Zeit wurde immer häufiger hervorgehoben, dass Autophagie nicht nur ein unselektiver Prozess ist (wie zum Beispiel unter Hungerzuständen, wo es um die reine Energiebereitstellung geht), sondern vielmehr selektiv Materialien für den Abbau ausgesucht werden. Dies ist zum Beispiel unter „*steady-state*“-Bedingungen und während der Aktivierung der Immunantwort der Fall (70-72). Dies geschieht u.a. durch LIR (*LC3-interacting region*)-Motive (73, 74), welche Bestandteil verschiedener selektiver Autophagierezeptoren sind, wie z.B. p62, NBR1, NDP52 und Optineurin.

Die molekulare Regulation der Autophagie geschieht durch eine Signalkaskade. Hierfür werden essentielle Proteine benötigt, welche als „*autophagy-related gene (Atg) products*“ bezeichnet werden. Bisher konnten 42 Atg-Gene in Hefe identifiziert werden (75). Sie sind jedoch auch in höheren Eukaryonten (wie beispielsweise Säugetieren) konserviert (76, 77). Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass Autophagie bzw. die Bildung der Autophagosomen teilweise ohne Atgs ablaufen kann.

Die hierarchische Aktivierung der Atg-Proteine (68, 76) kann grundsätzlich in 5 Schritte unterteilt werden: 1. *Induction/Initiation*, 2. *Nucleation*, 3. *Elongation and enclosure*, 4. *Fusion* und 5. *Recycling/Degradation* (78, 79) (Siehe Abbildung 2).

### 1. Induktion/Initiation

Die Balance zwischen der Initiation und der Inhibition der Autophagie wird durch AMPK (AMP aktivierte Proteinkinase) und mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*) gesteuert. Die Serin/Threonin Kinase AMPK ist ein positiver Regulator der Autophagie (80) und wird durch verschiedene Stress-Stimuli bzw. dem intrazellulärem AMP/ATP-Verhältnis aktiviert. Ob die alleinige AMPK-Aktivierung für die Induktion der Autophagie ausreichend ist, ist jedoch noch nicht geklärt (81). Die Aktivierung von AMPK (durch die AMPK Kinase) geschieht über die Phosphorylierung von Threonin 172 an der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit (82). AMPK kann Autophagie im weiteren Verlauf über verschiedene Signalwege beeinflussen. Einerseits gelingt dies über die direkte Aktivierung von ULK 1/2 (Atg1 in Hefe), durch die Phosphorylierung von Serin 317 und Serin 777 und/oder durch die Inhibition von mTOR. Da verschiedene physiologische Stresszustände sowohl in einer AMPK-Aktivierung als auch in einer mTOR-Inhibition resultieren, wird die ULK1-Aktivierung durch die Kombination der positiven Signale von AMPK und dem Verlust der inhibitorischen Signale von mTORC1 reguliert (83).

mTOR gehört ebenfalls zu den Serin/Threonin Protein Kinasen und besteht aus den

Komplexen mTORC1 und mTORC2 (84). mTOR phosphoryliert Serin 757 an ULK1/2, wodurch dessen Aktivierung verhindert wird (80). Für die autophagischen Prozesse ist insbesondere das rapamycin-sensible mTORC1 relevant (85). Dieses wiederum besteht aus mTOR, mLST8 (oder GβL), PRAS40 und dem *regulatory-associated protein of TOR* (raptor) (86). Da raptor ein Substrat der AMPK ist, kann aktiviertes AMPK die mTORC1-Aktivität - wie bereits erwähnt - auch direkt hemmen, und zwar durch die Phosphorylierung von raptor (80, 87, 88). Positive Signale, wie hohe Energielevel, normoxische Zustände, Aminosäuren (89) oder Wachstumsfaktoren führen über den PI3K Klasse I-AKT Weg zur Aktivierung von mTORC1, während AMPK inhibiert wird (84, 90). Dies bewirkt eine Inhibition des ULK 1/2 Kinase Komplexes, welcher bei Säugetieren aus ULK1/2, Atg13, Atg101 und FIP200 besteht und downstream von mTOR bzw. AMPK agiert (91-94). In der Folge kommt es zu einer Inhibition der Autophagie.

## 2. Nucleation

Für die Entstehung des doppelmembranösen Phagophors bzw. der *isolation membrane* (prä-autophagosomale Struktur), seiner Verlängerung und dem Schluss zu einem Vesikel, muss es im Folgenden zu einer Aktivierung des PtdIns3KC3-Komplexes (=PI3K) (*autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex*) kommen. Der PtdIns3KC3-Komplex besteht bei Säugetieren aus Klasse III PI3K (Vps34 in Hefe), Beclin 1, Atg14L, Atg6 und p150 (Vps 15 in Hefe). Er wird über die Phosphorylierung durch den ULK1/2-Komplex aktiviert. Daraufhin kommt es zur Phosphorylierung von PtdIns (Phosphatidylinositol) zu PtdIns(3)P (= PI3P) (Phosphatidylinositol 3-Phosphat), welches das initiale Signal für die Formation des Autophagosoms ist (24, 92, 95). Woraus dieses genau entsteht ist noch nicht ganz klar, es häufen sich aber die Hinweise, dass das ER (endoplasmatisches Retikulum) hierbei beteiligt ist (96, 97). Bei Säugetieren kommen noch weitere Strukturen wie die äußere Membran des Mitochondriums (98) und die Plasmamembran in Frage (99). Daneben spielen auch Atg9A-Vesikel in der Anfangsphase eine wichtige Rolle – insbesondere für die Ausdehnung des Phagophors (96, 100). An das PtdIns(3)P des sich entwickelnden Autophagosoms binden die WIPI-Proteine 1, 2 und 4. WIPI steht für „*WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*“ (101). Sie dienen als PI3P Effektor-Proteine. Für die Rekrutierung des Atg12-Atg5-Atg16L Komplex hat insbesondere das WIPI2B eine besondere Bedeutung (102, 103). Es entschlüsselt die PI3P-Signale, wodurch die downstream gelegenen Atg Proteine rekrutiert werden können, was zur Verlängerung des Phagophors führt.

### 3. Elongation and Enclosure

Die Ausdehnung des Vesikels und der Vesikelschluss wird durch zwei ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme gefördert: Atg12-Atg5-Atg16L1-Komplex und Atg4B-Atg7-Atg3-Komplex. Beide unterstützen die Konjugation von LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*) an PE (Phosphatidylethanolamin), was als LC3-Lipidation bezeichnet wird. Die Formation des Atg12-Atg5-Atg16L1-Komplexes wird durch die Konjugation des C-terminal gelegenen Glycinrestes (G<sub>140</sub>) von Atg12 an den Lysinrest von Atg5 initiiert, was über Atg7 und Atg10 (E1- und E2-ähnliche Enzyme) vermittelt wird (104). Anschließend bindet Atg16L1 an Atg12-Atg5, so dass es zur Entstehung des Atg12-Atg5-Atg16L1-Komplexes kommt (102). Für die Rekrutierung des Komplexes an die PtdIns(3)P-positive Membran des Phagophors ist WIPI2B verantwortlich, welches mit 16L1 interagiert (102, 103). Das zweite System besteht aus Atg4B, Atg7 und Atg3. Dieses ubiquitin-ähnliche System koppelt unter Zuhilfenahme der E3-ähnlichen enzymatischen Aktivität des Atg12-Atg5-Atg16L1-Komplexes LC3 an PE. Zunächst entfernt Atg4B dabei 5 Aminosäuren vom C-Terminus des pro-LC3 (29). Dadurch entsteht die LC3-I Form mit einem carboxyterminal exponierten konservierten Glycin-Rest (G<sub>120</sub>). Mit Hilfe von Atg7 (welches eine E1-ähnliche Aktivität aufweist), Atg3 (welches eine E2-ähnliche Aktivität aufweist) und dem Atg12-Atg5-Atg16L-Komplex (E3-ähnliche Aktivität) wird der Glycinrest der Carboxylgruppe von LC3-I kovalent an die Aminogruppe von PE konjugiert, wodurch es zum Umbau von LC3-I zu LC3-II kommt (105, 106).

Sobald das Autophagosom gebildet ist, dissoziiert der Atg12-Atg5-Atg16-Komplex von der äußeren Membran (104). Außerdem wird LC3-II durch Atg4 von der äußeren Membran abgespalten (= *delipidation*) (68).

### 4. Fusion

Nach der Fusion des Autophagosoms mit Endosomen oder Lysosomen wird auch das intraluminal gelegene LC3 durch die lysosomalen Proteasen degradiert. Je mehr Autophagosomen gebildet werden, desto mehr LC3 wird in den Autolysosomen degradiert, weshalb der lysosomale Turnover von LC3 ein gutes Maß für die Aktivität der Makroautophagie ist (107). Das Autolysosom verfügt daher nur noch über eine sehr geringe Menge an LC3-II. LC3-II ist der einzige Proteinmarker, der zuverlässig mit dem Auftreten der doppel-membranösen Membran von funktionellen Autophagosomen assoziiert werden kann (108, 109). Es wurde beobachtet, dass es eine Assoziation zwischen der Menge an LC3-II und der Autophagosomenformation gibt, weshalb die Annahme getroffen werden kann, dass die Menge an LC3-II mit der Anzahl an Autophagosomen korreliert (109, 110). Deshalb ist die

Beobachtung der Konversion von LC3-I zu LC3-II ein weitgehend anerkanntes Verfahren, um die Autophagosomenformation zu messen (111). Die Western Blot Analyse der LC3 Expression ist die weitestgehend genutzte Methode, um die Autophagosomenformation zu bestimmen (112).

Welche Funktion LC3 (Atg8) hat, ist noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist jedoch, dass es über das LIR-Motiv zur selektiven Autophagie beitragen kann (113).

#### 5. Recycling/Degradation

Dieser letzte Schritt der Autophagie ist in der Wissenschaft nur unzureichend aufgeklärt. Letztendlich werden die Abbauprodukte in das Zytoplasma freigesetzt und der Zelle wieder als Rohstoffe zugeführt (Wiederverwertung /Energiebereitstellung) oder z.B. nach Beladung im MHC über MHC Klasse II Komplexe an CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert.

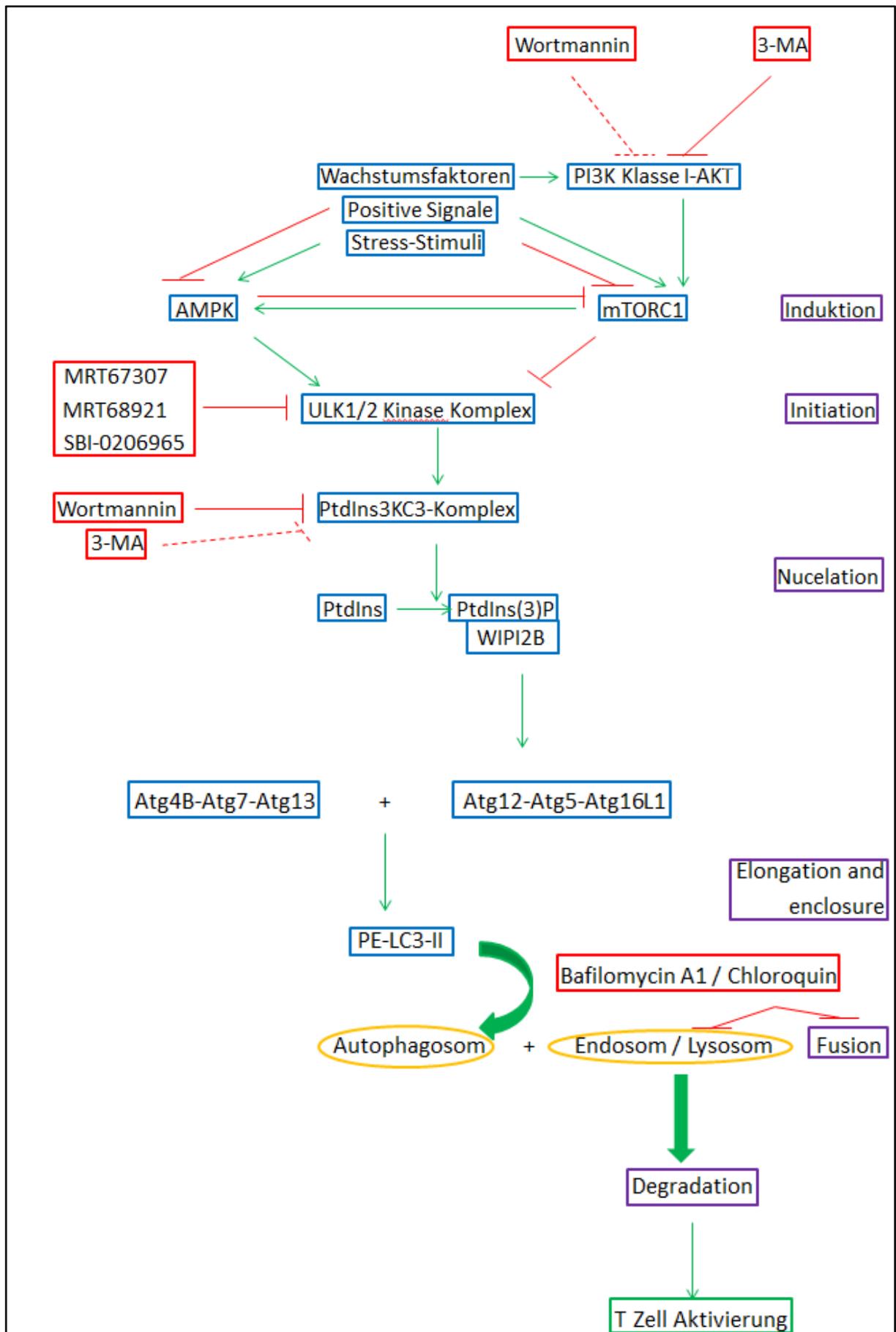


Abbildung 2: Signalkaskade der Autophagie mit den Angriffspunkten der für diese Arbeit relevanten Inhibitoren

Autophagie kann durch verschiedene Faktoren inhibiert oder getriggert werden. Die Stimulation von AMPK führt zur Aktivierung der Autophagie, während sie durch mTORC1 inhibiert wird.

Verschiedene Inhibitoren (rote Kästen) können Autophagie an unterschiedlichen Stellen unterbrechen. Grüne Linien: Stimulation; rote durchgehende Linien: Inhibition; rote gestrichelte Linien: transiente Inhibition.

#### 1.2.4 Autophagie und Viren

Neuere Studien konnten zeigen, dass Autophagie in der Lage ist, virale Infektionen sowie die Replikation von intrazellulären Bakterien und Parasiten zu dämpfen. Dies liegt unter anderem daran, dass es in Folge einer Virusinfektion nicht nur zur Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen kommt, sondern die endogenen Antigene mittels Autophagie auch über MHC Klasse II Komplexe präsentiert werden können. Dies wurde für Viren erstmals durch Long *et al.* beschrieben, welche zeigen konnten, dass zytosolische Masern- und Influenza A Virusantigene für die MHC Klasse II Präsentation endogen prozessiert werden können (114-116). Daraufhin konnten Schmid *et al.* durch Kopplung viraler Antigene (Influenza Matrix Protein 1) an LC3 eine verstärkte Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen (67). Da CD4<sup>+</sup> T-Zellen viele wichtige Helferfunktionen in der Immunantwort übernehmen, kommt es in der Folge zu deren Verbesserung.

Zudem wurde gezeigt, dass Makrophagen und B-Zellen nach Behandlung mit dem Autophagieinhibitor 3-MA nicht mehr in der Lage waren, endogen synthetisierte Proteine auf MHC Klasse II zu präsentieren, was ein Hinweis darauf ist, dass durch Autophagie zytosolische Proteine (und damit auch Material von Viren) auf MHC Klasse II Moleküle geladen werden (117, 118).

Autophagie kann darüber hinaus direkt in die virale Replikation eingreifen. Dies wurde bisher für das *Tobacco mosaic virus* (TMV) und für das *Sindbis virus* beschrieben (29). In diesem Zusammenhang konnten Liang *et al.* zeigen, dass eine Überexpression von Beclin 1 in Sindbis-Virus infizierten Neuronen zu einem Schutz gegen die durch Sindbis-Virus hervorgerufene Virus-Enzephalitis führt (119).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass HIV-1 positive Patienten, welche ohne antiretrovirale Therapie über mehrere Jahre klinisch stabil blieben, in den peripheren mononukleären Blutzellen ein hohes Basisniveau bezüglich Autophagie aufwiesen (120).

Als Reaktion auf Autophagie haben einige Viren im Laufe der Evolution unterschiedliche Mechanismen entwickelt, sich dieser (und damit der Immunantwort) zu entziehen. Sie können nicht nur die Initiation der Autophagie inhibieren, sondern auch die Entwicklung der Autophagosomen. Die Blockade der Autophagie gelingt entweder durch die Blockade der vorgeschalteten positiven Regulatoren der Autophagie, der Aktivierung der vorgeschalteten

negativen Regulatoren der Autophagie (z.B. mTOR) oder durch einen direkten Antagonismus der an Autophagie beteiligten Strukturen (z.B. durch die Manipulation der Komponenten, die für die Bildung und Reifung der Autophagosomen benötigt werden) (121). Generell lässt sich die Beobachtung machen, dass DNA-Viren eher in die Autophagosomenbildung eingreifen (122). Dies wird beispielsweise beim *Herpes Simplex Virus-1* (HSV-1) (123-127) und beim *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus* (KSHV) (128) beobachtet. Bei HSV gelingt dies über das Protein ICP34.5, welches mit Beclin 1 interagiert. Durch die Inhibition der Autophagie wird die Entwicklung und das Überleben der Viren im Wirtsorganismus gefördert. RNA-Viren verhindern eher den Abbau der Autophagosomen, wodurch es zu einer Akkumulation von doppelmembranösen Vesikeln kommt (122). Dies kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen, zum Beispiel durch eine Unterbindung der Bewegung der Autophagosomen entlang der Mikrotubuli, einer Verhinderung der Verschmelzung von Lysosomen und Autophagosomen oder durch die Verhinderung der lysosomalen Ansäuerung. Dies konnte für Picornaviren (Poliovirus und Rhinovirus), Coronaviren (*mouse hepatitis virus* und *severe acute respiratory syndrome coronavirus*), Dengue Virus, HIV, ein Arterivirus (*equine arteritis virus*) und Influenza A Viren gezeigt werden (121, 129-135).

Andererseits können Viren Autophagie zu ihrem Vorteil (Replikation, intrazelluläres Überleben) nutzen (29). Nach gezielter Initiation der Autophagie bzw. Akkumulation von Autophagosomen findet die Replikation dann sowohl an der Oberfläche der Autophagosomen als auch in deren Lumen statt (136). Teilweise können auch Komponenten der Autophagie für die Virusherstellung verwendet werden. Beispiele hierfür sind Rota- und Parvoviren (137, 138) sowie einige der oben genannten RNA-Viren – beispielsweise Corona- und Polioviren (132, 139, 140).

Das *bovine viral diarrhea virus* (BVDV) hat Teile der LC3-Sequenz inkorporiert (141). Auf diese Weise kann dieses Virus Autophagie für seine Replikation verwenden (142, 143).

Darüber hinaus können Viren Autophagie nutzen, indem zwar virale Komponenten oder Proteine eingeschlossen werden, jedoch nicht zu den Lysosomen, sondern in den extrazellulären Raum transportiert werden.

## 1.3 Das Immunsystem

### 1.3.1 Die angeborene Immunität

Bei der angeborenen Immunität handelt es sich um die schnelle, unspezifische, antigenunabhängige Immunabwehr. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, eine möglichst wirkungsvolle und vor allem schnelle Abwehrreaktion am Ort der Infektion einzuleiten. Um

dies zu gewährleisten, werden Phagozyten an den Infektionsort rekrutiert (144). Zu den professionellen Phagozyten gehören unter anderem dendritische Zellen und Makrophagen (145). Da beide sowohl MHC Klasse I als auch MHC Klasse II Moleküle exprimieren (146), werden beide zu den professionellen APZs (Antigen präsentierende Zellen) gezählt. Die von ihnen aufgenommenen Antigene (endogen und exogen) werden in ihrem Inneren degradiert, prozessiert und anschließend über die MHC Komplexe präsentiert. In den nächstgelegenen Lymphknoten kommt es dann zu einer Interaktion mit den naiven T-Zellen. Dies ist die Schnittstelle zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität (147).

### 1.3.2 Die erworbene Immunität

Das angeborene Immunsystem ist nicht immer in der Lage, die eingedrungenen Pathogene alleine zu bekämpfen. Das liegt zum einen an dem beschränkten Repertoire ihrer PRRs, zum anderen aber auch an den Pathogenen, die sich der angeborenen Immunität durch die Anpassung an deren Abläufe entziehen können (148).

In diesem Fall muss die erworbene Immunantwort eingreifen. Eine wichtige Rolle spielen hier die B- und die T-Zellen sowie die von den B-Zellen bzw. Plasmazellen sezernierten Antikörper. Der Ursprung dieser Immunantwort ist in den sekundären lymphatischen Organen lokalisiert. Zum einen wandern die Lymphozyten (B- und T-) nach ihrer Bildung hierhin, zum anderen aber auch die APZs, die die prozessierten Peptide über ihre MHC Moleküle präsentieren. Die Erkennung von MHC Klasse II gebundenen Antigenen durch naive  $CD4^+$  T-Zellen führt zum sogenannten T-Zell Priming sowie nachfolgend zu deren Proliferation. Die ebenfalls in den sekundären lymphatischen Organen lokalisierten B-Zellen nehmen die Antigene über Ihren B-Zell Rezeptor auf. In ihrem Inneren werden diese prozessiert und Fragmente davon werden über MHC Klasse II Komplexe präsentiert. Durch die hochspezifische Interaktion mit dem TZR (T-Zell Rezeptor) (gekoppelte Erkennung) kommt es dann zur Proliferation der B-Zellen, Umwandlung in Plasmazellen sowie zur Affinitätsreifung und Produktion von Immunglobulinen (149).

### 1.3.3 T-Zellen

T-Zellen gehören zu den Lymphozyten. Sie entwickeln sich im Thymus aus einer gemeinsamen lymphoiden Stammzelle, deren Herkunft entweder im Knochenmark oder in der fetalen Leber liegt (150-152). Im Zuge ihrer Entwicklung kommt es zur Expression von spezifischen transmembranösen heterodimeren TZRs, welche in der Lage sind, Komponenten aller potentiellen Pathogene zu erkennen (153). Für die Signaltransduktion ist das assoziierte

CD3 Polypeptid zuständig (154). Die reifen T-Zellen werden (nach der positiven und negativen Selektion) aus dem Thymus entlassen und zirkulieren durch die sekundären lymphatischen Organe, während sie auf ihr spezifisches Antigen „warten“.

T-Zellen können je nach ihrem Auxilliärprotein in zwei große Klassen unterteilt werden: CD8<sup>+</sup> Zellen (30-40%; CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) exprimieren den CD8 Korezeptor und zeigen eine zytotoxische Aktivität gegen andere Zellen, die mit intrazellulären Pathogenen (beispielsweise Viren) infiziert sind, sowie gegen Tumorzellen. Außerdem kontrollieren sie regulatorische Zellen, die die Immunantwort herunterregulieren (sog. Suppressorzellen).

CD4<sup>+</sup> T-Zellen (60-70%; CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) exprimieren den CD4 Korezeptor und werden auch als Helferzellen bezeichnet. Sie aktivieren bzw. regulieren sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort (147). Somit helfen sie B-Zellen Antikörper zu bilden und sie verbessern die Antwort von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bzw. halten diese aufrecht. Außerdem regulieren sie die Funktion von Makrophagen, sie rekrutieren Granulozyten an die Stellen von Entzündungen und Infektionen oder sie produzieren Zytokine und Chemokine und steuern dadurch die Immunantworten gegen eine große Varietät von pathogenen Mikroorganismen. Darüber hinaus kontrollieren sie Autoimmunität und sie sind wichtige Vermittler des immunologischen Gedächtnisses (155).

#### 1.3.4 MHC Moleküle

APZs besitzen an ihrer Oberfläche, wie bereits oben erwähnt, bestimmte Proteine, die in den Loci der Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) kodiert sind und die Basis für die MHC-restringierte Antigenpräsentation bilden. Diese werden weiter in zwei Klassen unterteilt: MHC Klasse I und MHC Klasse II. Zwar weisen die MHC Klasse I Moleküle und die MHC Klasse II Moleküle eine ähnliche Struktur auf, allerdings sind ihre physiologische Funktion sowie die Peptide, die den T-Zellen präsentiert werden, sehr unterschiedlich (156).

Während der MHC Klasse I Komplex auf allen kernhaltigen Zellen vorkommt, wird der MHC Klasse II Komplex zunächst nur bei den APZs sowie den epithelialen Zellen des Thymus gefunden. Kommt es jedoch zu einer Freisetzung von IFN- $\gamma$  (Interferon-gamma) können auch andere Gewebe die MHC Klasse II Expression hochregulieren (156).

Über die MHC Komplexe können Fragmente (Peptide) der phagozytierten Pathogene nach deren Degradation und Prozession präsentiert werden. Erst durch die Erkennung von Antigenfragmenten, die von körpereigenen MHC Molekülen präsentiert werden, kann es zu einer Aktivierung von naiven T-Zellen kommen, wobei der TZR sowohl mit dem Peptid (Epitop), als auch mit Teilen des MHC interagiert (157).

Das klassische Modell der Antigenprozessierung für die MHC Klasse I und II Präsentation, in

welchem MHC Klasse I Liganden nur von intrazellulären und MHC Klasse II Liganden ausschließlich von extrazellulären Quellen stammen, ist zwischenzeitlich überholt. Es hat sich gezeigt, dass beide Antigenquellen zur Beladung von MHC Klasse I und II Molekülen beitragen (156). Bei der Kreuzpräsentation werden exogene Antigene (beispielsweise von Viren) über MHC Klasse I Moleküle präsentiert (158, 159). Andersherum können auch endogene Antigene durch MHC Klasse II Moleküle an CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert werden. Dies ist beispielsweise über Autophagie möglich (160-162). Durch die Sequenzierung von Peptiden, die über MHC Klasse II präsentiert wurden, konnte gezeigt werden, dass 20% der identifizierten Epitope von intrazellulären Quellen stammten (163). In Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass sowohl Autophagie als auch die proteasomale Aktivität und die lysosomale Integrität für die endogene CD4<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung bei der MVA Infektion essentiell sind (164).

### 1.3.5 MHC Klasse II Präsentation

Die MHC Klasse I und II Moleküle werden im endoplasmatischen Retikulum gefaltet. Um eine Bindung der sich hier befindlichen Peptide in die Bindungsgrube von MHC Klasse II zu verhindern, kommt es zur Bindung der MHC II assoziierten invarianten Li-Kette (Ii). Hierbei kommt ein Teil der Ii-Polypeptidkette in der Bindungsfurche des MHC Moleküls zum Liegen, wodurch diese blockiert wird. Darüber hinaus ist die invariante Kette an dem Transport der MHC II Moleküle zu einem angesäuerten endosomalen Kompartiment beteiligt. Es ist nicht genau bekannt, wo die Ii-Kette gespalten wird und die MHC Moleküle auf ihre Peptide treffen, allerdings gibt es Hinweise, dass dies in dem sogenannten MHC Klasse II Kompartiment (MIIC) stattfindet. Dies ist ein spezialisiertes vesikuläres Kompartiment das in der späten Phase des endosomalen Abbauweges in Erscheinung tritt (157).

MIICs besitzen die für die MHC Klasse II Beladung nötigen Komponenten, und zwar die MHC Klasse II Moleküle (diese werden aus dem ER hierher transportiert), die Hydrolasen, die Oxidoreduktasen und das HLA-DM (165). Nachdem ein Großteil der Ii-Kette durch saure Proteasen wie beispielsweise Cathepsine abgebaut wurde, katalysiert das HLA-DM Molekül die Bindung von Peptiden an das frei gewordene MHC Klasse II Molekül (166, 167). Daraufhin werden die MHC Klasse II Peptid Komplexe an die Zelloberfläche transportiert.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Momentan ist nicht genau bekannt, wie pockenvirale Antigene prozessiert werden müssen, um effizient CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren. Durch gezieltes Einschleusen von viralen

Antigenen in den MHC Klasse II Präsentationsweg sowie derer Kopplung an das autophagosomal-assoziierte Membranprotein LC3-II soll die Relevanz der Autophagie für die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* untersucht und strategisch genutzt werden. Außerdem soll die autophagosomvermittelte CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung durch verschiedene rekombinante MVA Vektoren funktionell näher charakterisiert werden.

Für unsere Studien haben wir das Modelantigen Ovalbumin verwendet, welches zur Expression in die Deletion VI des MVA-Genoms integriert wurde. Ovalbumin ist ein Glykoprotein (45 kDa) (Kilodalton) mit einer internen Sekretionssequenz, weshalb es unter normalen Umständen sezerniert wird (168). Um zu gewährleisten, dass das Ovalbumin im Zytosol verbleibt, wurde die Sekretionssequenz entfernt (nicht-sekretorisches = nsOVA). In der Regel werden zytosolisch vorliegende Proteine eingeschränkt über MHC Klasse II Moleküle präsentiert, weshalb eine CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort weitestgehend schwach ausfallen sollte. Durch die Fusion von nsOVA an LC3 (nsOVA/LC3) soll das Antigen über Autophagie effizient in den MHC Klasse II Peptidbeladungsweg eingeschleust werden, wodurch es zu einer deutlichen Steigerung der CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort kommen sollte.

Somit soll überprüft werden, ob durch die Präsentation endogener Antigene über MHC Klasse II Komplexe an die CD4<sup>+</sup> T-Zellen Makroautophagie die erworbene Immunantwort unterstützen kann.

Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass die Effektivität einer Impfung durch Autophagie vermittelte Antigenpräsentation über MHC Klasse II Komplexe verbessert werden kann. Impfstoffe auf Basis von rekombinanten MVA sind nicht nur im Zusammenhang von Infektionskrankheiten (169-171), sondern auch bei der Immuntherapie von Tumoren bereits in klinischer Erprobung (172, 173).

Deshalb ist es das übergeordnete Ziel, auf diesem Wege neue Zielstrukturen für immuntherapeutische Ansätze mit pockenviralen Impfvektoren zu identifizieren.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
1 kb DNA Leiter	Biolabs
2-β-Mercaptoethanol	Roth
3M Natriumacetat (pH 7,5)	Merck
APS	Biosciences
Agarose	Biozym
Bafilomycin A1	Santa Cruz
Bis/Acrylamid 30%	Roth
Brefeldin A	Sigma
Bromphenolblau	Merck
BSA	LOEWE Biochemica
DMSO	Sigma
Dream Taq	Thermo scientific
EDTA	Gibco by life technologies
Epoxomicin	Sigma
Essigsäure (100%)	Merck
Ethanol	Roth
EZ-Vision DNA Dye	Amresco
FCS	Pan-Biotech
Glycerin	Roth
Isopropanol	Merck
Methanol	Sigma-Aldrich
MG132	CALBIOCHEM
Milchpulver	Sucofin
NaCl	Roth
Natriumchlorid	Roth
Page Ruler Prestained Protein Leiter	Thermo Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
PCR-Wasser	Thermo scientific
Phenolchlorophorm	Roth
PI 103	Tocris
Ponceau	Roth

Prestained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas
Proteinase K (1mg/mL Stock)	AGS GmbH
Re-Blot Plus Strong Solution	Merck Millipore
SDS	Roth
Sucrose	Roth
TBE	Sigma
TEMED	Roth
Tris-Base	Merck
Triton X-100	Sigma/ VWR
Tween20	Merck
Wortmannin	Sigma

## 2.2 Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
0,5M Tris pH 6,8	60,55g Tris-Base 1L destilliertes Wasser
2M Tris pH 8,8	242,2g Tris-Base 1L destilliertes Wasser
5x SDS-Probenpuffer	250mM Tris pH 6,8 10% SDS 7,5% Glycerin 12,5% 2-β-MercaptoEtOH 0,5 % Bromphenolblau
Blottingpuffer (1x)	100 mL 10 x Blotting Puffer 200 mL Methanol 700 mL destilliertes Wasser
Blottingpuffer (10x)	58 g Tris Base 29 g Glycerin 1L destilliertes Wasser
FACS-Puffer	1% BSA 0,1 % NaN <sub>3</sub> in PBS
Lämmli (1x)	100 mL Lämmli 10x 900 mL destilliertes Wasser
Lämmli (10x)	30,3g Tris Base

	144 g Glycerin 10g SDS 1L destilliertes Wasser
FACS-Puffer	1% BSA 0,1 % NaN <sub>3</sub> in PBS
PFA	2% Paraformaldehyd in PBS
Ponceau	0,1% Ponceau 5% Essigsäure 1L destilliertes Wasser
Sucrose 36 %; pH 9.0	36% Sucrose in 10 mM Tris
TBST (1x)	100mL TBST 10x 900 mL destilliertes Wasser
TBST (10x)	50 mL 2M Tris pH 8,0 90 g NaCl 5mL Tween 20 1L destilliertes Wasser
TEN-Puffer 10x (pH 7,4)	100mM Tris-HCL 10 mM EDTA 1M NaCl
TYR-Lysepuffer	50 mM Tris pH 8,0 150mM NaCl 0,02% NaN <sub>3</sub> 1% Triton X-100

**Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen**

## 2.3 Verbrauchsmaterial

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
0,45 µm Nitrocellulose Blotting Membran	Amersham
1 mL-Spritzen	BD
3mm Chromatographie Papier	Whatman
70 µm Nylon Filter	VWR / Eppendorf
1,5 mL-Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf, Sarstedt
Deckgläser (Durchmesser 18mm; Dicke 0,16mm)	VWR

FACS Tube	Bio-Rad Laboratories
Falcon (15mL, 20mL)	Greiner Cellstar
Gestopfte Pipettenspitzen (10, 10/20, 20, 100, 200, 1000µL)	starlab
Kryoröhrchen	Thermo Scientific
Kunststoffpipette	Corning
Lochplatten (6, 12, 24, 96)	TPP, VWR
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
Objektträger (L x H x D 76 x 26 x 1mm)	VWR
Parafilm	Oehmen
Pipettenspitzen (1-200µL/1000µL) (nicht gestopft)	Corning
Polyallomer Zentrifugenröhrchen (16 x 104 mm)	Seton
Polyallomer Zentrifugenröhrchen (25 x 89 mm)	Seton
Spritzen (5, 12, 20mL)	Braun
Sterile Filter (0,2 und 0,45 µm)	Whatman
Zellkulturflasche (T75/T175/T182)	VWR / Eppendorf
Zellkulturplatte (6, 12, 24, 96 (flacher Boden))	TPP/VWR
Zellkulturplatte (96 (V-förmiger Boden))	nunc
Zellkulturschale (22,1 cm <sup>2</sup> )	TPP
Zellkulturschale (60,1cm <sup>2</sup> )	TPP
Zellscraper	TPP

## 2.4 Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
Destilliertes Wasser		Gibco by life technologies
Einfriermedium	90% FCS 10% DMSO	
FCS		Pan-Biotech
M2-Medium	500 mL RPMI 1640 50 mL FCS 28 µL 2-β-Mercaptoethanol	
PBS		Gibco by life technologies
RPMI 1640		Gibco by life technologies
RPMI 10% und 2%	RPMI 1640	

10% oder 2% FCS	
Trypsin	Gibco by life technologies
Trypanblau	Gibco by life technologies

**Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien**

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Western Blot (WB)/ Konfokales Mikroskop (KM)

Verdünnung für WB in TBST; Verdünnung für KM in 1% FCS (in PBS)

Primäre Antikörper:

Spezifität	Verdünnung	Isotype	Konjugat	Firma
Cox IV	1:1000 (WB)	Kaninchen	-	Cell Signaling Technology
	- (KM)	Polyklonal		
H3L	1:200 (WB)	Kaninchen	-	Genesis
	- (KM)	Polyklonal		
LC3	1:1000 (WB)	Kaninchen	-	Sigma
	1:100 (KM)	Polyklonal		
OVA	1:1000 (WB)	Kaninchen	-	Abcam
	- (KM)	Polyklonal, IgG		
OVA	1:1000 (WB)	Maus Monoklonal,	-	Sigma
	1:300 (KM)	IgG		

**Tabelle 3: Liste der verwendeten primären Antikörper für WB und KM**

Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen	1:3000 (WB)	Polyklonal IgG	Peroxidase	Jackson
Anti-Maus	1:3000 (WB)	Polyklonal IgG	Peroxidase	Jackson

**Tabelle 4: Liste der verwendeten sekundären Antikörper für WB**

### 2.5.2 FACS

(Verdünnung je 1:300 in FACS-Puffer (CD4) oder Perm/Wash-Puffer (IFN- $\gamma$  und IL-2 ))

Antikörper	Spezifität	Klon	Wirt	Konjugat	Hersteller
CD4	Maus	RM4-5	Ratte	PO	BD Bioscience
CD4	Maus	GK1.5	Ratte	PB	eBioscience
IFN- $\gamma$	Maus	XMG1.2	Ratte	APC	eBioscience

IFN- $\gamma$	Maus	XMG1.2	Ratte	FITC	BD Pharmingen
IL-2	Maus	JES6-5H4	Ratte	PE	eBioscience
IL-2	Maus	JES6-5H4	Ratte	APC	eBioscience

**Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper für FACS**

### 2.5.3 Konfokales Mikroskop

Primäre Antikörper

Verdünnung in 1% FCS (in PBS)

Es konnten die gleichen Antikörper, wie für den Western Blot verwendet werden

Sekundäre Antikörper

Spezifität	Wirt	Verdünnung	Konjugat	Hersteller
Anti-Kaninchen	Esel	1:400	alexa fluor 647	invitrogen
Anti-Kaninchen	Huhn	1:400	alexa fluor 594	invitrogen
Anti-Maus	Esel	1:500	alexa fluor 488	invitrogen

**Tabelle 6: Liste der verwendeten sekundären Antikörper für KM**

## 2.6 Fluoreszierende Farbstoffe

<u>Farbstoff</u>	<u>Hersteller</u>
EMA	Invitrogen
DAPI	Vectashield

## 2.7 Kits

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche
BD Cytfix/Cytoperm Kit	BD Pharmingen

## 2.8 Software

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
FUSION-CAPT-Software	Vilber Lourmat
FacsDIVA	Becton Dickinson
FlowJo 6.4.2	Treestar, Ashland

MS Office	Microsoft, Redmond
ZEN 2011	Carl Zeiss
Excel	Microsoft corporation
Image J	Wayne Rasband
SPSS	IBM

## 2.9 Zelllinien

Name	Beschreibung	Firma
B16-GMCSF	GM-CSF produzierende B16 murine melanoma cells	Georg Häcker, Freiburg, Deutschland
DC2.4	Murine dendritic cell	Dr. KL Rock
HeLa	Human epithelioid carcinoma	ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures) ATCC CCL-2
DF-1	cell line of chicken embryo fibroblasts	ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures) ATCC CRL 12203
HeLa DsRed-LC3-egfp	Siehe unten	Wurden von unserer Arbeitsgruppe generiert
BMDCs	Primary murine bone marrow derived	Femurs and tibias from mice
CD4OVA	Maus CD4+ T-Zellen	Hergestellt von F. Thiele
CD4B5R	Maus CD4+ T-Zellen	Hergestellt von F. Thiele

**Tabelle 7: Liste der verwendeten Zelllinien**

HeLa DsRed-LC3-egfp:

HeLa Zellen wurden mit einem DsRed-LC3-egfp Fusionskonstrukt in Form eines Plasmids transduziert. DsRed befindet sich dabei am N-Terminus und egfp am C-Terminus von LC3. Wird Autophagie induziert, kommt es zu einem Verlust des egfp-Signals. Das liegt daran, dass GFP (grün fluoreszierendes Protein) pH-sensitiv ist und daher bei Kontakt mit dem sauren Kompartiment des Lysosoms abgebaut wird, während das dsRed-Signal erhalten bleibt. Da die Zellen mit diesem Plasmid stabil transduziert worden sind, wird das dsRed-LC3-eGFP im Vergleich zu normalen LC3 überexprimiert.

## 2.10 Mäuse

Stamm	MHC-Restriktion	Hersteller
C57BL/6 J	Class I : H2-Kb and H2-Db Class II: I-Ab	Janvier
ATG7 CD11c-Cre <sup>-</sup> /-	Class I : H2-Kb and H2-Db Class II: I-Ab	Thomas Brocker und Thomas Misgeld

**Tabelle 8: Liste der verwendeten Mäuse**

Die Isolation von BMDCs und Splenozyten erfolgte im Rahmen des Projektes O 119/11.

## 2.11 Peptide

Peptide	Aminosäuresequenz	MHC	Typ	Hersteller
OVA (265-280)	TEWTSSNVMEERKIKV	I-Ab	Klasse II	Thermo Fisher
B5R (46-60)	FTCDQGYHSSDPNAV	I-Ab	Klasse II	Thermo Fisher

**Tabelle 9: Liste der verwendeten Peptide für die Zellkultur-Versuche mit T-Zellen**

## 2.12 Laborequipment

Name	Typ	Firma
Bestrahlungsanlage	Gammacell 1000 Elite	Nordion
Eismaschiene	AF124	Scotsman
Elektrophoresekammer	Mini, Midi Large	Neolab
Flow cytometer	FACS Canto I/II	BD
Fusion	FUSION-FX7 Advance	Vilber
Geldokumentationssystem	UVsolo TS Imaging System with Transluminator	Biometra
Heizplatte mit Magnetrührer	MR Hei-Tec	Neolab
Inkubator	Heracell 150i / 240i	Thermo scientific
Konfokales Mikroskop	LSM 710 / LSM 780	Zeiss
Kühlschrank (FACS 4°C)	LKUv 1610 MediLine	Liebherr
Kühlschrank (4°C)	FKUv 1610 Premium	Liebherr

Kühlschrank (4°C)	KB 4260 Premium Biofresh	Liebherr
Kühlschrank 4°C	KUR18421, AntiBacteria	Bosch
Mikropipetten	Pipetman P2-1000	Gilson
Mikroskop	CKX41	Olympus
Mikrowelle	Gn3431MA	AEG
Multikanalpipette	Pipetman P200N	Gilson
Netzgerät	MS 3AP	MS Major Science
pH Messgerät	PB-11	Sartorius
Pipettierhelfer	accu-jet pro	Brand
Schüttler	ST 5 CAT	Neolab
Semidryblot	Elektrodengröße 185 x 230 mm	Neolab
Ultrazentrifuge	sorvall wx ultra series centrifuge	Thermo Scientific
Sterilbank	Mars Safety class 2 (510x900; 510x1500mm)	Labogene
Thermoblock	neoBlock 1	Neolab
Thermocycler	Professional TRIO	Biometra
Thermomixer	Comfort; 1,5mL	Eppendorf
Tiefkühlschrank (-20°C)	IG 1166 Premium	Liebherr
Tiefkühlschrank (-20°C)	GNP 4166 Premium NoFrost	Liebherr
Tiefkühlschrank (-80°C)	Forma 88000 Series	Thermo scientific
Tiefkühltruhe (-80°C)	Herafreeze	Thermo scientific
Ultraschallgerät	Sonopuls HD200/UW200	Bandelin
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Vortexer	VV3	VWR
Waage	AEJ 220-4M / Ew 4200-2nm	KERN & Sohn GmbH
Wasserbad	type 1083	GFL
Western Blot Kammer	H10	Neolab
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf
Zentrifuge	Megafuge 16R	Heraeus
Zentrifuge	Fresco 21 / Pico 21	Thermo scientific
Zentrifugenbuckets	SW 28 und SW 41	Thermo Scientific

**Tabelle 10: Liste des verwendeten Laborequipment**

## 2.13 Primersequenzen

Del VI 5'-CCTGGACATTTAGTTTGAGTGTTTCCTGAAT-3'

Del VI 3'-CTCCGCATCTAGTTGATATTCCAACCTCTT-5'

RFV Forward: 5'-AAAGATGCGTACATTGGACCC-3'

RFV Reverse: 5'-GTTCGAGACTAGAAAAGCGCC-3'

GFP Forward: 5'-TTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG-3'

GFP Reverse: 5'-GCAAGGCCGGATCTGGGAATTC-3'

OVA MVA new Forward: 5'-CACAAGCAATGCCTTTCAGA-3'

OVA MVA new Reverse: 5'-GACTTCATCAGGCAACAGCA-3'

RT LC3-S1-in Forward: 5'-CAGCTCAATGCTAACCAAGC-3'

RT LC3-S2-in Reverse: 5'-ATGTAACAGCCAGTGCTGTC-3'

## 2.14 Viren

Alle Viren wurden in unserem Labor nach einem bereits publizierten Protokoll hergestellt (174).

### MVA-sBnsOVA/LC3\_P11

Dieses rekombinante MVA-Virus exprimiert ein Fusionsgen, welches für das nicht sezernierende Ovalbumin Protein und das LC3 Protein kodiert. Das Gen steht unter der Kontrolle des späten Vaccinia Virus Promotors P11.

### MVA-sBnsOVA\_P11

Dieses rekombinante MVA Virus exprimiert das nicht sezernierende Ovalbumin Gen unter der Kontrolle des späten Vaccinia Virus Promotors P11.

### MVA-OVA\_P11

Dieses rekombinante MVA Virus exprimiert das Volllängen-Ovalbumin-Gen unter der Kontrolle des späten Vaccinia Virus Promotors P11.

### MVA-OVA\_P7.5

Dieses rekombinante MVA Virus exprimiert das Volllängen-Ovalbumin-Gen unter der Kontrolle des frühen/späten Vaccinia Virus Promotors P7.5

### MVA-NP-SIINF-egfpP11

Dieses rekombinante MVA Virus exprimiert ein Fusionsgen, welches für das Nukleoprotein (NP) von Influenza A Virus, das Peptid SIINF EKL (OVA<sub>257-264</sub>) und das „*green fluorescent protein*“ (eGFP) codiert. Das Gen steht unter der Kontrolle des späten Vaccinia Virus Promotors P11.

MVAF6-wt

Es handelt sich um das Wildtypvirus.

## 2.15 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch den Student T-Test mit Hilfe von SPSS.

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

#### 3.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden in einem Zellkulturinkubationsschrank bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% kultiviert. Dies erfolgte entweder in T75, T175 oder T182,5 Zellkulturflaschen, welche M2-Medium enthielten (Ausnahme: BMDCs und T-Zellen). Wenn eine Konfluenz von ca. 90% erreicht wurde, wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 (Zellsuspension : frisches M2-Medium) gesplittet. Semiadhärente Zelllinien wurden von der Flasche abgespült oder vorsichtig abgeschabt, in ein Falcon überführt und einmal mit M2-Medium gewaschen.

Bei den adhärennten Zelllinien wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 2 Minuten in 2 mL 0,05% Trypsin bei 37°C inkubiert. Nachdem sich die Zellen von der Flasche gelöst hatten, wurden sie mit M2-Medium gewaschen, in frischem Medium resuspendiert und anteilmäßig in eine neue Flasche überführt.

#### 3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bei 80%-iger Konfluenz geerntet und abzentrifugiert. Anschließend wurden ca.  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 mL Einfriermedium aufgenommen und in 1,5 mL-Kryoröhrchen bei -80°C gelagert (die ersten 24 Stunden in einer Einfrierbox).

T-Zellen wurden bei Bedarf 4 Tage nach der Restimulation eingefroren. Es wurden jeweils 2 Löcher der 24-Loch-Platte resuspendiert, gepoolt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 mL Einfriermedium aufgenommen und - wie oben beschrieben - gelagert. Bei Bedarf wurden die eingefrorenen Zellen aufgetaut und in 10 mL M2-Medium überführt. Nach einer Zentrifugation wurden sie in frischem Medium resuspendiert und - wie oben beschrieben - kultiviert.

Bei den T-Zellen erfolgte die Rekultivierung pro Kryoröhrchen in 4 Löchern der 24-Loch-Platte.

#### 3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau. In einigen Fällen wurde auch 4%-ige Essigsäure benutzt. Splenozyten wurden in einer 1:40 Verdünnung ausgezählt, alle anderen Zellen in einer 1:4

Verdünnung.

### 3.1.4 Herstellung von BMDCs

Für die Herstellung von BMDCs (knochenmarkabgeleitete dendritische Zellen) wurden die Hinterbeine von C57BL/6 oder CD11c-Cre<sup>-/-</sup> Mäusen verwendet. Die präparierten Knochen wurden in 70%-igem Ethanol sterilisiert und dann in M2-Medium überführt, mit welchem das Knochenmark aus der Tibia und dem Femur herausgespült werden konnte. Nach einer Zentrifugation (1500 U/min, 5 Min.) wurde das Zellpellet für eine Minute mit Lysepuffer behandelt (4,5 mL destilliertes Wasser + 0,5 mL Pharm Lyse). Dadurch werden die Erythrozyten lysiert. Die Reaktion wurde mit 40 mL PBS gestoppt. Nach einer anschließenden Filtration und Zentrifugation wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in eine 10 cm große Zellkulturplatte ausgesät und in 10 mL M2-Medium kultiviert, welchem 10% GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) hinzugesetzt worden war. Nach drei Tagen wurden 10 mL frisches Medium (mit 10% GM-CSF) hinzugefügt und nach weiteren drei Tagen wurden 10 mL des Mediums gegen 10 mL frisches Medium (mit 10% GM-CSF) getauscht. Die BMDCs wurden an Tag 7 für Experimente benutzt.

Das GM-CSF wurde von der B16-GMCSF Zelllinie produziert. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um GM-CSF produzierende murine B16 Melanomzellen. Je  $5 \times 10^5$  Zellen wurden in einer T175 Flasche kultiviert. Ab Tag drei bis Tag fünf wurde der Überstand von diesen Zellen gesammelt. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand steril filtriert.

## 3.2 Virologische Methoden

### 3.2.1 Infektion von Zellen

#### 3.2.1.1 Adhärente Zellen

Die Zellen wurden in 6- oder 24-Loch-Platten ausgesät, so dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 80% erreichten.

Das alte Medium wurde vorsichtig abgenommen. Um einen engen Kontakt zwischen Zellen und Viren zu gewährleisten, erfolgte die Infektion mit der jeweils benötigten MOI (*multiplicity of infection*) in einem geringen Volumen (ca. 300  $\mu$ L). Die infizierten Platten/Flaschen wurden eine Stunde lang alle 10 Minuten geschwenkt. Je nachdem mit welchem Hintergrund der Versuch durchgeführt wurde, wurde nach einer Stunde entweder mit Medium auf das gewünschte Volumen aufgefüllt oder das Medium wurde durch Frisches (evtl. mit Autophagieinhibitoren etc.) ersetzt. Danach wurden die Zellen für die gewünschte Zeitspanne weiter im Inkubator belassen.

### 3.2.1.2 Semiadhärente Zellen

Die Zellen wurden vorsichtig abgespült oder abgeschabt und gezählt. Die benötigte Zellzahl wurde in ein 15 mL-Falcon überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Infektion der Zellen erfolgte mit der jeweils benötigten MOI in dem verbleibendem Restvolumen (ca. 200  $\mu$ L). Die Falcons wurden eine Stunde alle 10 Minuten geschwenkt. Anschließend wurden die infizierten Zellen mit dem gewünschten Volumen in Lochplatten überführt, wobei  $1 \times 10^6$  Zellen/mL ausplattiert wurden. Die Lochplatten wurden für die gewünschte Infektionszeit im Inkubator belassen.

## 3.2.2 Amplifikation der Viren

### 3.2.2.1 Herstellung der *Crude Stocks*

Amplifiziert wurden MVA-sBnsOVA/LC3\_P11 Klon 2 und 3 sowie MVA-sBnsOVA\_P11 Klon 1.

Die Amplifikation erfolgte – im Gegensatz zum gewöhnlichen Verfahren, bei dem CEF Zellen verwendet werden - mit DF-1 Zellen, welche am Vortag ausgesät wurden. Der Titer der vorhandenen Virusstocklösungen betrug ca.  $1 \times 10^7$  / 100 mL. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von ca. 1. Pro Klon wurde zunächst eine T175 Flasche infiziert, um ausreichend Infektionsmaterial für die nächsten Schritte zu erhalten. Nach dem Eintreten des zytopathischen Effektes wurden die infizierten Zellen vorsichtig vom Boden abgeschabt und in ein Falcon überführt. Es folgte ein dreimaliges Gefriertauen bei  $-80^\circ\text{C}$ . Abschließend erfolgte 3 Mal für je eine Minute eine Behandlung mit Ultraschall, um die Membranen aufzubrechen.

Für die Herstellung des *Crude Stocks* wurden pro Klon 15 Stück der ebenfalls am Vortag vorbereiteten T175 Flaschen mit dem gewonnenen Virusmaterial infiziert. Nach Eintreten des zytopathischen Effektes wurden die virusinfizierten Zellen - wie oben beschrieben - geerntet und abzentrifugiert (4000 U/min, 10 Min.,  $4^\circ\text{C}$ ). Die Pellets wurden gepoolt und in 10 mL Tris-Lösung (Trishydroxymethylaminomethan) (1mM, pH 9) resuspendiert. Nach dreimaligem Gefriertauen und einer abschließenden dreiminütigen Behandlung im Ultraschallbad konnten die *Crude Stocks* bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert werden.

### 3.2.2.2 Virusaufreinigung

Aufgereinigt wurden MVA-sBnsOVA/LC3\_P11 Klon 3 und MVA-sBnsOVA\_P11 Klon 1. Die Aufreinigung der Viren erfolgte über Sucrose-Kissen.

Die *Crude Stocks* wurden drei Mal für 15 Sekunden offen im Ultraschallbad behandelt und anschließend abzentrifugiert (4000 U/min, 5 Min.,  $4^\circ\text{C}$ ). Der Überstand wurde auf Eis

verwahrt. Das Pellet wurde in 35 mL Tris-Lösung (10mM, pH 9) resuspendiert und erneut drei Mal für 15 Sekunden offen im Ultraschallbad behandelt. Wieder wurde abzentrifugiert (4000 U/min, 5 Min., 4°C) und die Überstände wurden auf Eis verwahrt.

Anschließend wurden Polyallomerröhrchen (25 x 89 mm) mit 25 mL 36%-iger Sucroslösung gefüllt und die Virusüberstände, welche die Vironen enthielten, gleichmäßig darauf verteilt. Nach einer Ultrazentrifugation (13500 U/min, 60 Min., 4°C) wurden die Pellets in 12 mL Tris-Lösung (10 mM, pH 9) resuspendiert.

Nachfolgend wurden Polyallomerröhrchen (16 x 104 mm) mit 12 mL 36%-iger Sucroslösung gefüllt und das zuvor gewonnene Material wurde gleichmäßig auf die Sucrose-Kissen verteilt. Nach erneuter Ultrazentrifugation (13500 U/min, 60 Min., 4°C) wurden die Pellets in 5 mL Tris-Lösung (1 mM, pH 9) resuspendiert. Das aufgereinigte Virus wurde adequotiert (0,5 mL pro Kryoröhrchen) und bei -80°C gelagert.

### 3.2.3 Virustitration

Am Vortag wurden DF-1 Zellen in 96-Mikro-Loch-Platten mit flachem Boden ausgesät. Hierfür wurde RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*)-Medium verwendet, welchem 2% FCS (Fetales Kälberserum) zugesetzt worden war (100 µL/Loch). Von der Virussuspension wurden Verdünnungen von  $10^{-6}$  bis  $10^{-11}$  angelegt. Pro Verdünnungsschritt wurden 16 Löcher mit je 100 µL/Loch infiziert. Ab Tag vier bis einschließlich Tag sieben wurde die Entwicklung von Virus Plaques (zytopathischer Effekt) mikroskopisch kontrolliert. Löcher, die mindestens einen Plaque aufwiesen, wurden als positiv gewertet. Anhand der Anzahl der infizierten Löcher konnte der Virustiter nach dem Spearman-Kärber-Algorithmus kalkuliert werden, welcher von Hierholzer und Killington 1996 erstmals beschrieben wurde (*Virology Methods Manual*, p. 374) (175).

Bei dem ermittelten Wert handelte es sich um den TCID<sub>50</sub>, welcher als die Virusmenge definiert ist, welche benötigt wird, um 50% der Gewebszellen zu infizieren.

### 3.2.4 Wachstumskurve (One step growth curve):

Mit der Wachstumskurve kann ermittelt werden, welche Menge an Virus pro infizierter Zelle produziert wird. Auch dies geschah mit Hilfe von DF-1 Zellen, welche am Vortag in 6-Loch-Platten ausgesät wurden. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 10. Die Ernte fand nach 0, 4, 8 und 24 Stunden statt.

Die sich anschließende Titration erfolgte mit DF-1 Zellen in 96-Mikro-Loch-Platten mit flachem Boden. Benutzt wurden pro Loch 100 µL RPMI-Medium, welchem 2% FCS

zugesetzt war. Es wurden Verdünnungen von  $10^{-3}$  bis  $10^{-9}$  angelegt. Pro Verdünnungsschritt wurden 16 Löcher mit je 100  $\mu\text{L}$ /Loch infiziert. Ab Tag vier bis einschließlich Tag sieben wurde die Entwicklung von Virus Plaques (zytopathischer Effekt) mikroskopisch kontrolliert. Löcher, die mindestens einen Plaque aufwiesen, wurden als positiv gewertet. Der Virustiter wurde für die verschiedenen Zeitpunkte nach der oben beschriebenen Formel (Punkt 3.2.3) berechnet und graphisch dargestellt.

## 3.3 Immunologische Methoden

### 3.3.1 PCR

#### 3.3.1.1 Virale DNA Extraktion von infizierten Zellen

DF-1 Zellen wurden in eine 6-Loch-Platte ausgesät und am nächsten Tag infiziert. Vierundzwanzig Stunden später erfolgte die Ernte in 400  $\mu\text{L}$  sterilem Milli-Q Wasser in ein 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäß. Es wurden 50  $\mu\text{L}$  10x TEN hinzugefügt. Nach dreimaligem Gefriertauen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  wurde die Suspension gevortext und abzentrifugiert. Der Überstand wurde zusammen mit 23  $\mu\text{L}$  20% SDS (Natriumlaurylsulfat) und 50  $\mu\text{L}$  Proteinase K in ein neues 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden für 4 Stunden bei  $56^{\circ}\text{C}$  in einem Schüttler inkubiert. Um die DNA zu extrahieren, wurden anschließend 500  $\mu\text{L}$  Phenolchloroform hinzugefügt. Nach einer Zentrifugation (14800 U/min, 2 Min.,  $4^{\circ}\text{C}$ ) wurde der Überstand in ein neues 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäß pipettiert und erneut mit Phenolchloroform extrahiert. Wiederrum wurde der Überstand abgenommen und zusammen mit einem Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3-molaren Natriumacetat (pH 7,5) in ein neues 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde für eine Stunde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlt und nachfolgend zentrifugiert (14800 U/min, 10 Min.,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Das Zellpellet wurde in 70%-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in 50  $\mu\text{L}$  PCR-Wasser resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.3.1.2 Durchführung der PCR

Es erfolgte eine Amplifikation der DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Einem  $\mu\text{L}$  der DNA wurde ein Master Mix bestehend aus folgenden Komponenten hinzugefügt:

12,5  $\mu\text{L}$  Dream Taq, 1,25  $\mu\text{L}$  Forward Primer, 1,25  $\mu\text{L}$  Reverse Primer und 10  $\mu\text{L}$  PCR Wasser. Im Anschluss konnte die DNA innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert werden. Die Zyklen sahen nach einem anfänglichen fünfminütigen Denaturierungsschritt bei  $94^{\circ}\text{C}$  oder  $95^{\circ}\text{C}$  wie folgt aus:

-> DNA-Denaturierung: 1 Minute bei 94°C oder 95 °C

-> Primer-Annealing: 1 Minute; Temperatur je nach Primer

-> Elongation: 1,5 Minuten bis 4 Minuten bei 72 °C

Am Ende der PCR-Reaktion erfolgte noch ein abschließender Elongationsschritt für 7 Minuten bei 72 °C.

### 3.3.1.3 Auftrennung der DNA-Fragmente im 1% Agarose TBE-Gel

Für die Herstellung des Gels wurde 1% Agarose in TBE aufgekocht. Es wurde 1 Tropfen EZ-Vision DNA Dye pro 100 mL hinzugegeben. Das Gel wurde in die Gelapparatur gegossen und nach der Polymerisation in die Laufkammer gestellt. Diese wurde mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt. Zu den DNA-Proben wurde 10x Ladepuffer hinzugefügt, ehe diese in die Geltaschen pipettiert wurden. Um die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente abschätzen zu können, diente eine 1kb DNA-Leiter, die mitlief. Die Auftrennung erfolgte bei: Volt: 100, Milliampere: 1500, Watt: 300, Zeit: 1,5 Stunden.

Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

## 3.3.2 Western Blots:

### 3.3.2.1 Herstellung der Zelllysate

Die Infektion erfolgte - wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben - in 6-Loch-Platten. Die infizierten Zellen wurden geerntet und zentrifugiert (1500 U/min, 5 Min., 4°C). Der Überstand wurde bei Bedarf nach nochmaliger Zentrifugation (14000 U/min, 10 Min., 4°C) verwahrt. Das Zellpellet wurde in kaltem PBS gewaschen und in 80 µL TYR-Lysepuffer resuspendiert. Anschließend konnten die Proben bei -20°C gelagert werden.

In einigen Fällen wurden die Zellen mit Saponin permeabilisiert. Hierbei wurde das Zellpellet nach dem Waschschrift für zwei Minuten mit 300 µL 0,05% Saponin behandelt, ehe es erneut mit PBS gewaschen wurde, um die Reaktion zu stoppen. Im Anschluss wurde dieses ebenfalls in 80 µL TYR-Lysepuffer resuspendiert

### 3.3.2.2 Proteinauftrennung und -transfer auf die Membran

Für die Auftrennung der Proteine wurde die vertikale SDS-polyacrylamid Gelelektrophorese nach Lämmli eingesetzt. Es wurde eine Gelkassette vorbereitet, welche aus dem unten gelegenen Trenngel und dem oben gelegenen Sammelgel bestand. Diese wurde in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Die Elektrodenkammer wurde mit Elektrodenpuffer (1x Lämmli) gefüllt.

Die Proben wurden zunächst 3 Mal gefriertaut und anschließend 3 Mal für je eine Minute mit Ultraschall behandelt, um die Membranen aufzubrechen. Nach einer Zentrifugation (14000 U/min, 10 Min., 4°C) wurde der Überstand in neues 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden die Proteine denaturiert, indem je 25 µL der Probe mit 5 µL Ladepuffer (5x) für fünf Minuten bei 95°C aufgekocht wurden. Nachfolgend wurden die Proben nach einer kurzen Zentrifugation (14000 U/min, 1 Min., 4°C) in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Bei jedem Gel lief ein Marker mit, damit im Anschluss die Proteingröße bestimmt werden konnte.

Die Herstellung der Gele (in der Arbeit wurden ausschließlich 10%-ige verwendet; je nach Probenumfang klein oder groß) und Auftrennung der Proteingemische erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Trenngel	Kleines Gel	Großes Gel
PAA-30	6 mL	33,2 mL
2M Tris pH 8,8	3,75 mL	21 mL
20% SDS	90µL	498 µL
Wasser	8 mL	44 mL
TEMED	36µL	199 µL
10% APS	216 µL	1194 µL

Sammelgel	Kleines Gel	Großes Gel
PAA-30	1,5 mL	6 mL
0,5 M Tris pH 6,8	1,2 mL	4,8 mL
20% SDS	45 µL	180 µL
60% Saccharose	2,1 mL	8,4 mL
Wasser	4,2 mL	16,8 mL
TEMED	12 µL	52 µL
10% APS	120 µL	480 µL

Auftrennung	Kleines Gel	Großes Gel
Volt	300	150
Milliampere	60	15
Zeit	60 min.	14 h (über Nacht)

Nach Beendigung der Auftrennung wurde das Gel mit Blottingpuffer gespült und in eine Transferkammer gelegt. Diese bestand (von der Anode zur Kathode) aus drei Whatman-

Filter-Papieren, einer Nitrocellulosemembran, dem Gel und drei weiteren Whatman-Filter-Papieren, welche zuvor ebenfalls in Blottingpuffer getränkt wurden. Die Übertragung der Proteine vom Gel in die Membran erfolgte bei: Volt: 16, mVA: 3000, Watt: 300, Zeit: 70 Minuten. Um zu überprüfen, ob der Proteintransfer funktioniert hat, wurde die Membran für 2-3 Minuten mit Ponceau-Lösung angefärbt. Im Anschluss wurde die Membran 3 Mal mit 1 x TBST-Puffer gewaschen und entweder mit 2,5% Milchpulver in TBST (*Tris-buffered saline*) oder 5% BSA (Rinderserumalbumin) in TBST geblockt. Dies erfolgte entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

### 3.3.2.3 Inkubation mit Antikörpern:

Direkt im Anschluss an das Blocken wurde die Membran mit dem primären Antikörper inkubiert. Dies erfolgte ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran zwei Mal für 5 Minuten mit TBST gewaschen. Danach wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde die Membran drei Mal für 10 Minuten mit TBST gewaschen und kurz mit Whatman-Filter-Papier getrocknet. Anschließend wurde für drei Minuten mit Lumi-Light Western Blotting Substrat inkubiert.

Da das Ovalbuminsignal der Viren MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 sehr schwach und kaum zu detektieren war, musste die Membran in diesem Falle mit zwei primären Antikörpern inkubiert werden. Zunächst wurde hierfür ein ovalbuminspezifischer Antikörper (Kaninchen) verwendet. Nach dem Waschen und der Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen Kaninchen), erfolgte direkt die Inkubation mit einem zweiten ovalbuminspezifischen Antikörper (Maus), ehe die Membran erneut gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen Maus) inkubiert wurde. Erst diese Doppelbehandlung machte die Detektion des sehr schwachen Ovalbuminsignals möglich.

### 3.3.3 Restimulation von T-Zellen

Die Restimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte alle 14 Tage. Hierfür wurden Splenozyten von CD11c-Cre<sup>-/-</sup> Mäusen oder C57BL/6 J Mäusen verwendet.

Die Milz wurde entnommen und homogenisiert. Anschließend wurde die Zellsuspension steril filtriert und zentrifugiert (1500 U/min, 5 Min.). Das Zellpellet wurde eine Minute mit Lysepuffer behandelt. Gestoppt wurde die Reaktion mit 45 mL PBS. Die Zellsuspension wurde erneut steril filtriert und zentrifugiert (1500 U/min, 5 Min.). Danach wurde das Zellpellet in 20 mL M2-Medium resuspendiert und mit 30 Gray bestrahlt. Anschließend

wurden die Splenozyten in frischem M2-Medium auf  $12 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt.

Die Beladung mit dem spezifischen Peptid ( $2 \mu\text{g/mL}$ ) erfolgte für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$ . Danach wurden die Splenozyten zwei Mal gewaschen.

Die T-Zellen der vorangegangenen Passage wurden geerntet, gepoolt und zentrifugiert. Bei jeder Restimulation wurde in einem Verhältnis von 1:2 gesplittet. In ein Loch einer 24-Loch-Platte wurden  $6 \times 10^6$  bestrahlte und peptidbeladene Splenozyten,  $1 \times 10^6$  bis  $2 \times 10^6$  T-Zellen und 0,5% TCGF (T-Zell-Wachstumsfaktor) gegeben. Die Zellen wurden für die nächsten 14 Tage in einem Zellkulturinkubationsschrank kultiviert. Drei Tage nach der Restimulation konnten die T-Zellen eingefroren oder an Tag 12 nach der Restimulation benutzt werden.

Beim TCGF handelte es sich um aufbereitetes Medium aus dem Überstand von Splenozyten aus der Ratte, die mit  $5 \mu\text{g/mL}$  Concanavalin A stimuliert wurden. Dies wurde bereits beschrieben (176).

### 3.3.4 Peptidstimulation von T-Zellen im Versuch

Verwendet wurden folgende Verdünnungen (in M2-Medium):  $10^{-5}$  ( $2 \mu\text{g/mL}$ ),  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ . Die Kontrollpeptide wurden in der  $10^{-5}$ -Verdünnung verwendet.

BMDCs wurden geerntet und auf  $4 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt. Vier  $\times 10^5$  BMDCs ( $100 \mu\text{L}$ ) wurden mit der entsprechenden Peptidverdünnung ( $100 \mu\text{L}$ ) in ein 96-V-Loch einer 96-Mikro-Loch-Platte gegeben. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und danach zwei Mal mit M2-Medium gewaschen. T-Zellen wurden geerntet und auf  $2 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt. Es wurden  $2 \times 10^5$  T-Zellen ( $100 \mu\text{L}$ ) sowie  $100 \mu\text{L}$  Brefeldin A in einer Endkonzentration von  $1 \mu\text{g/mL}$  in jedes Loch hinzugegeben. Daran schloss sich eine vierstündige Inkubation im Inkubationsschrank an. Die Stimulation der T-Zellen wurde mittels intrazellulärer Zytokinfärbung analysiert.

### 3.3.5 T-Zellstimulation mit infizierten APC

BMDCs wurden in ein 15 mL-Falcon geerntet, auf  $1 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt und abzentrifugiert. Die Infektion mit den entsprechenden Viren erfolgte in dem verbleibenden Restvolumen (ca.  $200 \mu\text{L}$ ) mit einer MOI von 10. Nach einer Stunde wurde das Volumen auf 1 mL aufgefüllt. Ein  $\times 10^5$  Zellen ( $100 \mu\text{L}$ ) wurden in die Löcher einer 96-V-Mikro-Loch-Platte pipettiert und für weitere 7 Stunden inkubiert. Die T-Zellen wurden geerntet und auf  $4 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt. Es wurden  $2 \times 10^5$  T-Zellen ( $50 \mu\text{L}$ ) sowie  $50 \mu\text{L}$  Brefeldin A in einer Endkonzentration von  $1 \mu\text{g/mL}$  in jedes Loch hinzugefügt. Nach einer 14-stündigen Inkubation wurde die Stimulation der T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung

analysiert.

### 3.3.6 Intrazelluläre Zytokinfärbung

#### 1. EMA-Färbung:

Nachdem die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen wurden, wurden sie in 1 µg/mL EMA (*Ethidium monoazide bromide*) (1:2000 in FACS-Puffer) für 20 Minuten unter starkem Licht auf Eis inkubiert. Dadurch werden die toten Zellen gefärbt. Anschließend wurde 2,5 Mal mit 180 µL FACS-Puffer gewaschen.

#### 2. Oberflächenfärbung:

Die nachfolgenden Schritte wurden in der Dunkelheit und ebenfalls auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Oberflächenmarker CD4 (50 µL; 1:300 in FACS-Puffer) für 30 Minuten gefärbt. Daran anschließend wurden die Zellen 2,5 Mal mit 180 µL FACS-Puffer gewaschen.

#### 3. Fixierung und intrazelluläre Zytokinfärbung:

Um die Zellen zu fixieren und zu permeabilisieren wurden sie für 15 Minuten mit 100 µL Cytofix/Cytoperm inkubiert und im Anschluss 1,5 Mal mit 150 µL Perm/Wash-Puffer gewaschen. Es schloss sich die Inkubation mit Antikörpern gegen IFN-γ und IL-2 (50 µL; 1:300 in Perm/Wash-Puffer) für 30 Minuten an. Danach wurden die Zellen 2,5 Mal mit 180 µL Perm/Wash-Puffer gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in 1% PFA (150 µL FACS-Puffer + 150 µL 2% PFA) fixiert.

### 3.3.7 Konfokale Mikroskopie

Die Infektion der am Vortag auf Deckgläser ausgesäten adhären Zellen erfolgte mit einer MOI von 10. Nach ausreichender Infektionszeit wurden die Zellen 2x mit kaltem PBS gewaschen. Wenn indiziert, wurden sie im Anschluss für zwei Minuten mit 0,05% Saponin (in PBS) behandelt. Saponin entfernt selektiv Cholesterin aus der Membran. Die Wirkung ist reversibel. Um die Reaktion zu stoppen, wurde mit einem Milliliter PBS aufgefüllt und die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen, um intrazelluläre nicht membrangebundene Proteine zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen fixiert, indem sie mit kaltem 4% PFA bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert wurden.

Um die Zellmembran zu permeabilisieren, wurden die fixierten Zellen für drei Minuten mit 0,25% Triton X-100 (in PBS) behandelt und anschließend drei Mal mit PBS gewaschen.

Triton X-100 bildet unspezifisch Poren in der Zellmembran, welche irreversibel sind und somit einen Zugang für Antikörper in den intrazellulären Raum darstellen. Um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu vermeiden, wurde mit 5% FCS (in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die primären Antikörper wurden in 1% FCS (in PBS) verdünnt. Die Inkubation erfolgte im Dunklen über Nacht bei vier Grad oder bei Raumtemperatur für eine Stunde. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit 1% FCS (in PBS) gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (ebenfalls in 1% FCS in PBS verdünnt) erfolgte für eine Stunde in der Dunkelheit bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen erneut drei Mal mit 1% FCS (in PBS) in der Dunkelheit gewaschen. Ebenfalls im Dunklen erfolgte die Färbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), welches sich im Eindeckmedium befand. Abschließend wurden die Deckgläser mit Nagellack fixiert. Die Proben wurden bei 4°C im Dunklen gelagert.

## 4 Ergebnisse

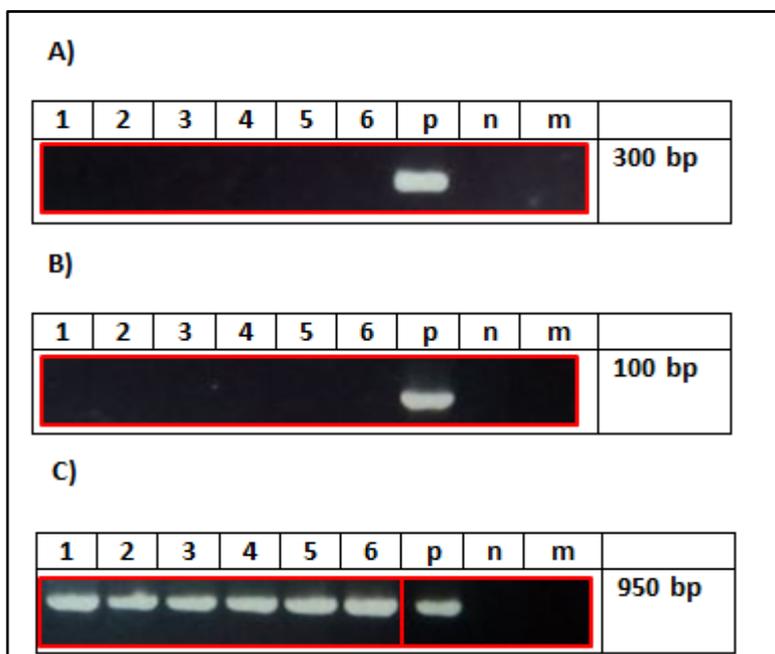
### 4.1 Charakterisierung der MVA Viren

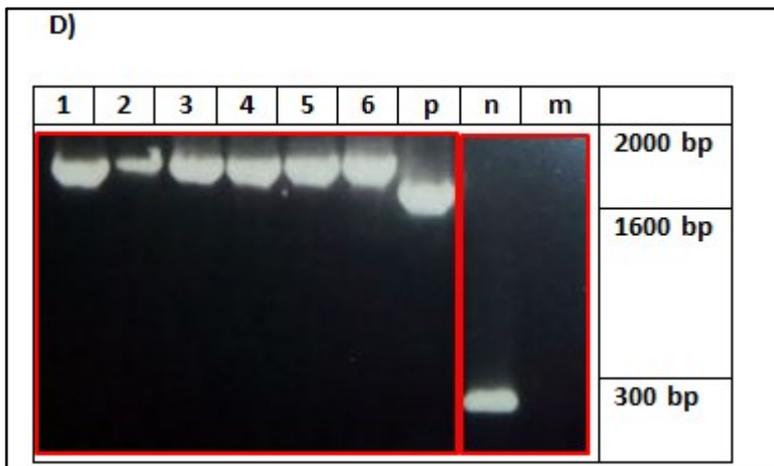
#### 4.1.1 Nachweis des Fusionsgens in Deletion VI

Zuerst sollte mit Hilfe einer PCR sichergestellt werden, dass das neu generierte Virus MVA-sBnsOVA/LC3\_P11, welches im Rahmen vorheriger Arbeiten in dem Labor generiert und mir jetzt zur Verfügung gestellt wurde, auf genetische Ebene korrekt ist.

Um auf ein ausreichend großes Repertoire zurückgreifen zu können, sind von MVA-sBnsOVA/LC3\_P11 sechs Klone hergestellt worden. Diese sind in den Abbildungen 3 A-D jeweils mit den Ziffern 1-6 gekennzeichnet. Jedem Ansatz wurde zudem eine Positiv (p)- und eine Negativkontrolle (n) sowie eine Mock-Kontrolle (m) hinzugefügt. Für die Mock-Kontrolle wurde immer PCR-Wasser und für die Negativkontrolle der MVA-Wildtyp verwendet.

Es zeigte sich, dass MVA-sBnsOVA/LC3\_P11 keine Reste des Helfervirus *rabbit fibroma virus* (RFV) enthielt und der Mini-F-Vektor erfolgreich eliminiert werden konnte (beides wurde zur Herstellung des Virus benötigt). nsOVA und LC3 bilden einen gemeinsamen offenen Leserahmen und befinden sich in Deletion VI (Abbildung 3 A-D)





**Abbildung 3: Erfolgreiche Integration von nsOVA/LC3 in Deletion VI von MVA**

Gezeigt sind die Ergebnisse der PCR Analyse, welche die korrekte Insertion des Transgens in das Genom von MVA-sBnsOVA/LC3\_P11 nachweist. Die DNA wurde jeweils von unterschiedlichen Klonen extrahiert, mit Hilfe der PCR vervielfältigt und durch Elektrophorese aufgetrennt. A) MVA-sBnsOVA/LC3\_P11 ist frei von RFV (Positivkontrolle: RFV Wildtyp); B) MVA-sBnsOVA/LC3\_P11 ist frei vom Mini-F-Vektor (Positivkontrolle: Bac-DNA); C) Im MVA-sBnsOVA/LC3\_P11 sind nsOVA und LC3 miteinander fusioniert (Positivkontrolle: Bac-DNA); D) Die Expressionskassette mit dem Fusionsprodukt befindet sich in der Deletion VI (Positivkontrolle: MVA-sBnsOVA\_P11).

Abkürzungen: 1-6 = Klon (MVA-sBnsOVA/LC3\_P11) 1–6, p = Positivkontrolle, n = Negativkontrolle (MVA-Wildtyp), m = Mock (PCR-Wasser).

#### 4.1.2 Ermittlung der Virustiter

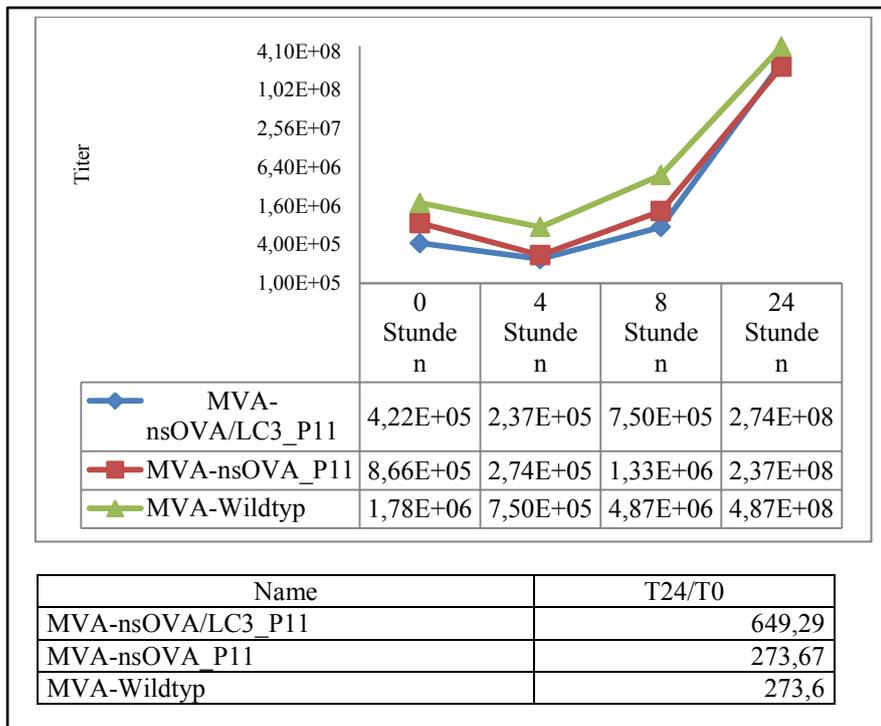
Die Virustitration erfolgte wie unter Punkt 3.2.3 beschrieben. Es konnten folgende Virustiter ermittelt werden:

-> MVA-sBnsOVA/LC3\_P11:  $2,37 \times 10^{10}$

-> MVA-sBnsOVA\_P11:  $2,74 \times 10^{10}$

#### 4.1.3 Vergleichbares Wachstum von MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11

Um zu ermitteln, welche Menge an Virus pro infizierter Zelle produziert wird, wurde eine Wachstumskurve - wie unter Punkt 3.2.4 beschrieben - angelegt. Es zeigte sich, dass MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 ein vergleichbares Wachstum aufwiesen. Verglichen mit dem Wildtyp wurden zu den anfänglich gemessenen Zeitpunkten jedoch etwas weniger Viren nachgewiesen (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Vergleichbares Wachstum von MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11**

DF-1 Zellen wurden mit den dargestellten Viren mit einer MOI von 10 infiziert. Die Ernte erfolgte nach 0, 4, 8 und 24 Stunden. Es folgte eine Titration in DF-1 Zellen in den Verdünnungen  $10^{-3}$  bis  $10^{-9}$  der zuvor geernteten Zellen. Ab Tag vier bis einschließlich Tag sieben wurden die Löcher auf die Entwicklung von Virus Plaques kontrolliert. Hieraus wurde der Titer - wie unter Punkt 3.2.3 beschrieben - berechnet. Außerdem wurde die T24/T0 für die Viren berechnet.

#### 4.1.4 Proteinnachweis mit Hilfe der Western Blot Analyse

Es sollte überprüft werden, ob MVA-infizierte Zellen in der Lage sind, das Fusionsprotein zu synthetisieren und, ob es erwartungsgemäß nicht sezerniert wird. Untersuchungen hierzu erfolgten zum einen mit einer humanen Zelllinie (HeLa) und zum anderen mit murinen Zelllinien (DC 2.4, BMDC)

##### 4.1.4.1 nsOVA/LC3 und nsOVA werden nicht sezerniert

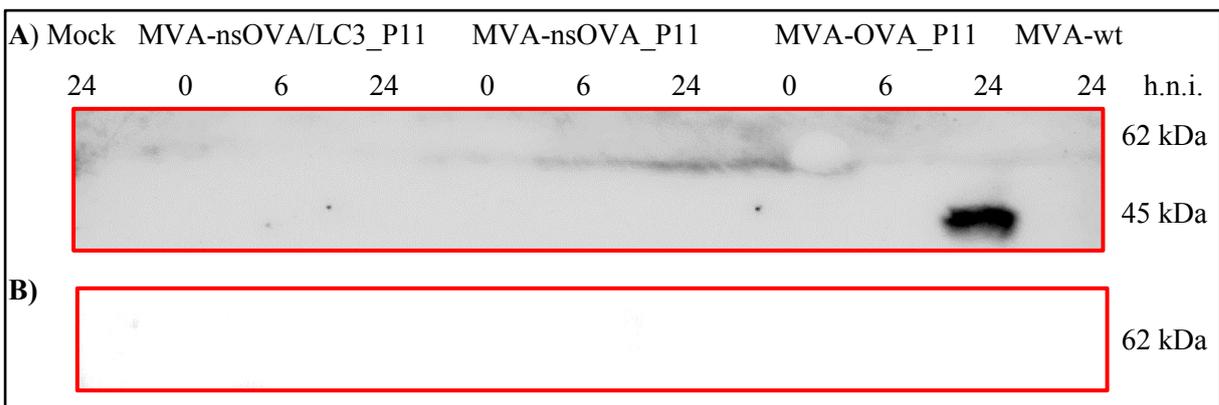
Die drei oben genannten Zelllinien wurden mit einer MOI von 10 infiziert. Neben den beiden zu untersuchenden Viren (MVA-nsOVA/LC3\_P11, MVA-nsOVA\_P11) wurde MVA-OVA\_P11 als Positivkontrolle und MVA-Wildtyp (MVA-wt) als Negativkontrolle verwendet. Nach 0, 6 und 24 Stunden wurde der Überstand der infizierten Zellen abgenommen und mit Hilfe der Western Blot Analyse auf die Expression von Ovalbumin untersucht.

Es konnte bei allen drei Zelllinien gezeigt werden, dass nur diejenigen Zellen, die mit MVA-OVA\_P11 infiziert wurden nach 24 Stunden in der Lage waren, Ovalbumin zu sezernieren.

Sechs Stunden nach der Infektion gelang dieser Nachweis allerdings noch nicht (Abbildung 5 A, HeLa-Zellen).

In einem weiteren Schritt wurde der Überstand auch hinsichtlich der Expression von LC3 untersucht; hier konnten keinerlei Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 5 B, HeLa-Zellen), wodurch bestätigt wurde, dass das Fusionskonstrukt nsOVA/LC3 nicht sezerniert wird.

Das Entfernen der Sekretionssequenz von Ovalbumin mit dem Ziel, das Vorkommen des Proteins auf das Zytosol zu beschränken, war somit erfolgreich gewesen.



**Abbildung 5: nsOVA/LC3 und nsOVA werden nicht sezerniert**

HeLa-Zellen wurden mit den dargestellten Viren mit MOI 10 infiziert und in 6-Loch-Platten kultiviert. Die Überstände wurden nach 0, 6 und 24 Stunden abgenommen und mit Hilfe der Western Blot Analyse auf das Vorhandensein von Ovalbumin (OVA) und nicht sekretierenden Ovalbumin (nsOVA) (ca. 45 kDa) sowie nsOVA/LC3 (ca. 62 kDa) analysiert.

A) Antikörper gegen Ovalbumin; B) Antikörper gegen LC3; Abkürzungen: h.n.i. = Stunden nach der Infektion.

#### 4.1.4.2 nsOVA/LC3 und nsOVA werden in der Zelle synthetisiert

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob nsOVA/LC3 bzw. nsOVA im Zytosol der Zelle nachweisbar sind. Hierfür wurden HeLa-Zellen und BMDCs für 24 Stunden mit den in Abbildung 6 dargestellten Viren infiziert. Teilweise wurden 5µM Epoxomicin hinzugefügt. Epoxomicin ist ein selektiver, spezifischer und irreversibler Inhibitor des Proteasoms (177). Durch die Inhibition einer der beiden Hauptwege, die in eukaryontischen Zellen für die Degradation von Proteinen verantwortlich sind, wurde eine Akkumulation der Proteine und damit eine bessere Detektion der Proteinbanden angestrebt. Da dieser Inhibitor jedoch die mittlere und späte Genexpression von Vaccinia Virus inhibiert, erfolgte die Zugabe erst nach 5 Stunden (178).

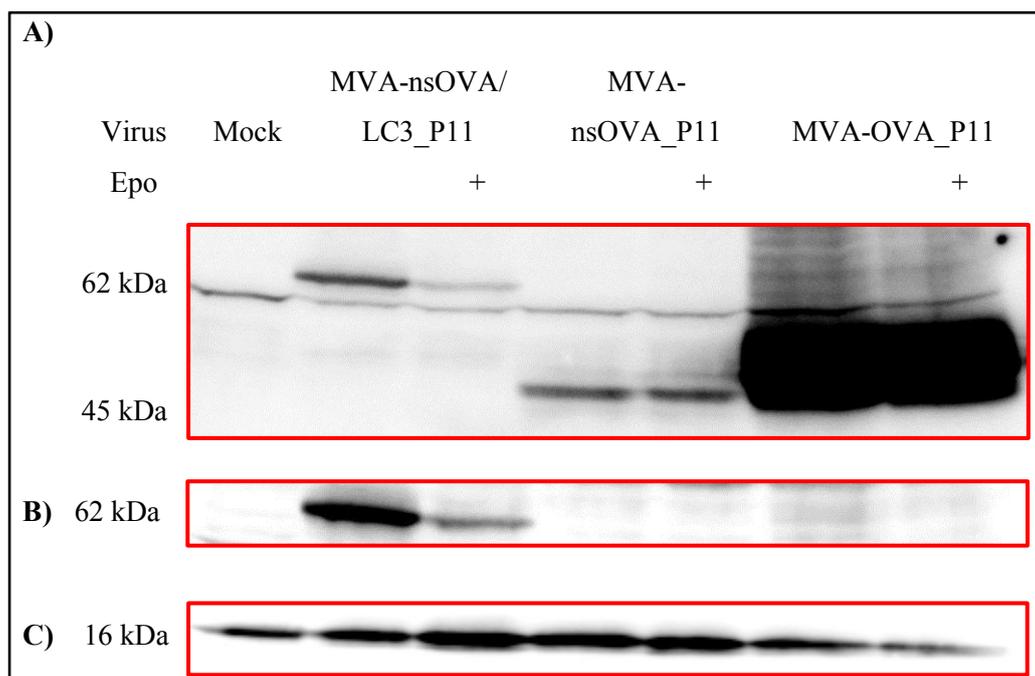
Wie aus der Abbildung 6 A hervorgeht, kann im Lysat der HeLa Zellen die Synthese von sowohl nsOVA/LC3 als auch nsOVA nachgewiesen werden. Allerdings war die

Proteinsynthese bei allen Viren unter der Behandlung mit Epoxomicin schwächer als ohne. Gleiches galt für die BMDCs (nicht dargestellt).

Um einen zweifelsfreien Nachweis der Synthese des Fusionskonstruktes zu erbringen, sollte dieses auch mit Hilfe des LC3-spezifischen Antikörpers detektiert werden. Dies gelang sowohl für die HeLa-Zellen (Abbildung 6 B) als auch für die BMDCs (nicht dargestellt). Allerdings zeigte sich auch hier unter Epoxomicinbehandlung eine schwächere Bandenintensität. Es ist zu beachten, dass es unter Epoxomicin zu einer leichten Intensivierung der Bande des endogenen LC3 kam (Abbildung 6 C).

Da Epoxomicin nicht zu der gewünschten Verstärkung der Bandenintensität führte, wurde mit MG 132 ein zweiter Proteasominhibitor getestet. Dies erfolgte mittels HeLa-Zellen und DC 2.4 Zellen. Die Zugabe von MG 132 erfolgte aus den gleichen Gründen auch nach 5 Stunden (178). Hier kam es jedoch ebenfalls unter Verwendung des Inhibitors zu einer Abschwächung der Bandenintensität von nsOVA/LC3, während die des endogenen LC3 nahezu unverändert blieb.

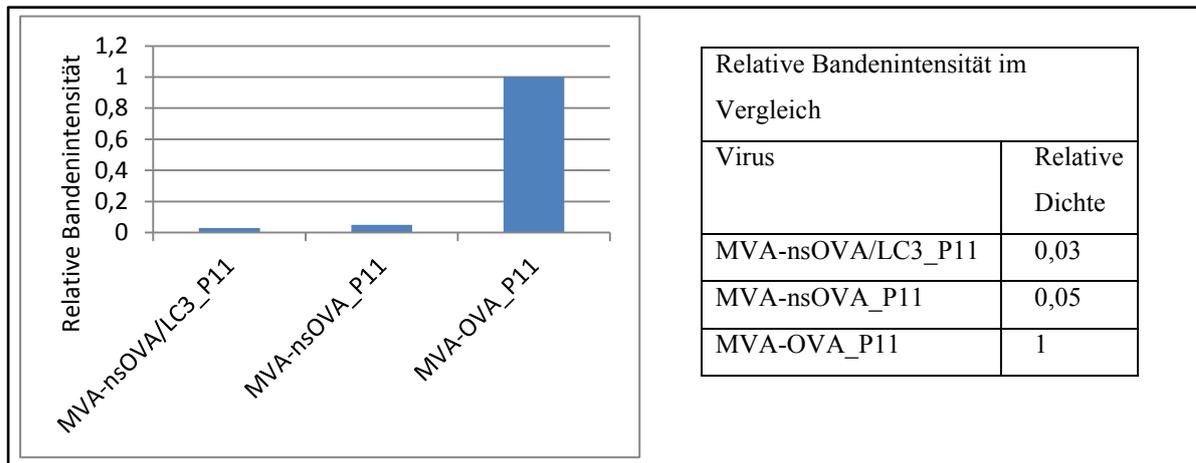
Es ist zu erkennen, dass die OVA-Bande sehr viel stärker ist als die des nsOVA/LC3 bzw. nsOVA. Vor diesem Hintergrund wurde die Bandenintensität vergleichend bestimmt (Abbildung 7). Die Darstellung erfolgte beispielhaft anhand des Western Blots, der mit den HeLa-Zellen durchgeführt wurde, da sich die Proteinbanden hier am besten erfassen ließen, weshalb hier ein repräsentatives Ergebnis erwartet werden kann. Es zeigte sich, dass MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 miteinander vergleichbar sind. Somit können die Viren für die folgenden vergleichenden Analysen verwendet werden.



### Abbildung 6: nsOVA/LC3, nsOVA und OVA können im Zelllysate nachgewiesen werden

HeLa-Zellen wurden mit den dargestellten Viren mit einer MOI von 10 oder mock infiziert und in 6-Loch-Platten kultiviert. Fünf Stunden nach der Infektion wurde zu einigen Ansätzen Epoxomicin hinzugegeben (+). Die Ernte erfolgte nach 24 Stunden. Mit Hilfe der Western Blot Analyse wurde das Vorhandensein von Ovalbumin (OVA) und nicht sekretierenden Ovalbumin (nsOVA) (ca. 45 kDa) sowie nsOVA/LC3 (ca. 62 kDa) bestimmt.

A) Antikörper gegen Ovalbumin; B, C) Antikörper gegen LC3; Abkürzungen: Epo = Epoxomicin.



**Abbildung 7: Die OVA-spezifischen Proteinmengen von MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 sind miteinander vergleichbar**

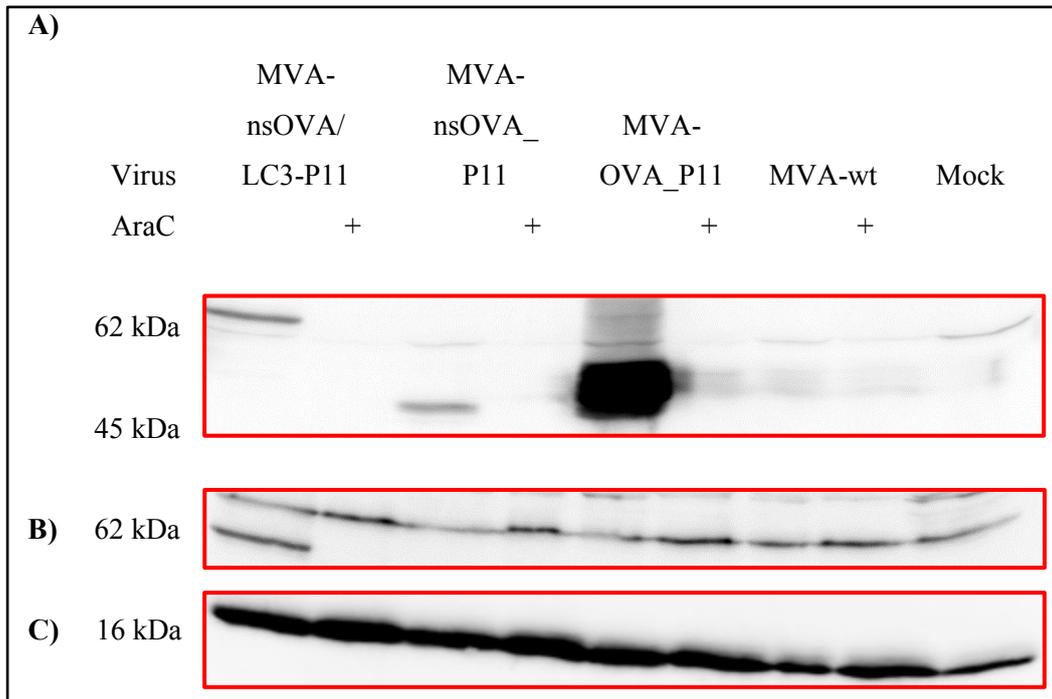
Mit Hilfe der Abbildung 6 A wurde vergleichend die Bandenintensität bestimmt (ohne Epoxomicin).

#### 4.1.4.3 Die Synthese von nsOVA/LC3 und nsOVA wird - wie erwartet - von dem späten Promotor P11 kontrolliert

Um zu prüfen, ob die Synthese der Gene nsOVA/LC3 und nsOVA von dem späten Promotor P11 gesteuert wird, wurde Arabinosid C (AraC) in einer Konzentration von 40 µg/mL bei der Infektion verwendet. AraC blockiert die intermediäre und späte Genexpression von Vaccinia Viren. Somit sollte die Proteinexpression unter der Verwendung von AraC unterdrückt werden.

Um sicherzustellen, dass die Expression der Gene von Beginn an unterdrückt wird, wurden die Zellen eine halbe Stunde vor der Infektion mit AraC inkubiert und anschließend zwei Mal mit AraC-haltigem M2-Medium gewaschen. Die Ernte erfolgte 24 Stunden nach Infektion. Die Analyse wurde mittels Western Blot Analyse mit ovalbumin- und LC3-spezifischen Antikörpern durchgeführt. MVA-OVA\_P11 wurde als Positivkontrolle und MVA-Wildtyp als Negativkontrolle verwendet. Die Abbildungen 8 A und B zeigen, dass mit AraC behandelte HeLa-Zellen nicht in der Lage waren, die unter dem späten Promotor P11 stehenden rekombinanten Gene nsOVA/LC3, nsOVA oder OVA zu exprimieren, während dies ohne Zugabe von AraC möglich war. Dies galt auch für BMDCs und DC 2.4-Zellen (Siehe Anhang

Abbildung 21). In den Blots zeigt sich erneut, dass die Synthese von OVA sehr viel stärker ist als die von nsOVA und nsOVA/LC3.



**Abbildung 8: Der späte Promotor P11 kontrolliert die Expression der rekombinanten Gene**

HeLa-Zellen wurden - wenn indiziert - eine halbe Stunde vor der Infektion mit 40 µg/mL AraC inkubiert und anschließend zwei Mal mit AraC-haltigem M2-Medium gewaschen. Danach wurden sie mit den dargestellten Viren mit einer MOI von 10 oder mock infiziert. Die Ernte erfolgte 24 Stunden nach Infektion. Mit Hilfe der Western Blot Analyse wurde das Vorhandensein von Ovalbumin (OVA) und nicht sekretierendes Ovalbumin (nsOVA) (ca. 45 kDa) sowie nsOVA/LC3 (ca. 62 kDa) bestimmt.

A) Antikörper gegen Ovalbumin; B, C) Antikörper gegen LC3; Abkürzungen: AraC = Arabinosid C.

Anmerkung: Die durchgehende Bandierung oberhalb von LC3 in Abbildung B ist als unspezifischer Hintergrund zu betrachten.

#### 4.1.4.4 nsOVA/LC3 wird im Rahmen der Autophagie partiell in eine membranöse Struktur integriert; Autophagieinhibitoren zeigen eine ungenügende Wirksamkeit

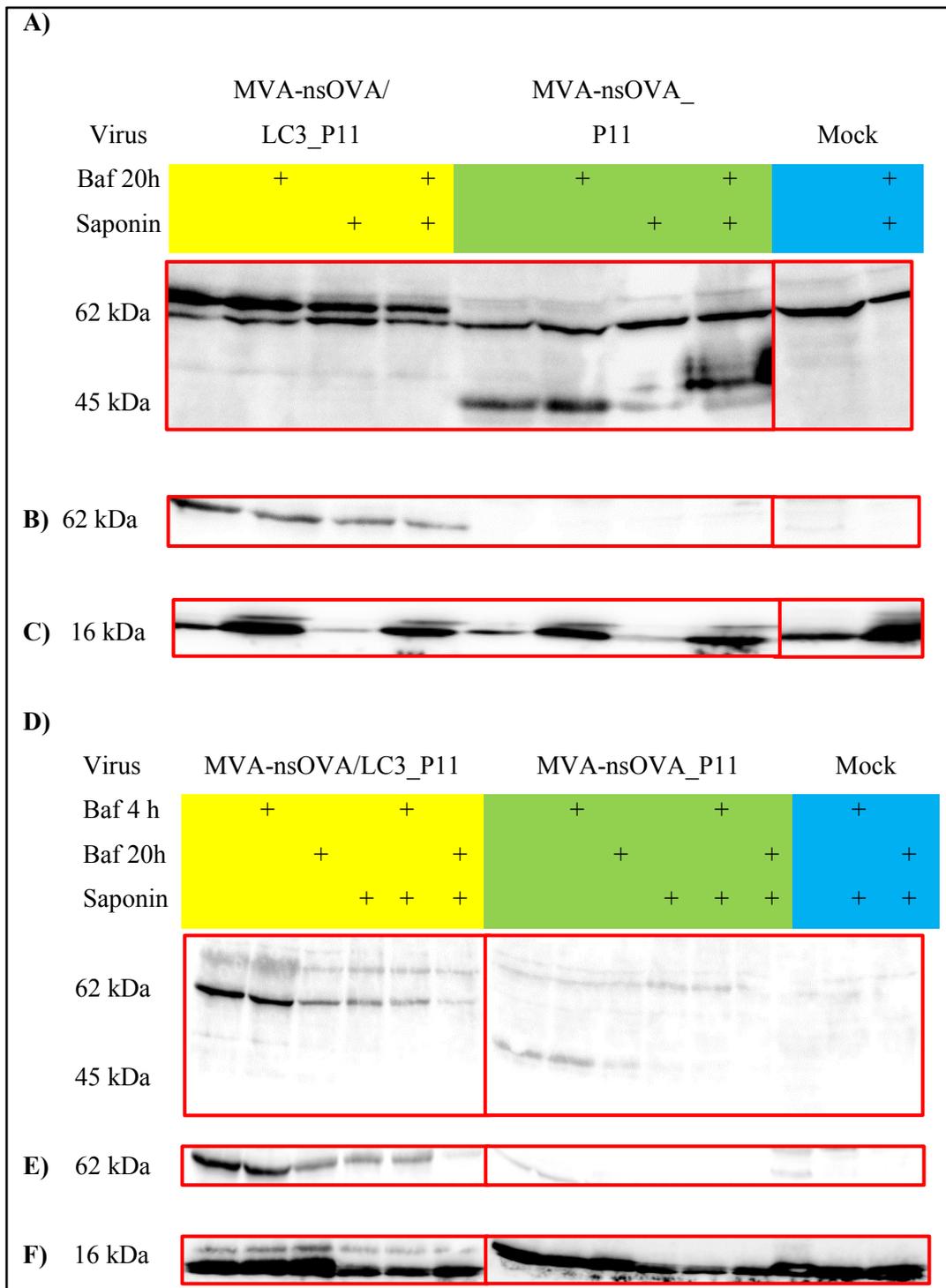
Im Folgendem sollte überprüft werden, ob das an nsOVA fusionierte LC3 funktionell ist und in eine membranöse Struktur integriert wird. Verwendet wurde für den Nachweis u.a. das Detergens Saponin. Dieses entfernt selektiv Cholesterin aus der Membran, wodurch Poren entstehen (179). Während die zytosolischen Proteine auf diese Weise ausgewaschen werden, bleiben die membranständigen Proteine gebunden und können weiterhin nachgewiesen werden.

Mit dem Gedanken, die Proteinbanden besser darstellen zu können, wurden die Zellen mit dem Autophagieflux-Inhibitor Bafilomycin A1 behandelt. Dieser inhibiert H<sup>+</sup>-ATPasen,

wodurch die Ansäuerung des Lysosoms verhindert wird. Infolge dessen kommt es zur Inhibition der Fusion zwischen Autophagosomen und Lysosomen. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation der Autophagosomen und damit des LC3-II bzw. nsOVA/LC3. Die damit einhergehende größere Proteinmenge sollte konsequenter Weise zu einer stärkeren Proteinbande führen. Um mögliche Einflüsse des Bafilomycin A1 auf das Infektionsgeschehen sowie auf die Vitalität der Zellen zu verhindern, wurde dieses 20 bzw. 4 Stunden vor der Ernte in einer Konzentration von 100 nM hinzugefügt. Die Permeabilisierung der Zellen durch Saponin wurde im Rahmen der Herstellung der Lysate realisiert (Siehe Punkt 3.3.2.1).

Unter Verwendung der HeLa-Zellen konnte festgestellt werden, dass auch nach der Behandlung mit Saponin noch relativ viel nsOVA/LC3 nachgewiesen werden konnte (v.a. mit dem Antikörper gegen Ovalbumin), während sich ein deutlich abgeschwächtes Signal für das nsOVA zeigte. Der Behandlung mit Bafilomycin A1 konnte das Fusionsprotein betreffend in diesem Setting weitestgehend kein positiver Effekt zugeordnet werden (Abbildung 9 A, B). Allerdings verhielt sich das endogene LC3 den Erwartungen entsprechend (Abbildung 9 C), da es unter der Verwendung von Bafilomycin A1 zu einer Akkumulation kam und es durch die Behandlung mit Saponin nur bedingt herausgewaschen wurde.

Sowohl bei den DC 2.4 Zellen (Abbildung 9 D, E, F) als auch bei den BMDCs (Siehe Anhang Abbildung 22) führte die Behandlung mit Saponin im Gegensatz zu den HeLa-Zellen zu einer deutlichen Abschwächung des nsOVA/LC3-Signals. Die Behandlung mit Bafilomycin A1 zeigte auch hier keine Vorteile, was die Akkumulation von nsOVA/LC3 betraf. Jedoch kam es auch bei den murinen Zellen unter Verwendung von Bafilomycin zu einer Akkumulation des endogenen LC3, welches durch die Behandlung mit Saponin nur bedingt entfernt werden konnte. Als alternativen Autophagieinhibitor verwendeten wir Chloroquin. Dieses zeigte jedoch die Bandenintensitäten betreffend die gleichen Ergebnisse.



**Abbildung 9: Integration des nsOVA/LC3 in eine membranöse Struktur unter Verwendung von HeLa-Zellen und DC 2.4 Zellen**

HeLa-Zellen (A, B, C) bzw. DC 2.4 Zellen (D, E, F) wurden mit den dargestellten Viren mit einer MOI von 10 oder mock für 24 Stunden infiziert. Zwanzig Stunden (Baf 20h) bzw. 4 Stunden (Baf 4 h) vor der Ernte wurde Bafilomycin A1 in einer Konzentration von 100 nM hinzugefügt. Im Rahmen der Herstellung der Lysate wurde das Zellpellet für zwei Minuten mit 300 µL 0,05% Saponin behandelt. Mit Hilfe des Western Blots wurde das Vorhandensein von nicht sekretierenden Ovalbumin (nsOVA) (ca. 45 kDa) sowie nsOVA/LC3 (ca. 62 kDa) bestimmt.

A, D) Antikörper gegen Ovalbumin; B, C, E, F) Antikörper gegen LC3; Abkürzungen: Baf A1 = Bafilomycin A1.

## 4.2 Aktivitätsnachweis von T-Zellen durch Zytokinproduktion

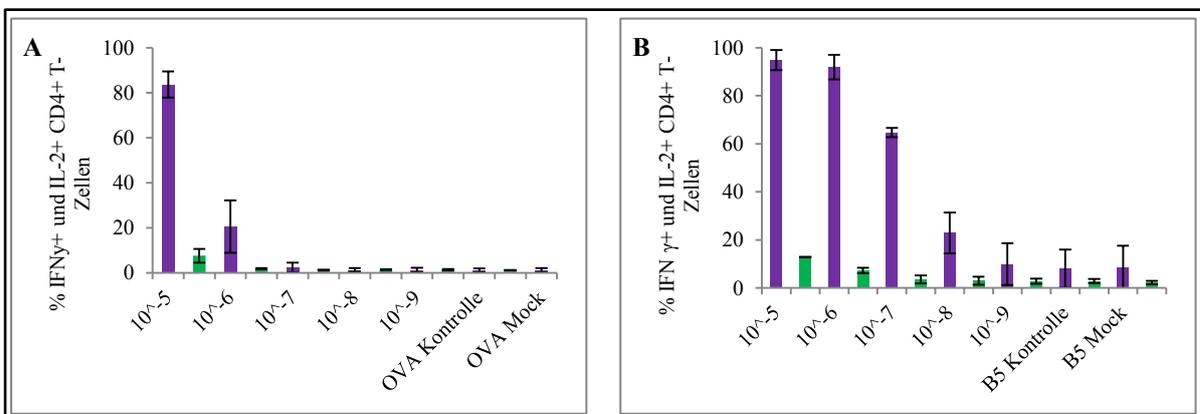
### 4.2.1 Die Funktionalität der T-Zellen ist nicht eingeschränkt

Die antigenspezifischen OVA- und B5-CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien wurden bereits im Rahmen früherer Projekte in dem Labor verwendet. Nachdem die Arbeit mit diesen abgeschlossen war, wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die nachfolgenden Experimente wurden die Zellen in Passage 14 wieder aufgetaut und - wie unter Punkt 3.3.3 beschrieben - alle zwei Wochen restimuliert.

Sechs und acht Wochen nach dem Auftauen erfolgte eine Peptidstimulation, wie unter Punkt 3.3.4 erläutert. Hierbei wurde getestet, ob die antigenspezifischen T-Zellen nach der Erkennung ihrer Peptide durch APZs (in diesem Fall BMDCs) in der Lage sind, IFN- $\gamma$  und IL-2 zu produzieren. Dies wurde mittels intrazellulärer Zytokinfärbung analysiert, wie unter Punkt 3.3.6 beschrieben. Für den ersten Test wurden die konjugierten Antikörper CD4-PO, IFN- $\gamma$ -APC und IL-2-PE benutzt; für den zweiten Test – sowie für allen weiteren T-Zell Versuche - wurden CD4-PB, IFN- $\gamma$ -FITC und IL-2-APC verwendet.

Der Nachweis einer adäquaten Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-2 durch die antigenspezifischen T-Zellen als Antwort auf die Antigenerkennung ist von entscheidender Bedeutung, da die weiteren Versuche auf dieser Methode beruhen. Eine zweifelsfreie Funktionalität der T-Zellen ist hierbei eine wichtige Voraussetzung.

Wie der Abbildung 10 zu entnehmen ist, konnte eine ausreichende Zytokinproduktion nachgewiesen werden. Das Muster der Zytokinbildung durch die T-Zellen war vergleichbar mit dem Profil, bevor die T-Zellen eingefroren worden waren (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 10: OVA- und B5-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzieren antigenspezifisch IFN- $\gamma$  und IL-2**  
 Vier x 10<sup>5</sup> BMDCs wurden mit 100 $\mu$ L der dargestellten Peptidverdünungen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die Kontrollen wurde jeweils das spezifische Peptid gegen ein irrelevantes vertauscht (OVA-Kontrolle: 10<sup>-5</sup>

Verdünnung von B5; B5-Kontrolle:  $10^{-5}$  Verdünnung von OVA); bei mock wurde gar kein Peptid hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von  $2 \times 10^5$  T-Zellen (OVA- oder B5-spezifisch) sowie Brefeldin A in einer Endkonzentration von  $1 \mu\text{g/mL}$ . Nach einer vierstündigen Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung analysiert.

A) Aktivierung OVA-spezifischer  $\text{CD4}^+$  T-Zellen; B) Aktivierung B5-spezifischer  $\text{CD4}^+$  T-Zellen.

Lila:  $\text{IFN-}\gamma$ ; Grün: IL-2. Die Daten wurden in zwei unabhängig durchgeführten Versuchen erhoben und sind zusammen ausgewertet worden. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwerte mit Standardabweichung.

#### 4.2.2 Bafilomycin A1 führt zu einer stark reduzierten OVA-spezifischen $\text{CD4}^+$ T-Zell Antwort

Im Folgenden sollte zum einen die durch MVA-nsOVA/LC3\_P11 hervorgerufene OVA-spezifische  $\text{CD4}^+$  T-Zellaktivierung mit der von MVA-nsOVA\_P11 verglichen werden und zum anderen sollte überprüft werden, wie sich diese Antwort unter Zugabe eines Autophagieinhibitors ändert. Durch die Kopplung von LC3 an nsOVA sollte dieses verstärkt in den autophagischen Abbauprozess eingeschleust werden. Dadurch wurden eine stärkere Aktivierung der OVA-spezifischen  $\text{CD4}^+$  T-Zellen und damit eine vermehrte Ausschüttung von  $\text{IFN-}\gamma$  und IL-2 nach Infektion mit MVA-nsOVA/LC3\_P11 erwartet. Diese Aktivierung sollte unter Zugabe eines Autophagieinhibitors rückläufig sein – folglich wäre dann auch kein Unterschied zwischen den beiden zu vergleichenden Viren mehr zu erwarten. Als Autophagieinhibitor wurde Bafilomycin A1 verwendet, welches die späte Phase der Autophagie hemmt.

MVA-wt wurde als Negativkontrolle und MVA-OVA\_P7.5 als Positivkontrolle verwendet. Vorhergehende Arbeiten konnten zeigen, dass die T-Zell Antwort nach Inkubation mit MVA-OVA\_P7.5-infizierten BMDCs nahezu derer von peptidstimulierten BMDCs entspricht (164), wodurch dieses Virus anstatt der Peptide als Positivkontrolle verwendet werden konnte. Zudem wurde das Virus MVA-OVA\_P11 verwendet. Dies ermöglicht den direkten Vergleich der Promotoren P7.5 und P11, da die Viren bis auf die unterschiedlichen Promotoren identisch sind.

Da publiziert wurde, dass Bafilomycin A1 einen minimalen Einfluss auf die Penetration von MVA hat (180), wurde der Inhibitor erst eine Stunde nach der Infektion hinzugefügt. Damit wurde sichergestellt, dass eine Reduktion der Zytokinantwort auf eine autophagiespezifische Wirkung des Inhibitors, anstatt auf eine ungenügende Infektion zurückgeführt werden kann. Da die Expression der Gene unter einem späten Promotor erst nach frühestens ca. 2 Stunden beginnt, war dies ohne Probleme möglich.

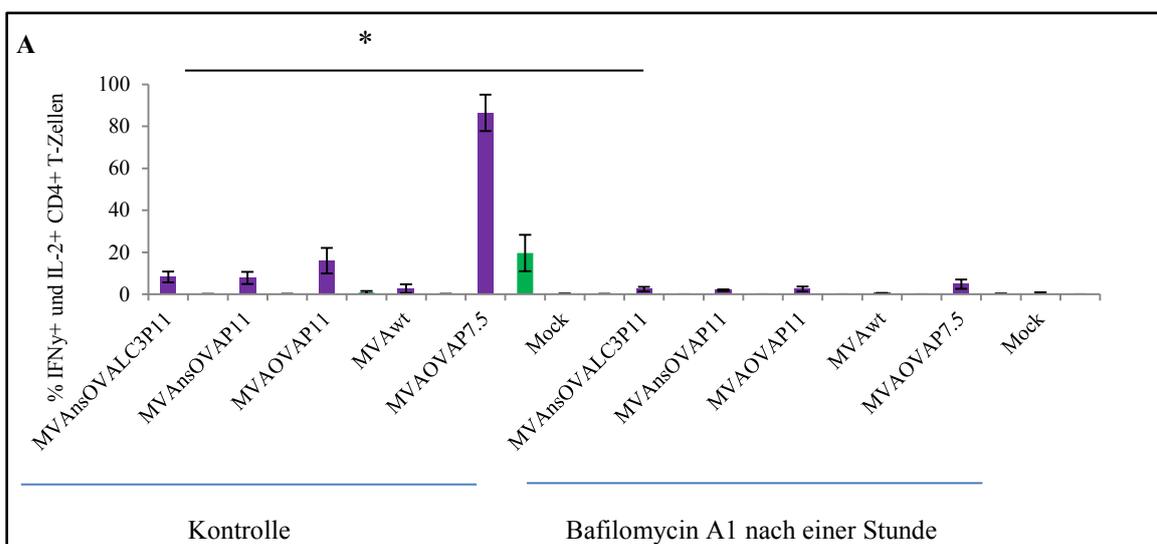
Der Versuch an sich erfolgte wie unter den Punkten 3.3.5 und 3.3.6 beschrieben. Abbildung 11 A zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied bei der antigenspezifischen  $\text{CD4}^+$  T-

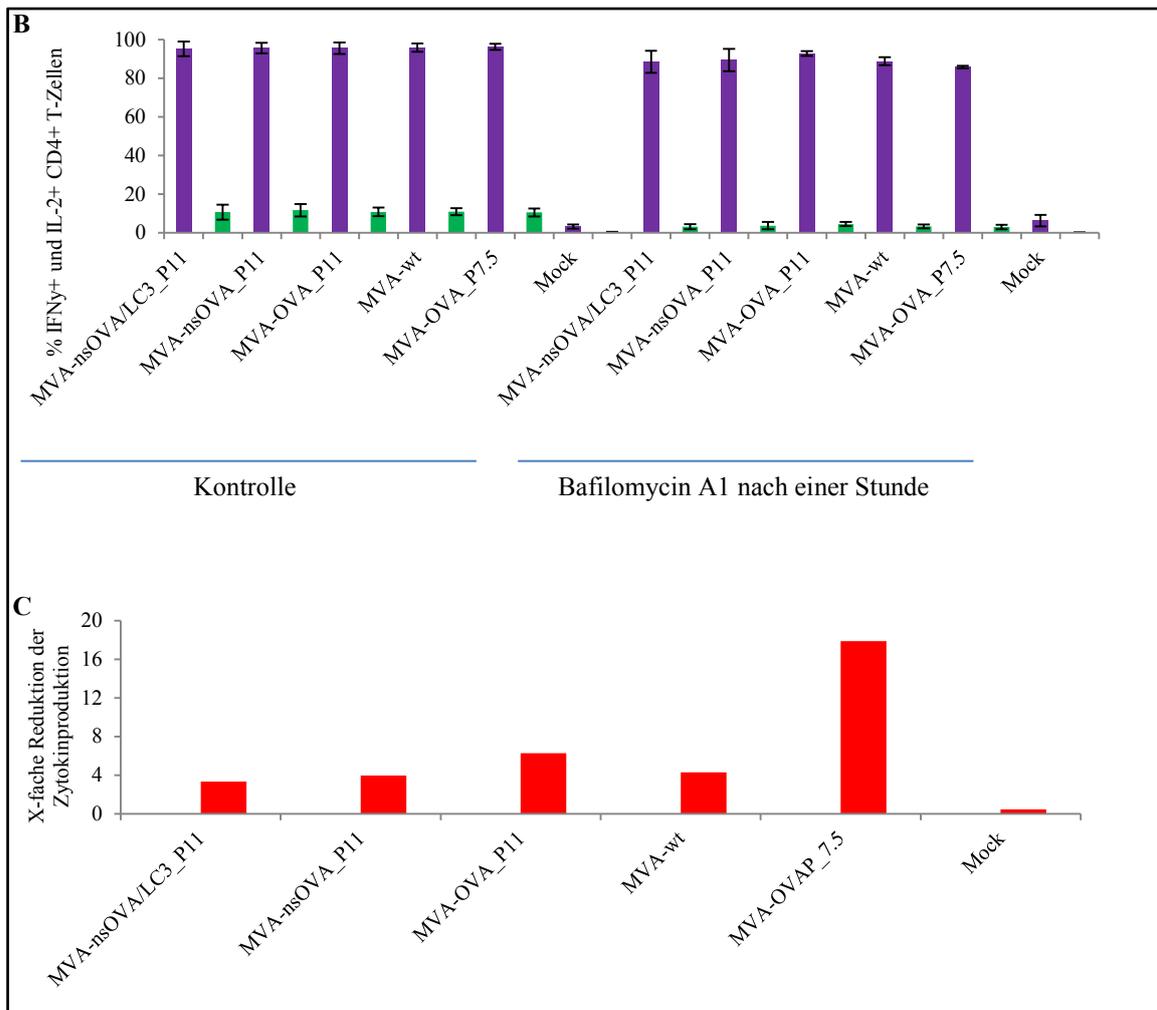
Zellaktivierung zwischen MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 gab (IFN- $\gamma$ :  $p = 0,855$ ; IL-2:  $p = 0,797$ ). Es zeigte sich jedoch ein wesentlicher Unterschied zwischen den Promotoren P11 und P7.5.

Erwartungsgemäß konnte das sich in der Hülle des Virus befindliche B5-Protein die B5-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit durchgehend gleich hoher Intensität stimulieren, was auf eine ausreichende und gleichmäßige Infektion der APZs hindeutet (Abbildung 11 B).

Durch die Zugabe von Bafilomycin A1 konnte die endogene Präsentation von OVA nahezu komplett inhibiert werden; sogar unter dem frühen/späten Promotor P7.5. Während die Zytokinproduktion bei MVA-nsOVA/LC3\_P11 signifikant sank (IFN- $\gamma$ :  $p = 0,023$ ; IL-2:  $p = 0.01$ ), konnte dies für MVA-nsOVA\_P11 nicht bestätigt werden (IFN- $\gamma$ :  $p = 0,069$ ; IL-2:  $p = 0,05$ ). Bei einem Vergleich der beiden Viren untereinander zeigte sich eine nahezu gleiche Zytokinproduktion, was unter Verwendung des Inhibitors allerdings den Erwartungen entsprach.

In Abbildung 11 C wurde der Einfluss von Bafilomycin A1 auf die Antigenprozessierung und –präsentation von BMDCs untersucht und an der IFN- $\gamma$ -Produktion der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen. Auch hier wird noch einmal deutlich, dass es zwischen MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 keinen signifikanten Unterschied gibt. Unter Einfluss des Inhibitors wäre eine stärkere Reduktion der Zytokinproduktion nach Infektion mit MVA-nsOVA/LC3\_P11 zu erwarten gewesen (allerdings war diese vorher auch nicht höher). Die Präsentation von B5, welche größtenteils über den exogenen Weg realisiert wird, zeigte unter der Behandlung mit Bafilomycin A1 nur eine leichte Verringerung der T-Zellaktivierung. Dies betraf insbesondere das in diesem Testverfahren sensiblere IL-2. Es bestand somit keine nennenswerte Beeinträchtigung der Infektion.





**Abbildung 11: Aktivierung der OVA- und B5-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien nach der Infektion von BMDCs mit verschiedenen Viruskonstrukten sowie nach der Zugabe von Bafilomycin A1**

A, B) Ein  $1 \times 10^6$  BMDCs/mL wurden mit den dargestellten Viren mit einer MOI von 10 oder mock infiziert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde das Volumen auf 1 mL aufgefüllt (mit M2-Medium bzw. M2-Medium + Bafilomycin A1). Es wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in ein 96-V-Loch einer 96-Mikro-Loch-Platte überführt und für weitere 7 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden  $2 \times 10^5$  T-Zellen sowie Brefeldin A in einer Endkonzentration von 1  $\mu$ g/mL hinzugefügt. Nach einer vierzehnstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Stimulation der T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung analysiert.

A) Aktivierung OVA-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen; B) Aktivierung B5-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen; C) X-fache Reduktion der IFN- $\gamma$ -Produktion der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Bafilomycin A1 behandelte BMDCs verglichen mit unbehandelten BMDCs (Mittelwerte).

Lila: IFN- $\gamma$ ; Grün: IL-2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, welche aus den Ergebnissen von drei unabhängig durchgeführten Versuchen berechnet wurden.

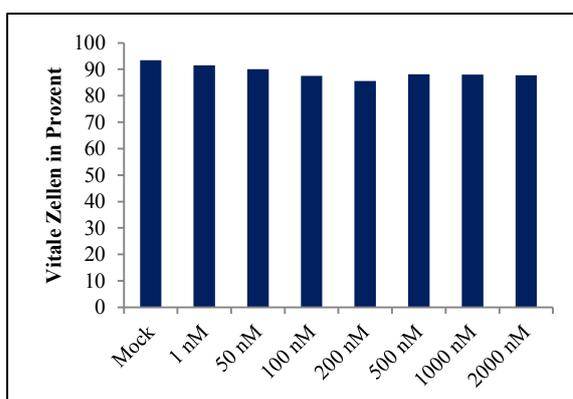
\* P < 0.05 (two-tailed Student's t test).

### 4.2.3 Weder Wortmannin noch 3-MA zeigen einen statistisch signifikanten Einfluss auf die OVA-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort

3-MA (3-Methyladenin) und Wortmannin greifen in die frühe Phase der Autophagie ein und hemmen daher bereits die Entstehung von Autophagosomen. Sie inhibieren sowohl die PI3K Klasse I als auch die PI3K Klasse III, jedoch in unterschiedlichen zeitlichen Mustern. Während Wortmannin die PI3K Klasse I transient und die PI3K Klasse III persistent hemmt, ist es bei 3-MA genau andersherum (Abbildung 2). Dies erklärt den sich teilweise umkehrenden Effekt von 3-MA nach ca. 9 Stunden. Es kommt dann nicht mehr zu einer Inhibition, sondern zu einer Induktion von Autophagie. Vor diesem Hintergrund bestand die Annahme, dass Wortmannin bei den relativ langen Inkubationszeiten besser geeignet sein könnte, um Autophagie zu inhibieren. Unterstützt wurde die Überlegung durch die Arbeit von Kaizuka *et al.* (181) sowie Wu *et al.* (182). Da 3-MA jedoch als klassischer Autophagieinhibitor eine häufige Verwendung findet, sollte dieser vergleichend mit Wortmannin benutzt werden.

3-MA ist ein etablierter Inhibitor der Autophagie und fand in unserem Labor bereits Verwendung. Deshalb mussten hier weder die zu verwendende Konzentration noch die damit einhergehende Toxizität getestet werden. Dies galt jedoch nicht für Wortmannin. In umfangreichen Vorversuchen wurde zunächst die Toxizität von Wortmannin auf die BMDCs getestet. Bei Konzentrationen zwischen 1nM – 2000 nM konnte kein signifikanter toxischer Effekt auf die BMDCs beobachtet werden (Abbildung 12). Anschließend überprüften wir die Auswirkung dieser Konzentrationen auf die Zytokinausschüttung der T-Zellen nach Infektion mit MVA-OVA\_P7.5 (stellvertretend für die Peptidstimulation).

Da gezeigt wurde, dass Wortmannin einen geringen Einfluss auf die Penetration von MVA hat (180), wurde der Inhibitor eine Stunde nach der Infektion hinzugefügt. Letztendlich entschieden wir uns in Anlehnung an die bereits veröffentlichte Literatur für die folgenden Versuche eine Konzentration von sowohl 100nM als auch 1000nM zu verwenden.



**Abbildung 12: Wortmannin zeigt gegenüber BMDCs keinen signifikanten toxischen Effekt**

Es wurden  $1 \times 10^6$  BMDCs/mL in ein Falcon überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 1 mL M2-Medium, welches den Inhibitor in den dargestellten Konzentrationen enthielt, resuspendiert. Nach einer Stunde wurden von jeder Probe  $1 \times 10^5$  Zellen in das Loch einer 96-V-Mikro-Loch-Platte pipettiert und für weitere 7 Stunden

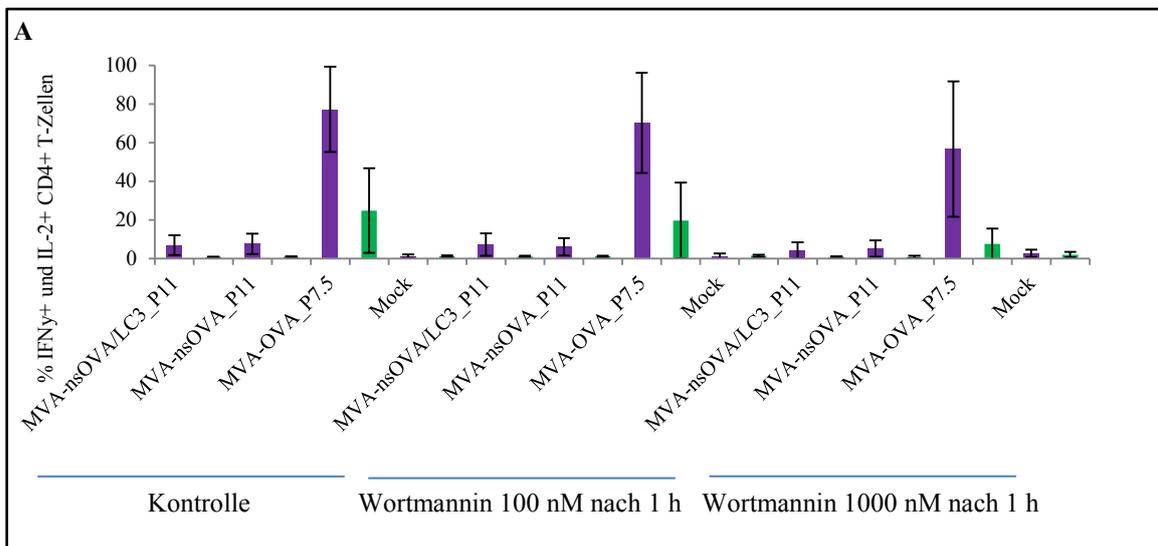
bei 37 °C inkubiert.

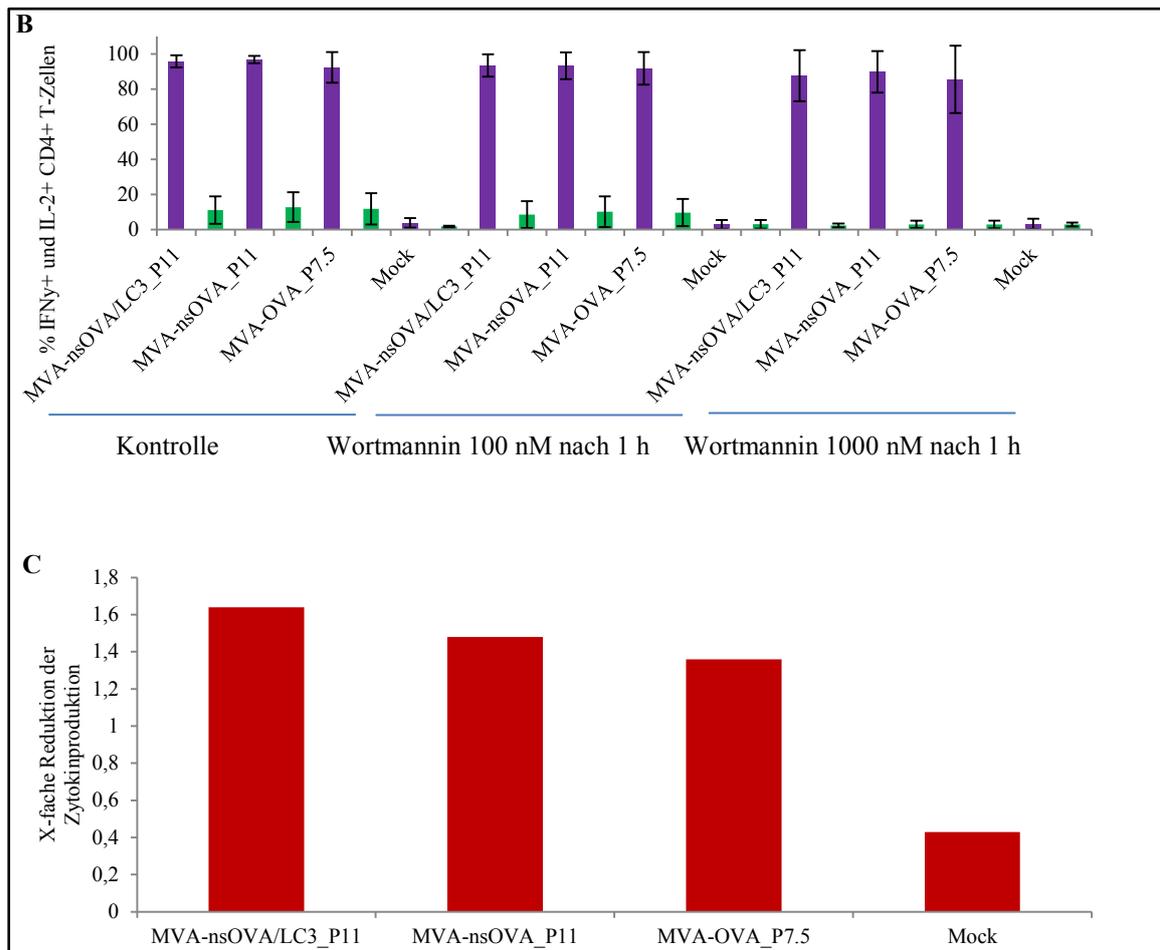
Im Anschluss daran erfolgte eine EMA-Färbung und die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert.

#### 4.2.3.1 Wortmannin führt nicht zu einer signifikanten Reduktion der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort

Der Versuch wurde - wie unter den Punkten 3.3.5 und 3.3.6 beschrieben - durchgeführt. Die verwendeten Viren sind den Abbildungen 13 A und B zu entnehmen. Erneut zeigte sich, dass es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung zwischen MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 gab (IFN- $\gamma$ : p = 0,884; IL-2: p = 0,644). Das Hinzufügen von Wortmannin in einer Konzentration von 100nM zeigte nur einen geringen Effekt; erst bei 1000nM ließ sich eine deutlichere Reduktion der T-Zellaktivierung detektieren. Diese war jedoch weder für MVA-nsOVA\_P11 (IFN- $\gamma$ : p = 0,564; IL-2: p = 0,988) noch für MVA-nsOVA/LC3\_P11 (IFN- $\gamma$ : p = 0,522; IL-2: p = 0,871) signifikant. Abbildung 13 C verdeutlicht, dass sich die Reduktion der Zytokinausschüttung zwischen den beiden Viren unter Verwendung des Inhibitors nicht wesentlich unterscheidet.

Es ist auffällig, dass es verglichen mit Bafilomycin A1 zu einer geringeren Inhibition der CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung kam. Dies wurde insbesondere unter Verwendung von MVA-OVA\_P7.5 deutlich.





**Abbildung 13: Inhibierender Effekt von Wortmannin auf OVA- und B5-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

A, B) Ein  $1 \times 10^6$  BMDCs/mL wurden mit einer MOI von 10 infiziert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde das Volumen auf 1 mL aufgefüllt (mit M2-Medium bzw. M2-Medium + Wortmannin 100nM oder 1000 nM). Es wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in ein 96-V-Loch einer 96-Mikro-Loch-Platte überführt und für weitere 7 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden  $2 \times 10^5$  T-Zellen sowie Brefeldin A in einer Endkonzentration von 1 $\mu$ g/mL hinzugefügt. Nach einer vierzehnstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Stimulation der T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung analysiert.

A) Aktivierung OVA-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen; B) Aktivierung B5-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen; C) X-fache Reduktion der IFN- $\gamma$ -Produktion der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Wortmannin (1000nM) behandelte BMDCs verglichen mit unbehandelten BMDCs (Mittelwerte).

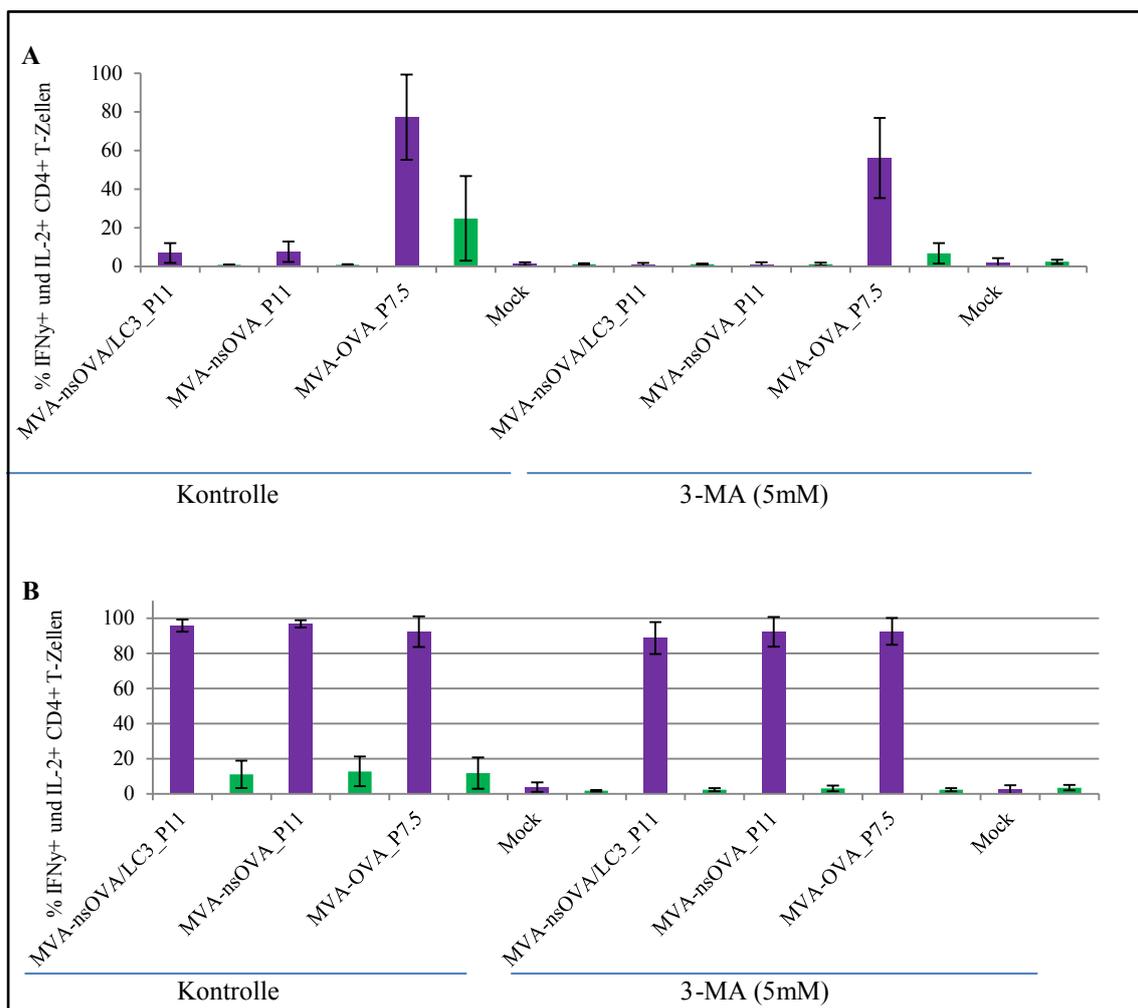
Lila: IFN- $\gamma$ ; Grün: IL-2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, welche aus den Ergebnissen von drei unabhängig durchgeführten Versuchen berechnet wurden.

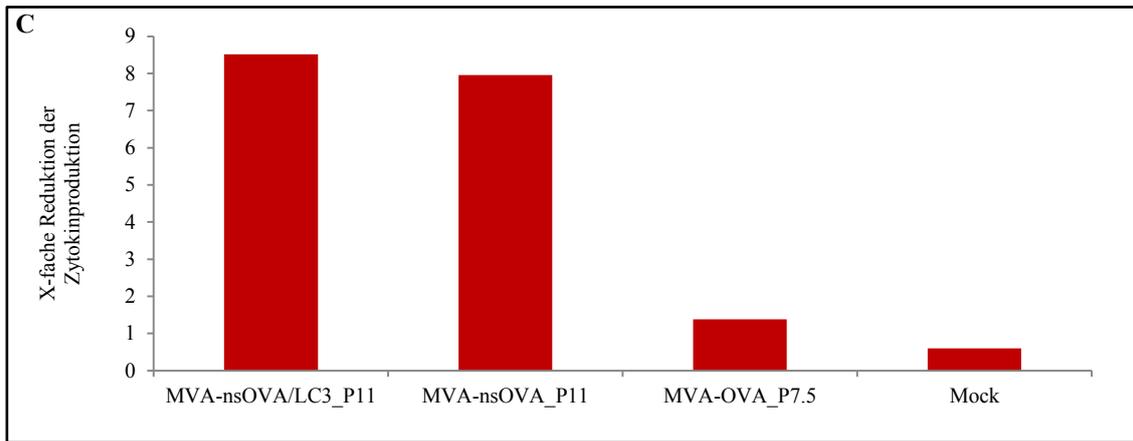
#### 4.2.3.2 3-MA führt nicht zu einer signifikanten Reduktion der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass 3-MA keinen Einfluss auf die Infektion von BMDCs mit rekombinanten MVA-Viren hat (164). Um eine effektive Unterdrückung der Autophagosomenbildung sicherzustellen, wurden die BMDCs daher eine Stunde vor der Infektion mit dem Inhibitor in einer Konzentration von 5mM bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde der Versuch - wie unter Punkt 3.3.5 und 3.3.6 beschrieben - fortgeführt. Die verwendeten Viren sind den Abbildungen 14 A und B zu entnehmen. Es zeigte sich keine signifikante Reduktion der T-Zellaktivierung unter Verwendung von 3-MA. Dies galt sowohl für MVA-nsOVA/LC3\_P11 (IFN- $\gamma$ :  $p = 0,175$ ; IL-2:  $p = 0,196$ ) als auch für MVA-nsOVA\_P11 (IFN- $\gamma$ :  $p = 0,155$ ; IL-2:  $p = 0,553$ ). Wie bei der Verwendung von Wortmannin zeigte sich bei dem Virus MVA-OVA\_P7.5 eine noch relativ starke Zytokinproduktion. Somit ähnelt sich das Muster der Zytokinausschüttung beider Inhibitoren. Abbildung 14 C zeigt, dass es unter Verwendung von 3-MA nach Infektion mit MVA-nsOVA/LC3\_P11 zu einer ca. 8,5-fachen Reduktion der Zytokinausschüttung kam, während es bei Wortmannin nur ca. 1,5-fach war (Abbildung 13 C). Die theoretische Annahme, dass Wortmannin aufgrund seines Wirkungsprofils ein potenterer Inhibitor als 3-MA sein könnte, konnte somit praktisch nicht bestätigt werden.

Um sicher zu stellen, dass das Hinzufügen des Inhibitors eine Stunde vor Virusinfektion tatsächlich keinen Einfluss auf die T-Zellaktivierung hatte, wurden vergleichende Kontrollen mit der Zugabe von 3-MA eine Stunde nach Infektion durchgeführt. Hierbei zeigte sich allerdings keine Änderung der Ergebnisse (nicht dargestellt).





**Abbildung 14: Inhibierender Effekt von 3-MA auf OVA- und B5-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

A, B) Ein  $1 \times 10^6$  BMDCs/mL wurden entweder mit 3-MA in einer Konzentration von 5 mM (verdünnt in M2-Medium) oder unbehandelt für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Der Inhibitor wurde in der Zellkultur belassen und es erfolgte die Infektion mit einer MOI von 10. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in ein 96-V-Loch einer 96-Mikro-Loch-Platte überführt und für weitere 7 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden  $2 \times 10^5$  T-Zellen sowie Brefeldin A in einer Endkonzentration von 1 µg/mL hinzugefügt. Nach einer vierzehnstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Stimulation der T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung analysiert.

A) Aktivierung OVA-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen; B) Aktivierung B5-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen; C) X-fache Reduktion der IFN-γ-Produktion der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch 3-MA behandelte BMDCs verglichen mit unbehandelten BMDCs (Mittelwerte).

Lila: IFN-γ; Grün: IL-2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, welche aus den Ergebnissen von drei unabhängig durchgeführten Versuchen berechnet wurden.

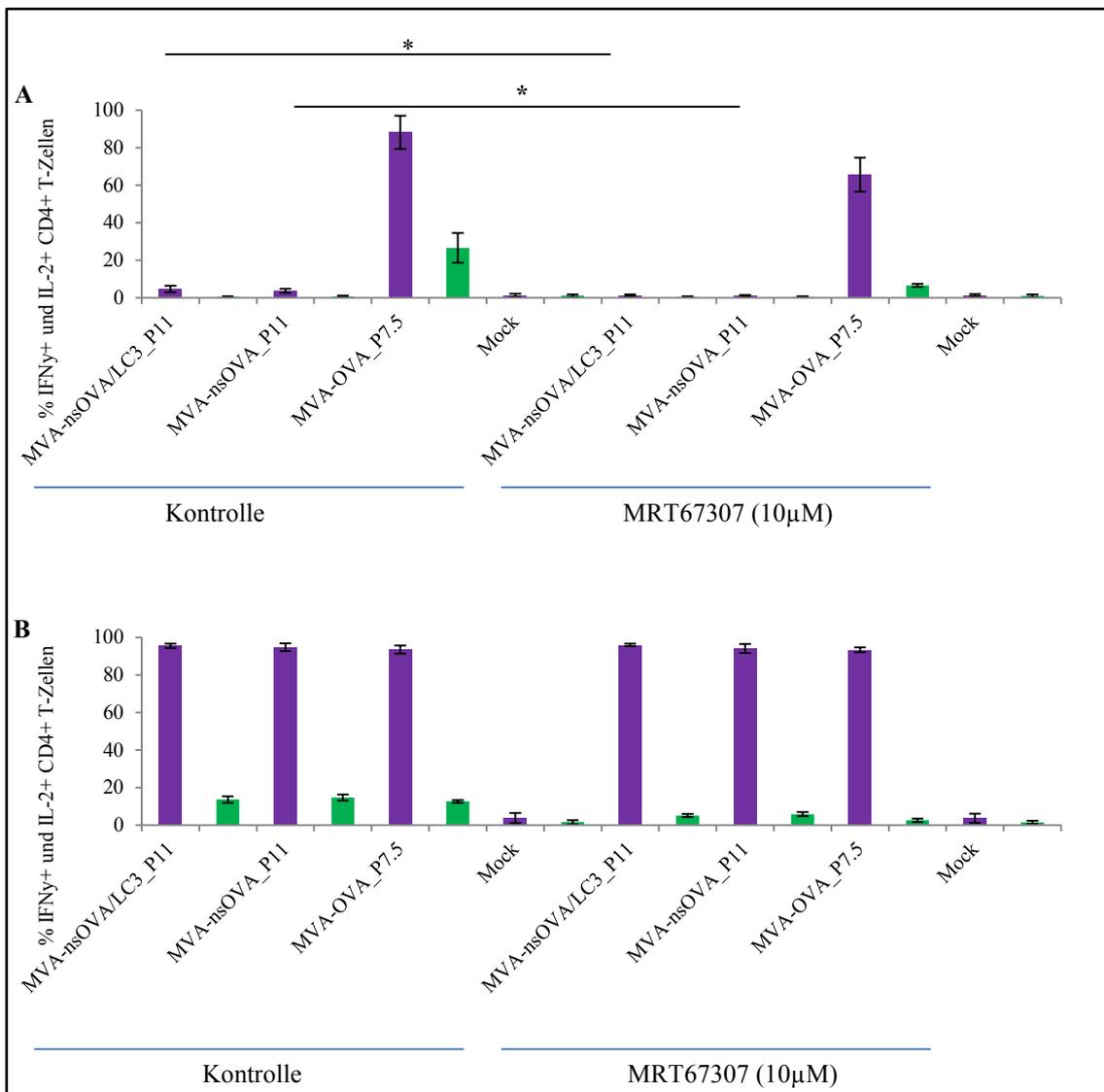
#### 4.2.4 MRT67307 führt zu einer signifikanten Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort

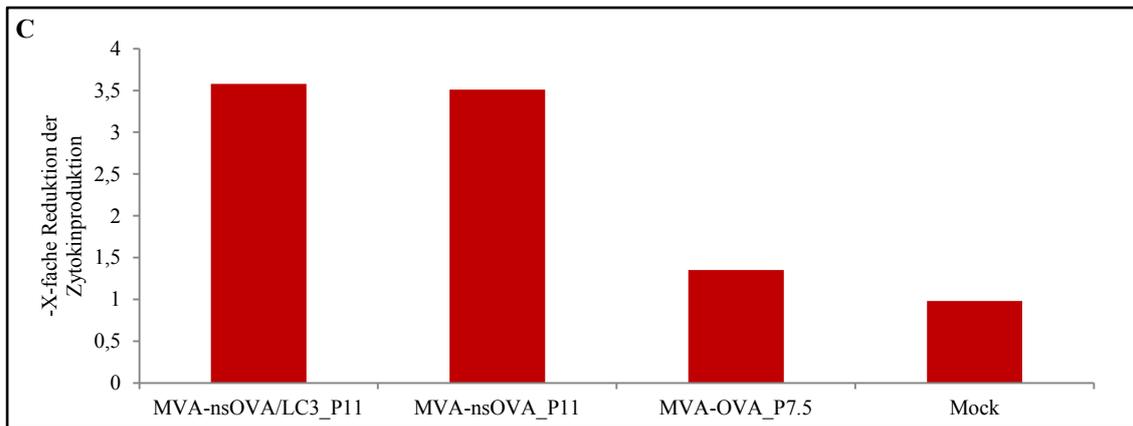
Mit dem im Jahr 2015 erstmals beschriebenen spezifischen Inhibitor MRT67307 (183) sollte der Effekt eines weiteren Inhibitors getestet werden, der ebenfalls in der frühen Autophagie eingreift. Wir erhofften uns, mit MRT67307 einen potenteren Inhibitor verwenden zu können, der durch seine spezifische Wirkung zu einer eindeutig auf den Inhibitor zurückzuführenden Reduktion der Autophagie führt.

MRT67307 inhibiert ULK1 und ULK2 (Abbildung 2). Dadurch wird die Bildung und Reifung von Autophagosomen verhindert. In der aktuellen Literatur wird dieser Inhibitor in einer Konzentration von 10 µM genutzt, weshalb diese Konzentration auch in den folgenden Versuchen verwendet wurde (183). Bereits vorausgegangene Studien in unserem Labor konnten zeigen, dass diese Konzentration nicht toxisch ist und auch keinen Einfluss auf die Infektionsbereitschaft der Zellen hat. Deshalb erfolgte die Hinzugabe des Inhibitors in diesem Fall zeitgleich mit der Infektion. Der weitere Versuch wurde - wie unter Punkt 3.3.5 und 3.3.6

beschrieben - durchgeführt.

Abbildung 15 zeigt, dass es zwar – wie bereits mehrfach dargestellt - keinen signifikanten Unterschied zwischen MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 gab, allerdings kam es unter Verwendung des Inhibitors zu einer signifikanten Reduktion der IFN- $\gamma$ -Ausschüttung der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Dies galt sowohl für MVA-nsOVA/LC3\_P11 (IFN- $\gamma$ : p = 0,033; IL-2: p = 0,642) als auch MVA-nsOVA\_P11 (IFN- $\gamma$ : p = 0,016; IL-2: p = 0,415). Diese lehnte sich tendenziell an das Muster der Zytokinausschüttung unter 3-MA und Wortmannin an. Nach Zugabe des Inhibitors konnte die OVA-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort bei den Viren MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 um das drei- bis vierfache reduziert werden (Abbildung 15 C).





**Abbildung 15: Inhibierender Effekt von MRT67307 auf OVA- und B5-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

A, B) Ein  $\times 10^6$  BMDCs/mL wurden mit einer MOI von 10 infiziert. Gleichzeitig wurde, wenn benötigt, MRT67307 in einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  (verdünnt in M2-Medium) zu dem Infektionsansatz hinzugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in ein 96-V-Loch einer 96-Mikro-Loch-Platte überführt und für weitere 7 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden  $2 \times 10^5$  T-Zellen sowie Brefeldin A in einer Endkonzentration von  $1\mu\text{g/mL}$  hinzugefügt. Nach einer vierzehnstündigen Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurde die Stimulation der T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung analysiert.

A) Aktivierung OVA-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen; B) Aktivierung B5-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen; C) X-fache Reduktion der IFN- $\gamma$ -Produktion der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch MRT67307 behandelte BMDCs verglichen mit unbehandelten BMDCs (Mittelwerte).

Lila: IFN- $\gamma$ ; Grün: IL-2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, welche aus den Ergebnissen von drei unabhängig durchgeführten Versuchen berechnet wurden.

\*  $P < 0.05$  (two-tailed Student's t test).

## 4.3 Proteinnachweis mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie

### 4.3.1 Hintergrund und Aufbau des Versuchs

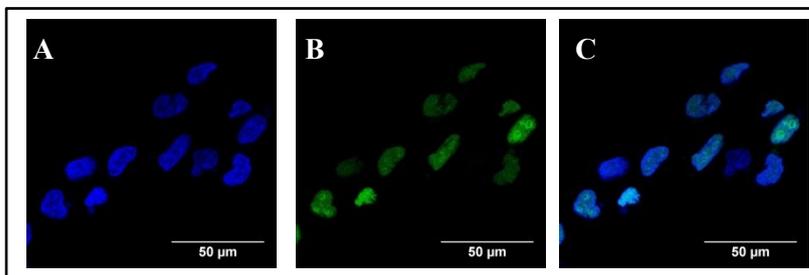
Die konfokale Mikroskopie bietet im Gegensatz zum Western Blot die Möglichkeit, die Proteine bzw. viralen Antigene direkt in der lebenden Zelle sichtbar zu machen. Auf diese Weise können zusätzliche Aussagen über Lokalisation, Verteilungsmuster, Proteinmenge etc. getroffen werden. Ziel dieses Versuchs war zum einen initial die Kolo-kalisierung von nsOVA und LC3 in den Virusfabriken darzustellen. Dies wäre ein Hinweis für die späte Genexpression in den Virusfabriken. Im weiteren Verlauf der Infektion sollte visualisiert und untersucht werden, ob das Fusionsprotein in einer membranösen Struktur - vorzugsweise der autophagosomalen Membran - verankert wird. Dieser Nachweis sollte, wie auch schon beim Western Blot, unter zu Hilfenahme des Detergens Saponin erfolgen.

Zur besseren Visualisierung wurde Chloroquin verwendet. Chloroquin hebt den lysosomalen pH-Wert an, wodurch die Fusion zwischen Autophagosomen und Lysosomen inhibiert wird. Dies führt folglich zu einer Inhibition der lysosomalen Degradation. Die Substanz wird von den Zellen relativ gut toleriert und führt infolge dessen auch zu wenigen zellmorphologischen

Veränderungen. Um die Virusaufnahme in die Zelle nicht zu manipulieren, wurde der Inhibitor eine Stunde nach der Infektion hinzugefügt. Wir erhofften uns dadurch eine Akkumulation der Autophagosomen und in der Konsequenz eine Anhäufung des autophagosomal-assoziierten Membranproteins LC3-II bzw. nsOVA/LC3, weshalb eine erleichterte Detektion erwartet wurde.

Für die Versuche wurden HeLa-Zellen und HeLa DsRed-LC3-egfp-Zellen genutzt. HeLa-Zellen eignen sich für die konfokale Mikroskopie besonders gut, da sie einerseits eine starke MVA-induzierte Autophagie aufweisen und andererseits ihre Zellmorphologie während der Infektion bewahren. Der Vorteil der HeLa DsRed-LC3-egfp-Zellen bestand darin, dass über die Kolokalisation des DsRed-gekoppelten LC3 in Kombination mit dem Alexa Fluor 647 markiertem LC3 Aussagen über die Funktionalität sowie die Spezifität des LC3 Nachweises mittels der Antikörper getroffen werden konnten.

In umfangreichen Vorversuchen wurden sowohl die optimale Zelldichte zum Zeitpunkt der Infektion, die MOI, die zu verwendenden Antikörperkonzentrationen und die Infektionsdauer bestimmt. Für die Bestimmung der MOI wurde das Virus MVA-NP-SIINF-egfp benutzt. NP steht hierbei für „*nuclear protein*“, während mit SIINF das Ovalbuminpeptid SIINFEKL gemeint ist. EGFP ist ein grün fluoreszierender Proteinmarker. Da dieser über das SIINFEKL an das nukleäre Protein gekoppelt wurde, leuchtet der Nukleus infizierter Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop grün. Wurden die Zellkerne zusätzlich mit Dapi gefärbt, kann durch die Kolokalisierung des grünen und blauen Signals eine infizierte Zelle erkannt werden (Abbildung 16). Da mit einer MOI von 10 bereits nahezu alle Zellen infiziert werden konnten und sich mit einer MOI von 20 keine vermehrte Proteinproduktion zeigte, die Zellmorphologie sich durch die höhere Viruslast jedoch eindeutig verschlechterte, wurde für die folgenden Versuche eine MOI von 10 verwendet.

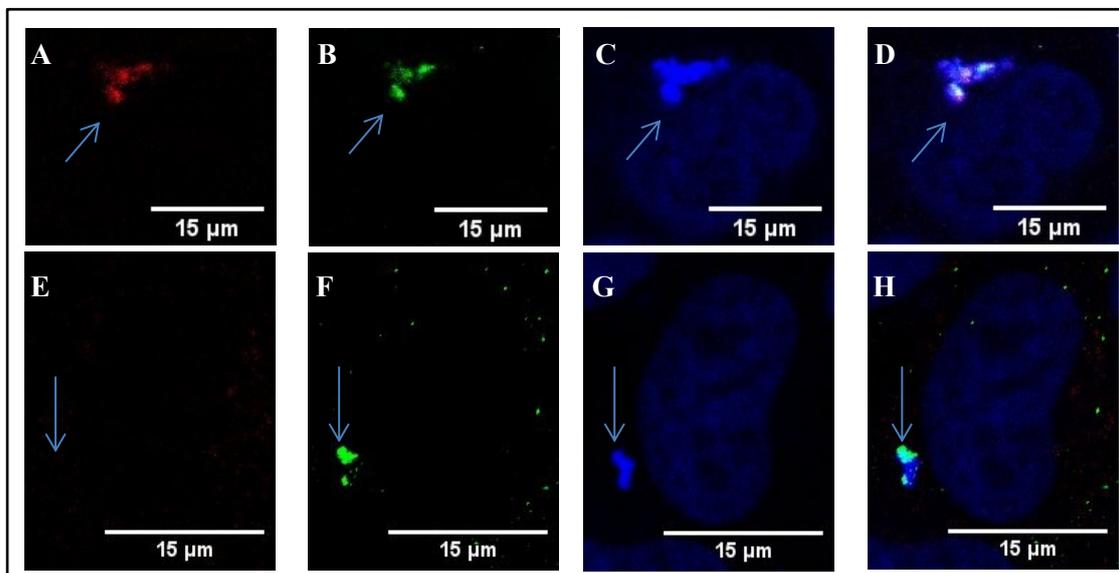


**Abbildung 16: Eine MOI von 10 ist ausreichend, um nahezu alle HeLa-Zellen zu infizieren**

HeLa-Zellen wurden mit MVA-NP-SIINF-egfp mit einer MOI von 10 infiziert. Nach acht Stunden wurden die Zellen 2x mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden sie für 15 Minuten mit 4% PFA fixiert und anschließend durch die Behandlung von 0,25% Triton X-100 permeabilisiert. Zuletzt erfolgte die Färbung der Zellkerne und Virusfabriken durch DAPI.

A) Nachweis von DNA durch DAPI; B) Nachweis von egfp; C) Übereinanderlegen der Bilder A und B.  
Verwendetes Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27.

Parallel erarbeiteten wir den günstigsten Zeitpunkt, um eine mögliche Kolokalisierung detektieren zu können. Es zeigte sich, dass dieser bei 8 Stunden nach Infektion lag. Hier war bei erhaltener Zellmorphologie die größte Menge an Proteinen – teils innerhalb und teils außerhalb der Virusfabriken - nachweisbar. Bereits in den Vorversuchen konnten wir feststellen, dass es Virusfabriken gab, in denen nur das OVA-Signal detektiert werden konnte, nicht jedoch das LC3-Signal. Außerdem zeigten sich auch viele Virusfabriken, die leer waren (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Nicht in allen Virusfabriken lässt sich nach 8 Stunden eine Kolokalisierung des LC3-Signals mit dem OVA-Signal detektieren.**

HeLa Zellen wurden mit MVA-nsOVA/LC3\_P11 mit einer MOI von 10 infiziert. Eine Stunde nach der Infektion erfolgte die Zugabe von 50µM Chloroquin. Nach weiteren sieben Stunden wurden die Zellen 2x mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden sie für 15 Minuten in 4% PFA fixiert und anschließend durch die Behandlung von 0,25% Triton X-100 permeabilisiert. Nachdem mit 5% FCS geblockt wurde, wurde für eine Stunde mit den primären (Anti-LC3; Kaninchen und Anti-OVA; Maus) und anschließend für eine Stunde mit den sekundären (Anti-Kaninchen gekoppelt mit Alexa Fluor 594; rot fluoreszierend und Anti-Maus gekoppelt mit Alexa Fluor 488; grün fluoreszierend) Antikörpern im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Zellkerne und Virusfabriken mit DAPI gefärbt.

A, E) Nachweis von LC3 durch Alexa Fluor 594; B, F) Nachweis von nsOVA durch Alexa Fluor 488; C, G) Nachweis von DNA durch DAPI; D, H) Übereinanderlegen der Bilder A-C bzw. E-G (Kolokalisierungen von LC3 und nsOVA erscheinen als gelbe Punkte).

Verwendetes Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27.

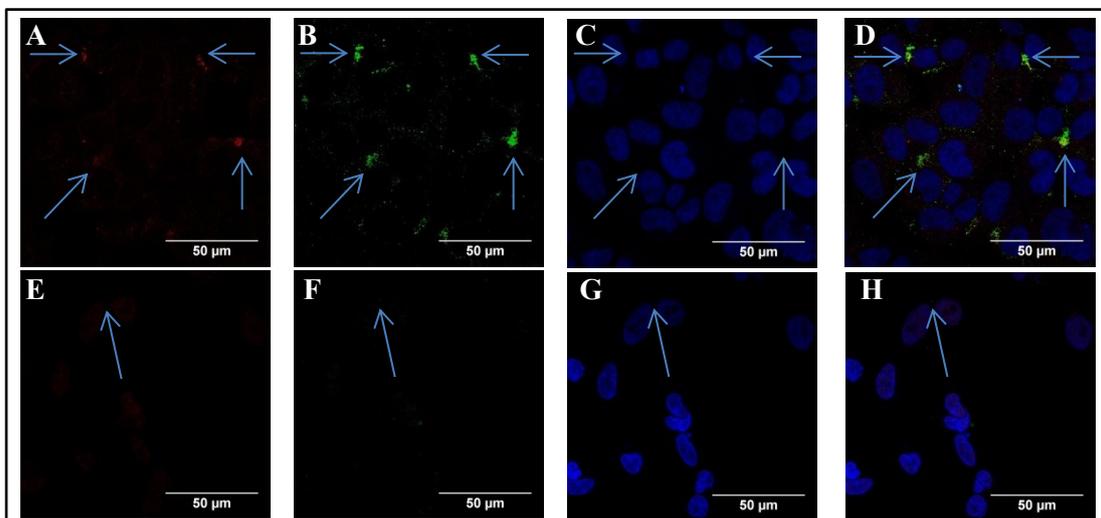
#### 4.3.2 Geringe Kolokalisierung zwischen LC3 und nsOVA nach Infektion mit MVA-nsOVA/LC3\_P11 und starkes Auswaschen der Proteine mit Saponin

Zum Nachweis von Kolokalisierungen zwischen LC3 und nsOVA sowie deren Lokalisation innerhalb der Zelle wurde der Versuch mit HeLa-Zellen sowie dem Virus MVA-nsOVA/LC3\_P11 - wie unter Punkt 3.3.7 beschrieben - mit und ohne Saponinbehandlung durchgeführt.

Als primäre Antikörper wurden Anti-LC3 (Kaninchen) und Anti-OVA (Maus) verwendet. Für die sekundären Antikörper wurden Anti-Kaninchen gekoppelt mit Alexa Fluor 594 sowie Anti-Maus gekoppelt mit Alexa Fluor 488 benutzt. Der Kern und die Virusfabriken wurden mit DAPI gefärbt.

Wie man der Abbildung 18 A-D entnehmen kann, lassen sich verhältnismäßig wenig Kolokalisierungen (gelbe Punkte) nachweisen, während relativ viel freies nsOVA (grüne Punkte) zu detektieren ist, was vor dem Hintergrund des Aufbaus des rekombinanten Fusionsproteins nicht den Erwartungen entsprach. Unter der Berücksichtigung, dass in der Zelle auch noch ein gewisser Anteil des zellulären LC3 vorhanden ist, welches durch den LC3-Antikörper ebenfalls markiert wird, hätte man hier mehr rote (LC3) Punkte als grüne (nsOVA) Punkte erwarten dürfen. Es ist darüber hinaus anzumerken, dass die Proteinproduktion an sich relativ gering war.

Nach dem Waschen der Zellen mit Saponin (Abbildung 18 E-H) zeigten sich kaum noch grüne, rote oder gelbe Punkte. Dies verdeutlicht zwar einerseits, dass die Behandlung mit Saponin effektiv ist, jedoch andererseits, dass kaum LC3 oder nsOVA/LC3 in membranöse Strukturen integriert werden können. Die nur noch relativ wenig vorhandenen gelben Punkte repräsentieren in diesem Fall das in eine Membran integrierte Fusionsprotein (Kolokalisierung). Der Versuch, die Einwirkzeit zu verkürzen (1 Minute), führte zu keinem relevanten Erfolg.



**Abbildung 18: Wenige Kolokalisierungen zwischen LC3 und nsOVA nach Infektion von HeLa-Zellen mit MVA-nsOVA/LC3\_P11 und starkes Auswaschen der Proteine mit Saponin**

HeLa Zellen wurden mit MVA-nsOVA/LC3\_P11 mit einer MOI von 10 infiziert. Eine Stunde nach der Infektion erfolgte die Zugabe von 50µM Chloroquin. Nach weiteren sieben Stunden wurden die Zellen 2x mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen des zweiten Ansatzes (Bild E-H) für zwei Minuten mit 0,05% Saponin (in PBS) bei Raumtemperatur behandelt und erneut mit PBS gewaschen. Danach wurden beide Ansätze für 15 Minuten in 4% PFA fixiert und anschließend durch die Behandlung von 0,25% Triton X-100 permeabilisiert. Nachdem mit 5% FCS geblockt wurde, wurde für eine Stunde mit den primären (Anti-LC3; Kaninchen und Anti-OVA; Maus) und anschließend für eine Stunde mit den sekundären (Anti-Kaninchen gekoppelt mit Alexa Fluor 594; rot fluoreszierend und Anti-Maus gekoppelt mit Alexa Fluor 488; grün fluoreszierend) Antikörpern im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Zellkerne und Virusfabriken mit DAPI gefärbt.

Bild A-D: Ansatz 1 ohne Saponin; Bild E-H: Ansatz 2 mit Saponin.

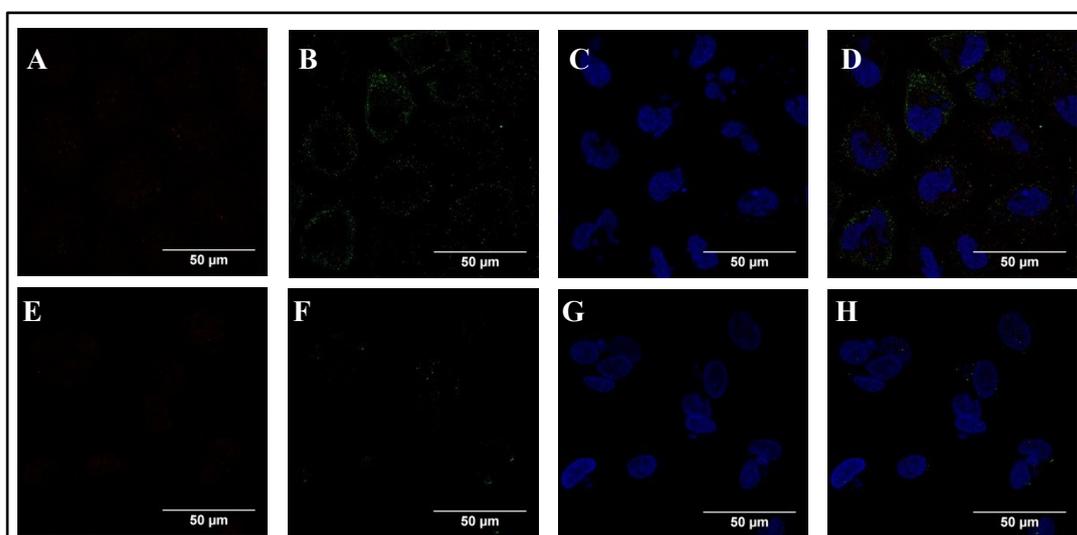
A, E) Nachweis von LC3 durch Alexa Fluor 594; B, F) Nachweis von nsOVA durch Alexa Fluor 488; C, G) Nachweis von DNA durch DAPI; D, H) Übereinanderlegen der Bilder A-C bzw. E-G (Kolokalisierungen von LC3 und nsOVA erscheinen als gelbe Punkte).

Verwendetes Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27.

### 4.3.3 Nahezu keine Kolokalisierung zwischen LC3 und nsOVA nach Infektion von HeLa-Zellen mit MVA-nsOVA\_P11

Vergleichend dazu wurde der Versuch parallel mit dem Virus MVA-nsOVA\_P11 durchgeführt.

Die Abbildung 19 A-D zeigt, dass – verglichen mit dem vorherigen Versuch – Kolokalisierungen praktisch nicht zu finden sind. Nach dem Waschen der Zellen mit Saponin (Abbildung 19 E-H) wurden auch hier die meisten Proteine herausgewaschen. Auffällig ist, dass das nsOVA-Signal hier deutlich schwächer als mit dem Virus MVA-nsOVA/LC3\_P11 ist; dies zeigten jedoch bereits die Western Blots.



#### **Abbildung 19: Nahezu keine Kolokalisierungen zwischen LC3 und nsOVA nach Infektion von HeLa-Zellen mit MVA-nsOVA\_P11**

HeLa Zellen wurden mit MVA-nsOVA\_P11 mit einer MOI von 10 infiziert. Eine Stunde nach der Infektion erfolgte die Zugabe von 50µM Chloroquin. Nach weiteren sieben Stunden wurden die Zellen 2x mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen des zweiten Ansatzes (Bild E-H) für zwei Minuten mit 0,05% Saponin (in PBS) bei Raumtemperatur behandelt und erneut mit PBS gewaschen. Danach wurden beide Ansätze für 15 Minuten in 4% PFA fixiert und anschließend durch die Behandlung von 0,25% Triton X-100 permeabilisiert. Nachdem mit 5% FCS geblockt wurde, wurde für eine Stunde mit den primären (Anti-LC3; Kaninchen und Anti-OVA; Maus) und anschließend für eine Stunde mit den sekundären (Anti-Kaninchen gekoppelt mit Alexa Fluor 594; rot fluoreszierend und Anti-Maus gekoppelt mit Alexa Fluor 488; grün fluoreszierend) Antikörpern im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Zellkerne und Virusfabriken mit DAPI gefärbt.

Bild A-D: Ansatz 1 ohne Saponin; Bild E-H: Ansatz 2 mit Saponin.

A, E): Nachweis von LC3 durch Alexa Fluor 594; B, F) Nachweis von nsOVA durch Alexa Fluor 488; C, G) Nachweis von DNA durch DAPI; D, H) Übereinanderlegen der Bilder A-C bzw. E-G (Kolokalisierungen von LC3 und nsOVA erscheinen als gelbe Punkte).

Verwendetes Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27.

#### **4.3.4 Keine unspezifische Bindung des OVA-Antikörpers**

Der in Abbildungen 18 und 19 beschriebene Versuch wurde auch mit dem MVA-Wildtypvirus als Negativkontrolle durchgeführt. Es sollte ermittelt werden, ob der primäre OVA-Antikörper unspezifisch bindet, wodurch das scheinbar freie nsOVA erklärt werden könnte. Es zeigte sich jedoch, dass dies nicht der Fall war (Abbildung nicht gezeigt).

#### **4.3.5 Starke Kolokalisierung zwischen dsRed-LC3 und endogenem LC3, jedoch nicht zwischen LC3 und nsOVA**

Die Ergebnisse der vorherigen Versuchsreihe konnten nicht vollständig mit den Erwartungen in Einklang gebracht werden, da nach Infektion mit MVA-nsOVA/LC3\_P11 verhältnismäßig viel freies nsOVA existierte. Dies widersprach nicht nur der Theorie, dass das nsOVA an das LC3 gekoppelt sein sollte, weshalb gar kein freies nsOVA entstehen dürfte, sondern auch den mit Hilfe des Western Blots gewonnenen Aussagen. Hier konnte keine freie nsOVA-Bande detektiert werden, die durch die Daten der konfokalen Mikroskopie suggeriert wurde. Nachdem eine unspezifische Bindung des OVA-Antikörpers ausgeschlossen wurde, wurde das Experiment im Folgenden noch einmal mit den HeLa DsRed-LC3-egfp-Zellen durchgeführt. Hierbei sollten Aussagen über die Funktionalität sowie die Spezifität des LC3 Nachweises mittels der Antikörper getroffen werden.

Durch die parallele Detektion von LC3 (einmal über das DsRed-gekoppelte LC3 und zum

anderen über die Verwendung eines primären und sekundären Antikörpers) kann die Sensitivität und Spezifität der einzelnen Methoden überprüft werden. Eine nahezu übereinstimmende Markierung der LC3-tragenden Strukturen mit zwei unterschiedlichen Methoden, bestätigt die Funktionalität jeder Einzelmethode.

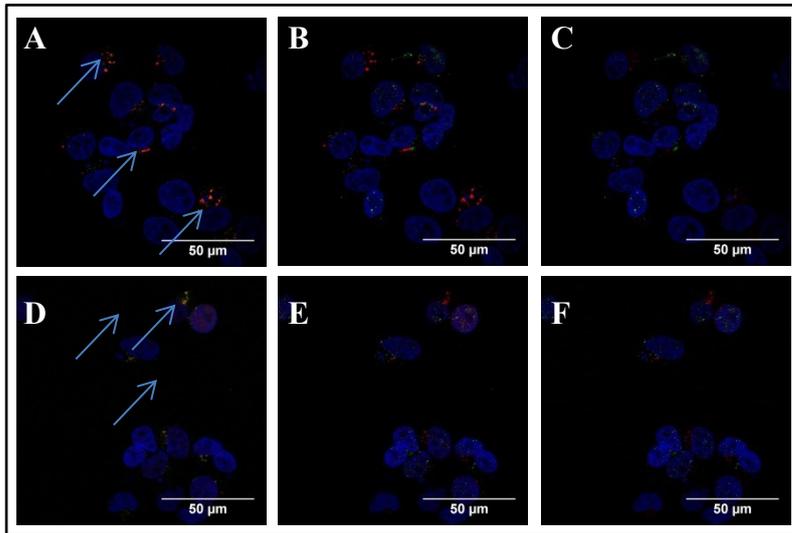
Es ist jedoch wichtig zu erwähnen, dass Aussagen über die Bindung von LC3 in den Virusfabriken nicht möglich sind, da das dsRed-gekoppelte LC3 nicht mit dem nsOVA gekoppelt wird und somit auch gar nicht in den Virusfabriken auftaucht.

Der Versuch musste in einigen Punkten modifiziert werden:

Da die Fluoreszenz-Spektren von DsRed und Alexa Fluor 594 zu dicht beieinander liegen, musste beim Sekundärantikörper von LC3 von Alexa Fluor 594 auf Alexa Fluor 647 gewechselt werden. Es konnten auch nicht zwei parallele Ansätze mit und ohne Saponin durchgeführt werden. In diesem Falle wurde das Saponin benötigt, um das freie DsRed-LC3-egfp aus der Zelle herauszuwaschen (wurde das DsRed-LC3-egfp im Zuge der Autophagie bereits in die Zellmembran eingebaut, wird das egfp-Signal degradiert und ist somit auch nicht mehr nachweisbar). Dies war nötig, da die Spektren von egfp und Alexa Fluor 488 zu dicht beieinander liegen; eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Signalen wäre nicht möglich gewesen. Da die vollständige Entfernung von freiem DsRed-LC3-egfp gelang (Ergebnis nicht dargestellt), kann angenommen werden, dass die Signale, die auf dem Kanal von Alexa Fluor 488 detektiert werden, keine egfp-Signale sind. Bei allen in Abbildung 20 dargestellten Proteinen handelt es sich somit um membranständige Proteine. Für eine bessere Visualisierung wurden die Farbkanäle nach Detektion der entsprechenden Signale neu zugeordnet. Details sind der Abbildung 20 zu entnehmen .

DsRed-LC3-egfp-HeLa-Zellen wurden mit MVA-nsOVA/LC3\_P11 - wie unter Punkt 3.3.7 beschrieben - infiziert. Wie sich in der Abbildung 20 A zeigt, konnten zahlreiche Kollokalisierungen (erkennbar als gelbe Punkte) zwischen dem DsRed gekoppelten LC3 und dem zellulären LC3 nachgewiesen werden. Es ist auffällig, dass durch die Saponinbehandlung einerseits sehr viel nsOVA/LC3 herausgewaschen wurde (vergleiche Abbildung 18 A-D) und andererseits, dass das noch vorhandene nsOVA nicht an die gleichen membranösen Strukturen, wie das in der Zelle befindliche DsRed gekoppelte bzw. zelluläre LC3 zu binden schien (Abbildung 20 B und C). Auch in diesem Falle wurde der Versuch in einem Parallelansatz mit dem Virus MVA-nsOVA\_P11 durchgeführt (Abbildung 20 D – F).

Hier wurde das nsOVA durch die Saponinbehandlung nahezu vollständig ausgewaschen. Kollokalisierungen zwischen LC3 und nsOVA konnten praktisch nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 20: Kolokalisierungen existieren zwischen dsRed-LC3 und endogenem LC3, aber nicht zwischen LC3 und nsOVA**

DsRed-LC3-egfp-HeLa-Zellen wurden mit MVA-nsOVA/LC3\_P11 (Bild A – C) oder MVA-nsOVA\_P11 (Bild D - F) mit einer MOI von 10 infiziert. Eine Stunde nach der Infektion erfolgte die Zugabe von 50µM Chloroquin. Nach weiteren sieben Stunden wurden die Zellen 2x mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für zwei Minuten mit 0,05% Saponin (in PBS) bei Raumtemperatur behandelt und erneut mit PBS gewaschen. Danach wurden beide Ansätze für 15 Minuten in 4% PFA fixiert und anschließend durch die Behandlung von 0,25% Triton X-100 permeabilisiert. Nachdem mit 5% FCS geblockt wurde, wurde für eine Stunde mit den primären (Anti-LC3; Kaninchen und Anti-OVA; Maus) und anschließend für eine Stunde mit den sekundären (Anti-Kaninchen gekoppelt mit Alexa Fluor 647 und Anti-Maus gekoppelt mit Alexa Fluor 488) Antikörpern im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Zellkerne und Virusfabriken mit DAPI gefärbt.

Bilder A-C: Infektion mit MVA-nsOVA/LC3\_P11; Bilder D-F: Infektion mit MVA-nsOVA\_P11.

A) Nachweis von LC3 durch Alexa Fluor 647 (rot) und DsRed (grün). Kolokalisierungen werden als gelbe Punkte dargestellt; B) Nachweis von LC3 durch Alexa Fluor 647 (rot) und nsOVA durch Alexa Fluor 488 (grün). Kolokalisierungen werden als gelbe Punkte dargestellt; C) Nachweis von DsRed (rot) und nsOVA durch Alexa Fluor 488 (grün). Kolokalisierungen werden als gelbe Punkte dargestellt.

Verwendetes Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27.

## 5 Diskussion:

### 5.1 Ziele und Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, durch gezieltes Einschleusen von MVA-produzierten Antigenen in den autophagolysosomalen Weg der Antigenprozessierung die endogene MHC Klasse II vermittelte CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung *in vitro* zu charakterisieren. Dadurch erhofften wir uns zudem, neue Zielstrukturen für immuntherapeutische Ansätze mit pockenviralen Impfvektoren zu identifizieren.

Wir konnten zeigen, dass die rekombinante Expressionskassette korrekt und stabil in Deletion VI integriert war und dass das Fusionsprotein nsOVA/LC3 nach der Infektion verschiedener humaner oder muriner Zellen mit MVA-nsOVA/LC3\_P11 erfolgreich synthetisiert werden konnte. Es konnte ausschließlich im Zytosol der infizierten Zellen detektiert werden. Leider wurde jedoch nur relativ wenig Protein gebildet. Sowohl Proteasom- als auch Autophagieinhibitoren führten zu keiner Akkumulation des Fusionsproteins nsOVA/LC3, allerdings kam es zu einer Akkumulation des endogenen LC3. Beide Abbauwege sind für die MHC Klasse II Präsentation von entscheidender Bedeutung. Außerdem konnten wir nachweisen, dass es nur partiell zu einer Integration von nsOVA/LC3 in eine membranöse Struktur kam, deren Identität nicht abschließend geklärt werden konnte.

Im Vergleich zum Kontrollvirus MVA-nsOVA\_P11 zeigte sich keine Steigerung der antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort. Detaillierte Analysen zeigten, dass vor allem Inhibitoren der frühen Phase der Autophagie die Aktivierung der antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant und gezielt reduzieren konnten.

Analysen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie verdeutlichten, dass es nur vereinzelt Kollokalisierung zwischen LC3 und nsOVA gab. Letztendlich muss diskutiert werden, ob die ausbleibende CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung auf das Viruskonstrukt an sich selbst zurückzuführen ist oder ob MVA alternative Wege der Autophagie verwendet, die unabhängig von der Bildung von Autophagosomen (und daher auch unabhängig von LC3) sind.

### 5.2 Western Blots

#### 5.2.1 Die Entfernung der Sekretionssequenz und der Promotor P11 führen zu einer schwachen und späten Expression von nsOVA/LC3 und nsOVA

Es zeigte sich, dass die Bandenintensitäten von nsOVA/LC3 und nsOVA verglichen mit der OVA-Bande deutlich schwächer waren (Abbildung 6-8). Dies bedeutet, dass von nsOVA/LC3 bzw. nsOVA eine geringere Proteinmenge detektiert wurde, als von dem

Volllängenovalbumin.

MVA-OVA\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 unterschieden sich bis auf die Entfernung der OVA-Sekretionssequenz nicht voneinander. Da die relative Bandenintensität von nsOVA/LC3 und nsOVA eine ähnliche Stärke aufwies (Abbildung 7), liegt die Vermutung nahe, dass die verminderte Proteinproduktion am ehesten auf die Entfernung der Sekretionssequenz zurückzuführen ist, während die Fusion von nsOVA an LC3 kaum eine Auswirkung auf die produzierte Proteinmenge zu haben scheint.

Die Transkription von nsOVA und nsOVA/LC3 unter dem späten Promotor P11 könnte ebenfalls zu der Problematik beitragen. Die Kinetik der Abbildung 5 verdeutlicht, dass auch sechs Stunden nach der Infektion noch keine ausreichend detektierbaren Mengen des ebenfalls unter dem Promotor P11 stehenden sekretierenden Volllängenovalbumins nachgewiesen werden konnten (MVA-OVA\_P11). Die Proteinbanden nach 24 Stunden waren nur für nsOVA und nsOVA/LC3 schwer zu erfassen und bedurften einer außergewöhnlich langen Belichtungszeit. Daraus kann geschlossen werden, dass es unter dem von uns verwendeten Promotor P11 zu einer, wie erwartet späten, aber überraschend geringen Proteinproduktion (Siehe auch Punkt 5.2.2) kam.

Da die Proteinmenge von nsOVA/LC3 und nsOVA miteinander korrelierte, konnten diese Konstrukte - was die Vergleichbarkeit untereinander angeht – dennoch verwendet werden.

### 5.2.2 Proteasominhibitoren führen zu einer abgeschwächten Proteinbiosynthese aufgrund einer Blockade der viralen DNA-Replikation und einer kompensatorischen Aktivierung der Autophagie

Die meisten zellulären Proteine in eukaryontischen Zellen werden entweder durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) oder Autophagie abgebaut (Siehe Punkt 1.2.2) (184). Da die Proteinmenge sowohl von nsOVA/LC3 als auch nsOVA sehr gering war, sollte mit dem Einsatz der Proteasominhibitoren Epoxomicin bzw. MG 132 einer der Hauptarme der Proteindegradation unterdrückt werden. In der Konsequenz sollte dies, sofern dieser Degradationsweg eine Rolle spielt, zu einer Akkumulation der Proteine führen. Wir erhofften uns dadurch eine erleichterte Nachweisbarkeit der Proteine im Western Blot. Wie sich in den Abbildungen 6 A und B zeigt, konnte diesen Erwartungen jedoch nicht entsprochen werden.

Die Gründe für die verminderte Proteinbiosynthese unter den Proteasominhibitoren können vielfach sein. Am ehesten kann dieses Phänomen durch die Arbeit von Satheshkumar *et al.* erklärt werden. Diese konnten zeigen, dass in Vaccinia Viren unter dem Einsatz dieser beiden Inhibitoren zwar die frühe Genexpression auftrat; die mittlere und späte Genexpression

waren jedoch schwerwiegend beeinträchtigt, wofür am ehesten eine irreversible Blockade der viralen DNA-Replikation verantwortlich gemacht wurde. Der kritische Zeitpunkt lag bei zwei bis vier Stunden nach der Infektion. Es stellte sich allerdings heraus, dass die späte Genexpression nur leicht inhibiert wurde, wenn die Inhibitoren vier oder sechs Stunden nach der Infektion hinzugegeben wurden (178). Wir gingen davon aus, dass es fünf Stunden nach der Infektion durch die Inhibition der proteolytischen Degradation in der Summe zu einer Akkumulation der unter der Kontrolle des späten Promotor P11 stehenden Genprodukte kommen würde.

Während in der oben genannten Studie Vaccinia Viren verwendet wurden, arbeiteten wir jedoch mit MVA, welches Teile des ursprünglichen Genoms verloren hat. Hierdurch kommt es zu veränderten Funktionen und Eigenschaften des Virus – insbesondere auch die Replikation betreffend. MVA hat möglicherweise eine ganz andere Kinetik als das ursprüngliche Vaccinia Virus. Zusätzlich haben wir einen anderen Promotor verwendet. In der oben genannten Studie konnten die Proteine, welche ebenfalls unter einem späten Promotor standen, bereits 6 Stunden nach der Infektion nachgewiesen werden. Bei uns gelang dies nicht (Abbildung 5). Offenbar dauert die Virusreplikation und somit die Expression der mittleren und späten Gene in unserem Setting etwas länger. Vor diesem Hintergrund könnte es durch das Hinzufügen der Inhibitoren fünf Stunden nach der Infektion zu einer schweren irreversiblen Beeinträchtigung der viralen DNA-Replikation gekommen sein. Untermuert wird diese Überlegung durch die Tatsache, dass das endogene LC3 durch die Inhibitoren nicht abnahm, sondern es eher zu einer leichten Akkumulation zu kommen schien (Abbildung 6 C). Demzufolge waren die Inhibitoren funktionell, so dass der autophagosomale Flux unterbrochen wurde und es zu einer Akkumulation von LC3 (möglicherweise von Autophagosomen; Siehe Punkt 5.4) kam.

Ob die ausbleibende Akkumulation von nsOVA/LC3 in unserem Setting darauf zurückzuführen war, dass wir einen anderen Promotor für die späte Genexpression verwendeten oder darauf, dass wir anstelle von Vaccinia Virus MVA benutzten, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Darüber hinaus wiesen Studien darauf hin, dass MG132 die Formation von autophagischen Vesikeln induzieren kann, was an dem ER-Stress liegen dürfte (185). In Anlehnung daran konnte gezeigt werden, dass Proteasominhibitoren über die Aktivierung von AMPK und die Inhibition von mTORC1 Autophagie als einen kompensatorischen Mechanismus aktivieren (185-187). Ebenfalls ist bekannt, dass Autophagie als ein Backup-system des UPS arbeitet. Im Falle einer Überlastung oder dem Aussetzen des UPS kann Autophagie helfen oder die Arbeit übernehmen und damit durch die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen zum

Autolysosom zu einer Elimination von Proteinen beitragen (188). Es könnte daher zum gegenteiligen Effekt in Form einer verstärkten Degradation der betreffenden Proteine durch die Heraufregulierung der Autophagie gekommen sein.

Zu beachten ist auch, dass die Inhibition der Proteasomen einen Einfluss auf den Zellzyklus, Zellwachstum und das Überleben von Zellen hat (189). Auch hier kann es zu einer Beeinträchtigung gekommen sein. Dies könnte beispielsweise durch eine durchflusszytometrische Analyse hinsichtlich eines toxischen Effektes der Inhibitoren z.B. mittels EMA-Färbung geprüft werden.

### 5.2.3 Späte Autophagieinhibitoren führen ebenfalls zu einem relevanten Proteinverlust

Vor dem Hintergrund der in 5.2.2 angestellten Überlegungen wurden die Autophagieinhibitoren Bafilomycin A1 bzw. Chloroquin verwendet, um den zweiten Arm der Proteindegradation zu inhibieren und eine Akkumulation der Autophagosomen (und damit von nsOVA/LC3) hervorzurufen (190).

Bafilomycin A1 ist ein sehr spezifischer Inhibitor der „*vacuolar type H<sup>+</sup>-ATPase*“ (V-ATPase) (191-193). Seine Wirkung beruht auf der Inhibition der „*membrane-spanning pore forming domain of the enzyme*“ (194, 195). Dadurch inhibiert Bafilomycin A1 reversibel die Ansäuerung von Organellen, die dieses Enzym beinhalten, wie Lysosomen und Endosomen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Bafilomycin A1 dadurch die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen inhibiert (108, 196). Hierdurch kommt es zu einer Akkumulation der Autophagosomen, während die Anzahl der Autolysosomen abnimmt, da die Reifung der Autophagosomen zu Autolysosomen inhibiert wird (196, 197).

Wie bereits ausführlich dargestellt (Abbildung 9), erwies sich Bafilomycin A1 in den meisten Fällen nicht als vorteilhaft für die Akkumulation von nsOVA/LC3 bzw. nsOVA (Abbildung 9 A, B, D, E); auch hier kam es eher zum gegenteiligen Effekt. Wie bereits bei den Proteasominhibitoren beobachtet, kam es auch unter den Autophagieinhibitoren zu einer Akkumulation von endogenem LC3 (Abbildung 9 C, F). Daher kann auch hier vermutet werden, dass die Autophagieinhibitoren die Genexpression von nsOVA/LC3 bzw. nsOVA beeinträchtigen. Alternativ könnte es auch Probleme beim Einbau von nsOVA/LC3 in die autophagosomale Membran geben, so dass die Autophagosomen sich über das Protein nicht nachweisen lassen (Siehe Punkt 5.2.4)

Möglicherweise ist auch die Infektion der Zellen mit dem jeweiligem Virus beeinträchtigt, denn die Internalisierung von Vaccinia Virus bzw. MVA findet durch Endozytose statt. Das

bedeutet, dass eine Fusion mit der zellulären Plasmamembran stattfinden muss, wofür eine vesikuläre Ansäuerung benötigt wird (198-200). Aus diesem Grund wurde Bafilomycin A1 erst 4 Stunden bzw. 20 Stunden nach der Infektion der Zellen hinzugefügt. Ob daraus dennoch eine Beeinträchtigung resultiert, kann nicht mit abschließender Sicherheit gesagt werden. Eine Infektionskontrolle mit Vaccinia Virus Antikörper deutete jedoch nicht darauf hin.

Wichtig zu bedenken ist ebenfalls, dass eine Neutralisation oder Inhibition von Lysosomen mTORC1 inhibieren kann, wodurch Autophagie sekundär induziert wird (201, 202). Auch dies kann zu dem beobachteten Proteinverlust führen.

Einige Studien wiesen darauf hin, dass Bafilomycin A1 die Apoptose triggern kann (203). Dies könnte eine Erklärung für den starken Proteinverlust sein, welcher nach zwanzigstündiger Behandlung (insbesondere der BMDCs bzw. DC2.4-Zellen) sichtbar wird.

#### 5.2.4 nsOVA/LC3 wird nur selten in eine membranöse Struktur integriert

Es ist auffällig, dass es insbesondere bei den murinen Zellen durch die Behandlung mit Saponin zu einem starken nsOVA/LC3-Verlust kam. Die Erwartung war, dass große Teile des nsOVA/LC3 in die autophagosomale Membran integriert und damit durch eine Saponinbehandlung der Zellen nicht ausgespült werden.

Möglicherweise liegt dies an der Methodik, so dass die Membranen (insbesondere die der kleineren Zellen wie BMDCs oder DC 2.4 Zellen) hier zu stark durch das Saponin geschädigt wurden und eine geringere Konzentration hätte verwendet werden müssen. Eine geringere Einwirkzeit (1 Minute) führte allerdings nicht zu einer Verbesserung des Ergebnisses.

Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass die Morphologie der Zellen und damit möglicherweise auch die der Autophagosomen in verschiedenen Zellen bzw. Zelllinien (human vs. murin) unterschiedlich ist und daher unterschiedlich auf eine Virusinfektion reagiert bzw. auch das Virus einen Einfluss auf die Zellmorphologie hat. Beispielsweise ist bekannt, dass MVA verglichen mit dem Wildtyp *Western Reserve* (WR) nur einen minimalen CPE in humanen Zelllinien hervorruft (12, 204). Damit übereinstimmend ließ sich das Fusionsprotein nsOVA/LC3 im Western Blot unter der Behandlung mit Saponin bei den HeLa-Zellen noch relativ gut nachweisen, wodurch impliziert wird, dass das Protein - zumindest partiell - in eine membranöse Struktur integriert wurde.

Da jedoch bei allen verwendeten Zelllinien beobachtet wurde, dass es unter Behandlung mit Saponin zu einem deutlichem Verlust von nsOVA/LC3 kam, liegt die Vermutung nahe, dass die in Abbildung 2 beschriebene Signalkaskade mit der anschließenden LC3-Lipidation nicht bzw. nur eingeschränkt stattfindet. Eine Möglichkeit wäre, dass es durch die Kopplung von

nsOVA an LC3 zu einer Verlegung des C-Terminus durch die Proteinfaltung im dreidimensionalen Raum kommt, wodurch die LC3-Lipidation nicht ausreichend oder gar nicht stattfinden kann. Nicht in die autophagosomale Membran integriertes LC3 würde durch die Behandlung mit Saponin entfernt werden und wäre nicht mehr nachweisbar. Insbesondere vor dem Hintergrund der schwachen T-Zellaktivierung sowie den Schwierigkeiten der Nachweisbarkeit des Fusionskonstruktes im konfokalem Mikroskop – vor allem nach der Behandlung mit Saponin - muss ein erschwerter oder teilweise fehlerhafter Einbau des Fusionskonstruktes in die membranöse Struktur in Erwägung gezogen werden. Diese Theorie wird durch einen Vergleich mit dem endogenen LC3 unterstützt. Dieses wird durch die Behandlung mit Saponin nur teilweise entfernt, so dass ein gewisser Teil in einer membranösen Struktur – der autophagosomalen Membran – verankert ist (Abbildung 9 C, F). Um den Nachweis von nsOVA/LC3 trotz der Verwendung von Saponin zu erleichtern, wurde versucht, durch Bafilomycin A1 bzw. Chloroquin eine Akkumulation der Autophagosomen und damit einhergehend der autophagosomal assoziierten Proteine zu erreichen. Wie bereits unter Punkt 5.2.3 beschrieben, blieb die erwartete Akkumulation für die getesteten Proteine jedoch aus.

Durch das Fehlen von LC3 handelt es sich beim nsOVA um ein rein zytosolisches Protein, welches nicht in die Membran integriert wird. Deshalb wird es durch die Saponinbehandlung ausgewaschen und ist somit nicht mehr nachweisbar. Dies gelang bei allen Zelllinien.

## 5.3 T-Zell Versuche:

### 5.3.1 Sowohl Eigenschaften des viralen Vektorkonstrukts als auch alternative Wege der Autophagie können für die ausbleibende OVA-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung verantwortlich sein

In einer früheren Studie zeigte sich, dass IFN- $\gamma$  in sehr viel größerem Maße von den T-Zellen ausgeschüttet wird als IL-2, dessen Produktion eine deutlich stärkere Stimulation durch die APZs erfordert. Offenbar wird eine höhere Dichte der MHC Klasse II gebundenen Peptide auf der Oberfläche der APZs benötigt, um die Produktion des IL-2 gleichermaßen zu induzieren (164). Die Auswertung der IFN- $\gamma$ -Schwankungen schien daher zielführender zu sein.

Die Abbildungen 11, 13, 14 und 15 verdeutlichen, dass es zwischen MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 keinen signifikanten Unterschied bezüglich der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung gab. Allerdings gab es starke Differenzen zwischen den Promotoren P11 (spät) und P7.5 (früh/spät) sowie zwischen dem Volllängenovalbumin (OVA) und dem nicht sekretierenden Ovalbumin (nsOVA). Für die unterschiedlich starke CD4<sup>+</sup> T-

Zellaktivierung zwischen den verschiedenen Promotoren konnte erst kürzlich eine mögliche Erklärung – allerdings unter Verwendung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen - gefunden werden (205). Es wurde dargestellt, dass nach Infektion mit MVA die späte Phase der Genexpression in den Virusfabriken stattfindet. Spät exprimierte Antigene sind daher zunächst in den Virusfabriken eingeschlossen und nach ca. 7 Stunden erstmals außerhalb der Virusfabriken nachweisbar. Dadurch werden die viralen Antigene vor dem proteasomalen Abbau geschützt. Dies führte zu einer geringeren Prozessierung der Antigene und in der Folge zu einer verspäteten oder ausbleibenden Aktivierung von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Kernaussage der oben dargestellten Studie kann auf die hier vorliegende Problematik übertragen werden. Antigene, welche in den Virusfabriken lokalisiert sind, stehen für den autophagosomalen Abbauprozess nicht zur Verfügung, wodurch eine geringere oder ausbleibende Präsentation der Antigene über MHC Klasse II Komplexe resultiert. Folglich kommt es auch zu einer verspäteten oder ausbleibenden Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Da es unter der Verwendung von P7.5 zu einer 5,42-fach erhöhten IFN- $\gamma$ -Produktion verglichen mit P11 kam, wäre es im Rahmen weiterführender Studien von Interesse, die Versuchsreihe um die Viren MVA-nsOVA/LC3\_P7.5 und MVA-nsOVA\_P7.5 zu ergänzen. Unter diesen Bedingungen wären eine frühere Proteinproduktion außerhalb der viralen Fabriken und folglich auch eine bessere CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort mit höherer IFN- $\gamma$ -Produktion zu erwarten. Dies würde bessere Voraussetzungen für weiterführende Studien schaffen, in denen die Auswirkungen verschiedener Autophagieinhibitoren sicherer beurteilt werden könnten.

Die stärkere antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung nach Infektion mit MVA-OVA\_P11 - verglichen mit MVA-nsOVA\_P11 - ist am ehesten auch auf die unterschiedliche Menge viraler Antigene, welche über die MHC Klasse II Komplexe präsentiert werden können, zurückzuführen. Unterstützt wird diese Theorie durch die in den Abbildungen 6-8 dargestellten Western Blots. Hier wurde von dem Volllängeovalbumin eine höhere Proteinmenge detektiert als von nsOVA/LC3 bzw. nsOVA. Offenbar können die unterschiedlichen Wege der Antigenpräsentation das Ungleichgewicht der vorhandenen Proteinmenge nicht abfangen. Aufgrund der basalen Autophagie, möglichen alternativen Wegen der Autophagie und verschiedener intrazellulärer Transportprozesse wird von dem in sehr viel größeren Mengen vorhandenen Volllängeovalbumin mehr über die MHC Klasse II Moleküle präsentiert, als von dem nur wenig vorhandenen nsOVA bzw. nsOVA/LC3 - sogar trotz gezieltem Einschleusen in den klassischen autophagischen Abbauprozess über die Kopplung an LC3 (wobei es fraglich ist, ob dieser Mechanismus einerseits funktioniert und andererseits relevant ist) (Siehe Punkt 5.2.4 und Punkt 5.4). Letztendlich kann ohne die

adäquate Bereitstellung der entsprechenden Antigene keine endogene MHC Klasse II Präsentation und somit keine Aktivierung der OVA-spezifischen T-Zellen stattfinden.

Die Ursache für das Ausbleiben eines signifikanten Unterschiedes der antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung zwischen MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 liegt möglicherweise an der geringen Proteinmenge. Wahrscheinlich ist diese bei beiden Konstrukten zu gering, als dass sie für darauf aufbauende quantitative Analysen verwendet werden kann. Möglicherweise kommt es kaum zu einer Präsentation der nsOVA-Fragmente über die MHC Klasse II Komplexe, was die geringe OVA-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung zur Folge hat.

Neben den funktionellen Problemen des von uns verwendeten Virus können auch alternative Wege der klassischen Autophagie für die Problematik verantwortlich sein (Punkt 5.5). An dieser Stelle ist auf die Arbeit von Comber *et al.* zu verweisen (206). Die Autoren zeigten, dass eine Influenza A Virus Infektion funktionelle Makroautophagie induzierte. Außerdem stellten sie mit Hilfe gentechnisch veränderter Substrate – in diesem Fall S1LC3 – dar, dass Autophagie zur Präsentation von endogenen Antigenen auf MHC Klasse II Molekülen beiträgt, sofern diese an LC3 gekoppelt waren. Dennoch leistete Autophagie nach einer Influenza A Virus Infektion keinen signifikanten Beitrag zur CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort. Dies lag daran, dass für die MHC Klasse II restringierte Präsentation während einer Influenza A Virus Infektion nicht Autophagie, sondern überwiegend proteasomale Aktivität verantwortlich ist. Vor diesem Hintergrund ist der Einsatz von Proteasominhibitoren in unserem Setting als kritisch zu bewerten (Punkt 5.2.2). Eine Verstärkung autophagosomaler Aktivität führte somit nicht folglich auch zu einer verstärkten CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung. Sie stellten die Vermutung auf, dass der Beitrag der Makroautophagie zur MHC Klasse II restringierten CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort möglicherweise von dem jeweiligen Pathogen abhängt (206). In der gleichen Studie wurde zudem darauf aufmerksam gemacht, dass die aggressive Protolyse, welche mit Autophagie assoziiert ist, für die Antigenprozessierung kontraproduktiv sein könnte. So könnte die Präsentation vieler Epitope beeinträchtigt oder komplett aufgehoben sein. Auch dies könnte in unserem Fall ein Grund sein, weshalb es zu einer relativ eingeschränkten CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort kam. Stellenweise konnten jedoch mit der von uns verwendeten Methode auch Erfolge erzielt werden (67). Schmid *et al.* fusionierten das Influenza Matrix Protein (MP1) an LC3. Dies führte zu einer deutlich verstärkten MHC Klasse II Präsentation (bis zu 20-fach) an die CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie in der Folge auch zu einer verbesserten CD4<sup>+</sup> T-Zell Erkennung des Influenza Matrix Protein 1 (MP1). Ein Einfluss auf die CD8<sup>+</sup> T-Zell Erkennung lag nicht vor. Daraus kann geschlossen werden, dass unter den beschriebenen Bedingungen an LC3 fusionierte Antigene vor allem über Makroautophagie prozessiert und auf MHC Klasse II

Komplexe geladen wurden (67).

Darauf basierend konnten Jin *et al.* zeigen, dass es durch die Fusion des SIVgag Protein an LC3b zu einer effektiveren CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort kommt, als dies ohne Fusion der Fall gewesen wäre (207). Ebenfalls gelang eine verbesserte Immunaktivierung nach der Fusion von HIV-Antigenen an LC3 (208). Auch für Tumorantigene konnten diese funktionsverstärkenden Experimente durchgeführt werden (209). Diese verschiedenen Studien verdeutlichen, dass an LC3 gekoppelte Antigene unter bestimmten Umständen effizient über MHC Klasse II Moleküle präsentiert werden können. Wahrscheinlich ist die erfolgreiche Präsentation jedoch abhängig vom verwendeten Virus, dem verwendeten Antigen (stellvertretend für das Pathogen) sowie Umgebungsfaktoren (beispielsweise Wirtszelle, Medium, Inhibitoren etc.).

Dadurch, dass einerseits Kontrollen mitgeführt und andererseits die T-Zellen vor ihrer Verwendung getestet wurden, gelten ein Versagen der T-Zellen sowie eine nicht adäquate Infektion der APZs für die vorliegende Problematik in unserem Setting als unwahrscheinlich.

Als Infektionskontrolle diente das virale Protein B5. Dieses wird in das Viron inkorporiert und präsentiert sich damit im Gegensatz zu OVA eher als exogenes Antigen. Exogene Antigene werden normalerweise hauptsächlich über MHC Klasse II Komplexe an CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert. Demzufolge sollte die Aktivierung der B5-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (angezeigt durch eine hohe Zytokinausschüttung) unabhängig vom Virus unproblematisch sein. Dies konnte bestätigt werden (Abbildung 11, 13, 14 und 15). Da die Zytokinausschüttung hier bei allen Viruskonstrukten nahezu identisch war, kann davon ausgegangen werden, dass die APZs durch alle Viren gleichermaßen infiziert werden konnten.

### 5.3.2 Neben Autophagie sind die späten lysosomalen und endosomalen Kompartimente für die MHC Klasse II Präsentation relevant

Um das Verständnis über das Verhalten der Viruskonstrukte weiter zu vertiefen, wurden verschiedene Autophagieinhibitoren eingesetzt. Bafilomycin A1 ist der einzige der verwendeten Inhibitoren, der in der späten Phase der Autophagie eingreift. Daraus resultiert möglicherweise eine relativ unspezifische Wirkung, welche darauf zurückgeführt werden kann, dass die endogene Präsentation der Antigene in unserem Setting nahezu komplett inhibiert werden konnte; sogar unter dem Promotor P7.5, unter dem es initial zu einer starken T-Zellaktivierung kam. Dieser starke inhibitorische Effekt deckt sich zwar mit den Beobachtungen von Kaizuka *et al.*, welche zeigen konnten, dass Bafilomycin A1 unter Verwendung von normalem Medium der stärkste bisher bekannte Inhibitor der Autophagie ist

(181); es darf aber nicht übersehen werden, dass in unserem Setting die stärkste Zytokinreduktion das MVA-OVA\_P7.5 und nicht das MVA-nsOVA/LC3\_P11 betraf. Dies könnte einerseits – wie bereits erwähnt - auf einen relativ unspezifischen Effekt des Inhibitors hindeuten, da MVA-OVA\_P7.5 Autophagie nicht in dem Ausmaß adressiert, wie es bei MVA-nsOVA/LC3\_P11 der Fall sein sollte. Andererseits muss vor den in Punkt 5.2.1 sowie 5.3.1 dargestellten Überlegungen beachtet werden, dass die unter dem Promotor P11 exprimierten viralen Antigene nicht nur sehr spät produziert werden, sondern sich zunächst auch in den Virusfabriken aufhalten. Der Beitrag zu Autophagie ist daher möglicherweise recht gering, weshalb auch ein Autophagieinhibitor in diesem Setting wenig effektiv sein dürfte. Daher könnte es auch sein, dass durch Bafilomycin A1 die basale bzw. durch Stress induzierte Autophagie nach Infektion der BMDCs mit MVA-OVA\_P7.5 effektiv inhibiert wurde, während der Inhibitor bei MVA-nsOVA/LC3\_P11 keinen großen Effekt hatte, da bei unzureichender intrazellulärer Proteinmenge der autophagische Abbauprozess kaum effizient inhibiert werden konnte.

Ein signifikanter Unterschied im Bezug auf die OVA spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung zwischen MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 konnte unter Verwendung des Inhibitors nicht festgestellt werden. Dies entspricht allerdings den Erwartungen, da durch die Unterdrückung der Autophagie der Vorteil des MVA-nsOVA/LC3\_P11 gegenüber dem MVA-nsOVA\_P11 bezüglich einer effizienteren Präsentation der Antigene über MHC Klasse II Komplexe aufgehoben ist. Die Reduktion der IFN- $\gamma$ - und IL-2-Ausschüttung nach Einsatz des Inhibitors war in Bezug auf MVA-nsOVA/LC3\_P11 signifikant; dies galt jedoch nicht für MVA-nsOVA\_P11. Dies entspricht den Erwartungen, denn bei MVA-nsOVA\_P11 findet durch die fehlende Kopplung von nsOVA an LC3 keine gezielte Adressierung der Autophagie statt. Demzufolge sollte eine Inhibition der Autophagie auch nicht zu einer relevanten Beeinträchtigung der CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung führen.

Bei der Interpretation sollte beachtet werden, dass durch Bafilomycin A1 auch noch viele weitere vesikuläre Strukturen (z.B. Endosomen, Lysosomen etc.) beeinflusst und intrazelluläre Transportprozesse inhibiert werden (183), die ebenfalls einen Einfluss auf zelluläre Abbauprozesse bzw. die Antigenpräsentation ausüben. Ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen der Verwendung von Bafilomycin A1 und der Unterdrückung der Zytokinproduktion aufgrund der Unterbindung der Autophagie kann dadurch nicht mit Sicherheit bewiesen werden.

Insbesondere die hier erzielte stark reduzierte Zytokinantwort von MVA-OVA\_P7.5 im Vergleich mit den anderen Inhibitoren, die früher in den autophagosomalen Abbauprozess eingreifen und damit wahrscheinlich spezifischer wirken (Siehe Punkt 5.3.3), ist ein Hinweis

dafür, dass es neben der Autophagie noch weitere relevante lysosomale Abbauprozesse gibt, die letztendlich in einer gemeinsamen Endstrecke zur Präsentation von intrazellulären Antigenen über MHC Klasse II Komplexe münden. Die späten lysosomalen und endosomalen Kompartimente sind damit nicht nur der Endpunkt der Autophagie, sondern auch vieler anderer intrazellulärer Prozesse, die zur MHC Klasse II Präsentation beitragen.

### 5.3.3 Autophagieinhibitoren der frühen Phase der Autophagie zeigen eine relevante und spezifische Wirkung

Mit Wortmannin und 3-MA wurden zwei weitere bekannte Inhibitoren verwendet, die früher in die Signalkaskade eingreifen (Abbildung 2). Parallele Abbauprozesse können so weiter existieren. Die Inhibitoren dürften daher gezielter in Autophagie eingreifen.

Sowohl 3-MA als auch Wortmannin führten zu keiner signifikanten Reduktion der IFN- $\gamma$  und IL-2 Ausschüttung der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen - weder nach Infektion mit MVA-nsOVA/LC3\_P11 noch mit MVA-nsOVA\_P11. Auch ein Vergleich der Zytokinausschüttung der beiden Viren untereinander führte zu keinem signifikanten Unterschied. Dies soll jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass 3-MA mit die potenteste Wirkung von allen in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren auf beide Viren ausübte (Ca. 8,5-fache Reduktion der IFN- $\gamma$  Ausschüttung bei MVA-nsOVA/LC3\_P11 und ca. 8-fache Reduktion der IFN- $\gamma$  Ausschüttung bei MVA-nsOVA\_P11). Es kann somit durchaus von einem Einfluss auf den autophagischen Abbauprozess ausgegangen werden. Möglicherweise ist die fehlende Signifikanz auf die in unserem Setting aufgetretene hohe Standardabweichung sowie die kleine Stichprobe zurückzuführen. Das Ausbleiben einer statistischen Signifikanz muss jedoch nicht gleichzeitig den Ausschluss einer klinischen Relevanz nach sich ziehen.

Ein weiterer Hinweis, dass 3-MA gezielter als Bafilomycin A1 in Autophagie eingreift, wird dadurch unterstützt, dass es nur zu einer ca. 3,5-fachen Reduktion der IFN- $\gamma$  Ausschüttung nach Infektion mit MVA-OVA\_P7.5 kam. Parallel existierende Abbauprozesse bleiben durch den früheren Eingriff intakt, so dass es im Falle von MVA-OVA\_P7.5 immer noch zu einer vergleichsweise hohen Präsentation von Ovalbumin über die MHC Klasse II Komplexe kommen dürfte.

Die eingangs erläuterte Vermutung, dass Wortmannin dem 3-MA überlegen sein könnte, bestätigte sich bei uns nicht. Dies könnte an dem unterschiedlichen Setting der verschiedenen Studien liegen. Wu *et al.* verglichen die beiden Inhibitoren nicht im Kontext einer Virusinfektion, sondern im Zusammenhang mit einer nährstoffarmen bzw. nährstoffreichen Umgebung. Sind die Zellen ausreichend mit Nährstoffen versorgt, tritt nach neun Stunden

eine umkehrende Wirkung von 3-MA ein; müssen die Zellen hungern, kann dieser Effekt nicht beobachtet werden. Wortmannin unterdrückte Autophagie hingegen unabhängig vom Nährstoff-Status (182). Auch Kaizuka *et al.* verwendeten keine Viren, sondern ebenfalls unterschiedliche Medien (181). Möglicherweise übt die Virusinfektion jedoch ebenfalls einen Einfluss auf das Verhalten der Inhibitoren aus, so dass unter diesen Umständen 3-MA potenter als Wortmannin ist. Auch die Zellen könnten einen Einfluss haben. Wu *et al.* benutzten MEF (*mouse embryonic fibroblast*)-Zellen, während Kaizuka *et al.* HeLa-Zellen verwendeten.

Auf der Suche nach noch spezifischeren Inhibitoren der Autophagie, welche ganz früh in die Signalkaskade eingreifen und dadurch möglichst wenig mit anderen Abbauprozessen interagieren, griffen wir auf MRT67307 zurück. Dies ist ein erst kürzlich beschriebener spezifischer Inhibitor der frühen Phase der Autophagie. Er inhibiert ULK1 und ULK2. Dies macht sich durch eine verminderte Phosphorylierung von Atg13 innerhalb dieses Komplexes bemerkbar (183). Es zeigte sich, dass es auch unter Verwendung von MRT67307 keinen signifikanten Unterschied zwischen den Viren MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 gab (Abbildung 15). In beiden Fällen wurde jedoch eine signifikante Reduktion der IFN- $\gamma$ -Ausschüttung der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen erzielt. Da MRT67307 einerseits sehr spezifisch für ULK1 ist und auf der anderen Seite davon ausgegangen wird, dass ULK1 sehr spezifisch für Autophagie ist (210), ist die Glaubhaftigkeit einer Korrelation zwischen der Unterdrückung der Autophagie und der Reduktion der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort hier deutlich wahrscheinlicher.

Da MRT67307 ein vielversprechender Inhibitor in Bezug auf Autophagie zu sein scheint, sahen wir uns auch das Verhalten der Viren unter dem Einfluss von MRT68921 (1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) sowie SBI-0206965 (10  $\mu$ M) an (Anhang Abbildung 24 A, B). MRT68921 verhindert ebenfalls die Phosphorylierung von Atg 13. Gleiches gilt für SBI-0206965. Darüber hinaus inhibiert es die Phosphorylierung von Ser15 an Beclin 1 und Ser249 an Klasse III PI3K (211, 212).

Unter einer vergleichbaren Toxizität (Anhang Abbildung 23) mit MRT67307 bzw. MRT68921 (1  $\mu$ M) zeigte insbesondere SBI-0206965 eine stark potente Wirkung. Die IFN- $\gamma$ -Ausschüttung OVA-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Zugabe dieses Inhibitors konnte nach Infektion mit MVA-nsOVA/LC3\_P11 um das 10,75-fache reduziert werden (Anhang, Abbildung 24 C). Damit zeigte SBI-0206965 eine noch stärker inhibierende Wirkung als 3-MA und könnte daher als Alternative gut geeignet sein. Durch die geringe Wirkung auf MVA-OVA\_P7.5 scheinen MRT68921 und SBI-0206965 eine relativ spezifische Wirkung zu haben. MRT68921 zeigte in einer Konzentration von 10  $\mu$ M eine stärkere Toxizität gegenüber

den BMDCs, weshalb die deutlich verminderte Zytokinausschüttung kritisch betrachtet werden muss.

Da aus den vorausgehenden Darstellungen deutlich wird, dass die Identifikation von potenten Autophagieinhibitoren, welche möglichst früh und gezielt in die Signalkaskade eingreifen, von essentieller Bedeutung ist, sollten insbesondere MRT67307 und SBI-0206965, aber auch anderen Inhibitoren, welche in die frühe Phase der Autophagie eingreifen, in weiterführenden Studien eine erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt werden. Möglicherweise können hier größere Studien mit einer größeren Stichprobengröße (Fallzahlen) auch signifikante Daten erbringen. Anschließend können diese Inhibitoren einen wesentlichen Beitrag zur weiteren molekularen Charakterisierung autophagolysosomaler Wege, welche zu einer MHC Klasse II Präsentation führen, leisten.

## 5.4 Unterschiedliche Lokalisation von nsOVA/LC3 und zellulärem LC3 in der konfokalen Mikroskopie

Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie sollte - insbesondere vor dem Hintergrund der nahezu identischen CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort von MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 - ein Eindruck der intrazellulären Prozesse in morphologisch intakten Zellen gewonnen werden. Die eingangs durchgeführte Western Blot-Analyse konnten zwar die Existenz des Fusionsproteins bestätigen, es konnte jedoch keine Aussage über die Lokalisation des nsOVA/LC3 innerhalb der Zelle getroffen werden.

Mit Hilfe des Virus MVA-NP-SIINF-egfp konnte verdeutlicht werden, dass die Zellen unter den Bedingungen des Versuchs optimal infiziert werden konnten (Abbildung 16). Durch den Nachweis einiger Kolokalisierungen zwischen nsOVA und LC3 in den Virusfabriken acht Stunden nach Infektion mit MVA-nsOVA/LC3\_P11 konnte gezeigt werden, dass die Synthese von nsOVA/LC3 sowie dessen Detektion möglich ist. Es sollte beachtet werden, dass dieser Nachweis zum einen nur vereinzelt gelang; teilweise waren die Virusfabriken auch leer (Abbildung 17). Dies ist jedoch mit den Ergebnissen, die mit Hilfe des Western Blots gewonnen werden konnten, kompatibel, da anscheinend nur wenig Protein gebildet wird. Überraschenderweise konnten andererseits Virusfabriken identifiziert werden, in denen sich nur nsOVA nachweisen ließ, nicht jedoch LC3, obwohl eine Infektion mit MVA-nsOVA/LC3\_P11 stattgefunden hatte. Das Auftreten von freiem nsOVA entsprach insbesondere vor dem Hintergrund der durchgeführten Western Blots nicht den Erwartungen, da das Fusionsprotein stabil zu sein schien. Zerfallsprodukte ließen sich zu keinem Zeitpunkt durch den Western Blot nachweisen. Auffällig war überdies die Tatsache, dass auch

außerhalb der Virusfabriken sehr viel freies nsOVA zu detektieren war. Durch das Mitführen einer Negativkontrolle kann ein unspezifisches Binden des Antikörpers als mögliche Erklärung hierfür ausgeschlossen werden.

Für die dargelegte Problematik können mehrere Erklärungen (oder deren Kombination) in Betracht kommen. Es könnte zum einen zu einem Problem mit der Bindung des primären oder sekundären Antikörpers gegen LC3 kommen. Zwar konnte mit Hilfe der dsRed-LC3-egfp-Zellen sichergestellt werden, dass die verwendeten Antikörper gegen LC3 mit hoher Sensitivität und Spezifität an scheinbar membranös lokalisiertes dsRed-LC3 binden. Ob dies auch innerhalb der dreidimensionalen Struktur des Fusionsproteins der Fall ist, bleibt jedoch spekulativ, da das in der Zelle gebildete dsRed-LC3 und das viral eingebrachte nsOVA/LC3 parallel existieren und durch die Bindung mit dem primären bzw. sekundären Antikörper gegen LC3 zunächst nicht unterschieden werden können. Allerdings befindet sich das dsRed-gekoppelte LC3 bereits vor der Infektion und damit deutlich vor dem MVA produzierten nsOVA/LC3 in der Zelle. Des Weiteren darf nicht vergessen werden, dass die Expression von dem dsRed-gekoppelten LC3 nicht in den Virusfabriken, sondern im Zytoplasma stattfindet. Demzufolge hat dsRed-LC3 eine völlig andere Expressionskinetik und Lokalisation in der infizierten Zelle. Es besteht daher immer noch die Möglichkeit, dass es durch die Fusion von nsOVA an LC3 zu einer partiellen Verlegung der Bindungsstelle für den primären LC3-Antikörper im dreidimensionalen Raum gekommen sein könnte, wodurch die Detektion erschwert wird (Siehe Punkt 5.2.4). Dadurch, dass es durch die Virusinfektion zu einer weiteren Bildung von nsOVA/LC3 hätte kommen müssen, hätte man durchaus ein Überwiegen der Detektion von LC3 mit dem primären und sekundären Antikörper gegenüber dem DsRed erwarten dürfen. Dies war jedoch nicht der Fall und erhärtet den Verdacht, dass es zu Schwierigkeiten mit der Detektion von LC3 in Verbindung mit nsOVA kam (Es könnte allerdings auch sein, dass der Anteil an zusätzlichen Punkten bei der geringen Proteinproduktion des Virus nicht quantifizierbar ist). Da der gleichzeitige Nachweis von nsOVA und LC3 in den Virusfabriken jedoch teilweise gelang, wird möglicherweise die direkte Bindung der einzelnen Antikörper nur wenig beeinträchtigt, wohl aber die zeitgleiche Bindung der Antikörper an ein und dasselbe Protein. Denkbar ist daher auch, dass es durch die Bindung des primären OVA-Antikörpers zu einer dreidimensionalen Behinderung für die Bindung des LC3-Antikörpers kommt, was in der Konsequenz zu einer deutlich geringeren Wahrscheinlichkeit des Nachweises einer Kolo-kalisierung führt. In diesem Fall würde der primäre Antikörper gegen LC3 größtenteils an das freie, zelluläre LC3 binden und Kolo-kalisierungen wären so nur teilweise zu identifizieren, da sie nur dann auftreten würden, wenn das zelluläre LC3 und das nsOVA/LC3 gemeinsam an einer membranösen Struktur

binden bzw. gemeinsam in ein Vesikel eingeschlossen werden würden. Ein Wechsel des primären Antikörpers zu LC3 Maus und OVA Kaninchen konnte das Problem nicht beheben. Dass es ein Problem mit der Antikörperbindung im Zusammenhang mit der dreidimensionalen Struktur des Fusionsproteins gibt, wird durch die Kombination mit den Ergebnissen des Western Blots bestärkt. Die Räumlichkeit spielt hier unter denaturierenden Bedingungen keine Rolle. Hier ließ sich das Fusionsprotein nachweisen, während ein Zerfall in nsOVA und LC3 auch nach 24 Stunden nicht zu detektieren war. Demzufolge ist das nsOVA wahrscheinlich immer noch an LC3 gebunden, kann jedoch in dem mikroskopischen Setting nicht nachgewiesen werden.

Neben der Tatsache, dass es zu Problemen mit der Bindung der Antikörper gekommen sein könnte, müssen auch funktionelle Defizite des Fusionsproteins in Erwägung gezogen werden. So würde die Verlegung des C-Terminus (z.B. durch die Fusion an nsOVA) zu einer partiellen oder kompletten Unterbrechung der Lipidation führen (Siehe Punkt 5.2.4). Dies hätte die Konsequenz, dass ein Großteil der Fusionsproteine nicht in die autophagosomale Membran integriert werden können. Diese würden sich daher frei und diffus im Zytoplasma befinden und somit durch die Behandlung der Zellen mit Saponin herausgespült werden. Diese Theorie kann durch den Vergleich der Bilder der Abbildungen 18 unterstützt werden. In der Abbildung 18 D zeigen sich verhältnismäßig viele Kolokalisierungen, die sich jedoch auf eine scheinbar zufällige Akkumulation an wenigen Stellen begrenzen. Es wäre eher ein homogeneres Verteilungsmuster in dem Zytoplasma aller Zellen ohne solche starken Akkumulationen erwartet worden. Nach dem Waschen mit Saponin konnten quasi keine Kolokalisierungen mehr detektiert werden und das scheinbar freie nsOVA wurde stark reduziert (Abbildung 18 F, H). Dies ist ein Hinweis darauf, dass es hier eher zu einer zufälligen Akkumulation von nsOVA/LC3 kam und weniger zu einer Darstellung von autophagosomalen Strukturen. Unterstützt wird dieses Phänomen durch die Studie von Moloughney *et al.*. Diese hatten in ihrer Arbeit über die Interaktion zwischen Vaccinia Virus und Autophagie festgestellt, dass es zu einer Akkumulation von LC3-II-Aggregaten kommen kann (213). Dass es ein funktionelles Defizit von nsOVA/LC3 gibt, kann durch die Abbildung 20 unterstützt werden. Auch hier lassen sich unter der nicht vermeidbaren Verwendung von Saponin keine Kolokalisierungen zwischen nsOVA und LC3 bzw. nsOVA und dsRed-gekoppeltem LC3 nachweisen. Es zeichnet sich eher ab, dass bereits in der Zelle befindliches LC3 (endogenes LC3 und DsRed-gekoppeltes LC3) und nsOVA (bzw. nsOVA/LC3, da ein Zerfall des Fusionsproteins nicht nachgewiesen werden konnte) unterschiedliche membranöse Strukturen markieren. Je nachdem, um welche Strukturen es sich handelt, sind diese für Autophagie möglicherweise gar nicht relevant. Zusätzlich unterstützen die Ergebnisse der

Western Blot-Analyse die Theorie, dass sich das nsOVA/LC3 funktionell vom endogenen LC3 unterscheidet, da das endogene LC3 erwartungsgemäß unter den Autophagie- bzw. Proteasominhibitoren akkumuliert ist und durch Saponin auch nur bedingt ausgewaschen wurde (Abbildung 6, 9). Dies galt nicht für nsOVA/LC3.

Ob sich nsOVA/LC3 im Rahmen von (alternativen) autophagosomalen Abbauprozessen in autophagosomenähnlichen Strukturen befindet oder andere membranöse Strukturen markiert bzw. nicht die gewünschte Funktion aufweist, konnte nicht abschließend geklärt werden. Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass innerhalb alternativer Wege der Autophagie andere vesikuläre Strukturen Verwendung finden. Bei erschwerter Nachweisbarkeit von LC3 würde sich somit das nsOVA alleine in anderen Strukturen markieren lassen. Möglicherweise hätten sich die membranösen Strukturen, in denen sich das nsOVA/LC3 vielleicht befindet, durch die Kombination unterschiedlicher Marker leichter identifizieren lassen. Insbesondere das LC3 lässt sich über weite Strecken der Autophagie nachweisen, so dass eine Aussage über das jeweilige Stadium der Autophagie nur schwer möglich ist. Vielleicht wäre man mit weiteren Markern in der Lage gewesen, nachzuvollziehen, bis zu welcher Phase die klassische Autophagie abläuft bzw. ob diese überhaupt stattfindet. So werden größtenteils Atg Faktoren für den Nachweis der „*isolation membrane*“ genutzt. Beispiele hierfür sind ULK1, WIPI1/2 und Atg5. Die meisten Atg Faktoren lösen sich im Gegensatz zu LC3 von der „*isolation membrane*“ ab, bevor diese sich zum Autophagosom schließt. An den geschlossenen LC3-positiven Autophagosomen ist Syntaxin 17 lokalisiert. Syntaxin 17 kann jedoch auch am ER sowie an Mitochondrien nachgewiesen werden, von daher wäre es an dieser Stelle wichtig, auf eine Kolo-kalisierung zwischen LC3 und Syntaxin 17 zu achten. In den Autolysosomen kann Syntaxin 17 nicht mehr nachgewiesen werden – diese lassen sich jedoch durch lysosomale Marker in Kombination mit LC3 identifizieren (214).

Wenn nsOVA/LC3 sich nicht in der autophagosomalen Membran (fehlende LC3-Lipidation), sondern in anderen vesikulären Strukturen befindet oder nicht funktionell ist, hat dies weitreichende Konsequenzen. Demzufolge käme es nicht zu einem gezielten Einschleusen des nsOVA in den MHC Klasse II Präsentationsweg. In der Konsequenz führt dies dazu, dass weitaus weniger nsOVA über die MHC Klasse II Komplexe an die CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert wird, nämlich nur das, was möglicherweise über die basale Autophagie, alternative Weg der der Autophagie oder andere intrazelluläre Prozesse dort ankommt. Das MVA-nsOVA/LC3\_P11 hätte gegenüber dem MVA-nsOVA\_P11 kein Vorteil mehr, wodurch es nach Infektion mit beiden Viren zu einer ähnlichen CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort käme. Dies konnten wir in unseren Experimenten zeigen, was die Theorie, dass das Fusionsprotein ein Funktionsdefizit aufweist und/ oder alternative Weg der Autophagie benutzt werden,

bekräftigt.

## 5.5 Mögliche Wege der alternativen Autophagie

Unter der „*non-canonical autophagy*“ werden alle autophagosomalen Abbauprozesse verstanden, welche von der klassischen, oben beschriebenen (Punkt 1.2.3) evolutionär konservierten Autophagie abweichen. Insbesondere unter pathologischen Umständen (wie beispielsweise durch eine Virusinfektion), ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einer Modifikation der Autophagie kommt, gegeben. Möglicherweise existieren auch mehrere Formen der Autophagie parallel und werden abhängig von Umgebungsfaktoren unterschiedlich bedient. Auch dies könnte ein Grund für den in unseren Studien teilweise ausbleibenden Erfolg der Inhibitoren sein.

Es konnte gezeigt werden, dass die Formation von Autophagosomen in verschiedenen Situationen bestimmte Schritte überspringen kann. Die bisher am häufigsten berichtete „*non-canonical*“ Form der Autophagie ist die Beclin 1 unabhängige Autophagie (78, 215).

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Autophagieinduktion dem AMPK-mTOR-ULK1 Weg umgehen kann, so dass es scheinbar auch andere Eintrittspforten in Autophagie geben kann. Beispielsweise identifizierten Gui *et al.* 2019 eine cGAMP-induzierte Autophagie, welche nicht nur wichtig für die Erkennung und möglicherweise auch Elimination von Viren aus dem Zytosol ist, sondern auch unabhängig von den ULK-Komplexen sowie dem VPS34-Beclin Kinase Komplex ist (216). Somit ist die Autophagosomenformation nicht immer zwingend von der AMPK-Aktivität bzw. mTOR-Inhibition abhängig (217-219).

Eine sehr interessante Studie wurde von Nishida *et al.* durchgeführt. Diese konnten zeigen, dass Atg5 und Atg7 defiziente MEF Zellen in der Lage waren, Autophagosomen, Amphisomen oder Autolysosomen zu formen und dadurch trotzdem eine autophagievermittelte Proteindegradation durchführen konnten. Hierbei trat jedoch keine Lipidation von LC3 auf. Während Proteine wie ULK1, Beclin 1, Vps34 (Klasse III PI3K) und FIP200 für diese Form der alternativen Autophagie wichtig waren, wurden die beiden ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme an dieser Stelle nicht benötigt (220). Wichtig zu beachten ist, dass die hierbei gebildeten Autophagosomen anscheinend eine strukturelle Veränderung erfahren haben, denn der LC3-Marker konnte an diesen Autophagosomen nicht mehr lokalisiert werden (33, 221). Der restliche autophagosomale Flux konnte daher nicht mit Markern gegen LC3-II verfolgt werden (214). Dies zeigt noch einmal, dass die alleinige Analyse von LC3 keine zuverlässige Aussagekraft über Autophagie liefert.

Die verschiedenen Studien verdeutlichen einerseits, dass im vorliegenden Falle eine Abweichung von der klassischen Autophagie keinesfalls außergewöhnlich ist und andererseits, dass Autophagie auch ohne den Nachweis von LC3 (und damit der Bildung der klassischen Autophagosomen) stattfinden kann. Wie und ob es in unseren Studien im Rahmen der alternativen Autophagie zur Bildung von klassischen Autophagosomen kommt, bleibt spekulativ. Sowohl der schwierige Nachweis von Kollokationen zwischen nsOVA und LC3 in der konfokalen Mikroskopie als auch die T-Zell Versuche sprechen dafür, dass es hier Abweichungen gibt. Möglicherweise kommt es zur Bildung von Vesikeln, die autophagosomen-ähnlich sind, jedoch im Verlauf keine LC3-Lipidation aufweisen.

Die Annahme, dass die LC3-Lipidation innerhalb der autophagievermittelten Abbauprozesse während der Infektion mit MVA eine eher untergeordnete Rolle spielt, würde den fehlenden Unterschied bezüglich der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung zwischen MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 erklären. Die klassische Autophagie scheint hier aufgrund des nahezu identischen Verhaltens beider Viren von geringerer Bedeutung zu sein. Wenn LC3 im Rahmen des autophagievermittelten Abbauprozesses nach MVA-Infektion nicht relevant ist, ist der entscheidende Unterschied zwischen MVA-nsOVA/LC3\_P11 und MVA-nsOVA\_P11 aufgehoben und dem nsOVA/LC3 würde in diesem Fall keine vorteilhafte funktionelle Bedeutung mehr zukommen. Letztendlich konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die scheinbar ausbleibende Markierung der autophagosomalen Membran durch nsOVA/LC3 auf ein Funktionsdefizit des Fusionsproteins (Punkt 5.4) oder tatsächlich auf alternative Wege der Autophagie zurückzuführen ist.

Es bleibt daher die Frage offen, in welchen Strukturen sich das neu synthetisierte nsOVA/LC3 befindet, denn in Vorarbeiten konnte nach MVA-Infektion eine starke Zunahme des LC3-II Proteins beobachtet werden, wodurch auf eine als Autophagieinduktion geschlossen wurde. Auch bei uns kam es nach Infektion mit MVA zu einer Zunahme des endogenen LC3. Dies muss aber nicht unbedingt mit dem Auftreten von Autophagosomen korrelieren, wie Moloughney *et al.* zeigten. Diese legten in ihrer Arbeit den Fokus auf Autophagie im Zusammenhang mit Vaccinia Viren. Sie fanden heraus, dass die Infektion von MEF-Zellen zu einer starken LC3-Lipidation führte; weitere elektronenmikroskopische Analysen zeigen jedoch paradoxer Weise, dass die Vaccinia-Virus-infizierten Zellen keine Autophagosomen aufwiesen und es konnte auch kein autophagosomaler Flux detektiert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in Vaccinia Virus eine selektive Inaktivierung der Autophagie stattfindet, da diese für die Morphogenese und Proliferation der Viren nicht benötigt wird (213). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Whilding *et al.*, die nach Vaccinia Virus Infektion trotz LC3-Lipidation keine Aktivierung der Autophagie detektieren konnten (222). Auch im

Rahmen anderer Studien konnte gezeigt werden, dass die zelluläre autophagische Maschinerie nicht in den Lebenszyklus von Vaccinia Viren involviert ist (223). Inwiefern die Ergebnisse von Moloughney *et al.* und Whilding *et al.* auf MVA übertragen werden können, ist momentan allerdings noch unklar. Es konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede in den morphologischen Veränderungen in HeLa-Zellen nach Infektion mit MVA - verglichen mit anderen Vaccinia Virus Stämmen - gab (224). Daher ist es denkbar, dass es auch Unterschiede im Ablauf der Autophagie zwischen den einzelnen Virusstämmen gibt. Somit müssten die oben zitierten Studien (welche Vaccinia Virus verwendeten) noch einmal mit MVA wiederholt bzw. im Vergleich durchgeführt werden, um hier eine eindeutige Aussage zu erhalten.

## 5. 6 Schlussfolgerung und Ausblick:

Autophagie ist zwar ein evolutionär konservierter Prozess – dies bedeutet jedoch nicht, dass der Ablauf in allen Lebewesen bzw. Zellarten gleich ist. Vielmehr deuten Studien darauf hin, dass Autophagie je nach Organismus unterschiedlich reguliert wird (225). Aus diesem Grund werden neben der Zellart auch die Art des Inhibitors, das verwendete Virus sowie die Antigene einen Einfluss auf Autophagie ausüben. Diese Überlegung ist nicht nur vor dem Hintergrund der zum Teil konträren Studienlage relevant, sondern auch für die Optimierung zukünftiger Projekte.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sowohl die proteasomale Aktivität als auch Autophagie relevant für die endogene MHC Klasse II Präsentation in MVA sind. Viele Quellen weisen darauf hin, dass beide Abbauwege sich gegenseitig kompensieren können, allerdings zeigt unsere Arbeit, dass sich diese Abbauwege darüber hinaus gegenseitig ergänzen. Für die Prozession der neu synthetisierten Antigene scheint der Abbau durch das Proteasom relevant zu sein und einen Beitrag zur Bereitstellung der Antigene für die MHC Klasse II Präsentation zu leisten.

Zukünftig ist es relevant, zu identifizieren, wie genau diese beiden Abbauwege miteinander in Beziehung stehen. Dies ist die Basis für die Identifikation neuer Möglichkeiten, Antigene gezielt in den MHC Klasse II Präsentationsweg einzuschleusen.

Möglicherweise helfen hier auch effizientere und spezifischere Inhibitoren. Wir haben bereits mit MRT67307, MRT68921 und SBI-0206965 drei erfolgsversprechende Inhibitoren vorgestellt. Auch Studien, wie beispielsweise von Kaizuka *et al.*, in der bereits bekannte Inhibitoren reevaluiert bzw. neue Inhibitoren identifiziert wurden, werden zukünftig an Bedeutung gewinnen (181). Insbesondere vergleichende Analysen von Inhibitoren, welche die

Signalkaskaden von Autophagie an unterschiedlichen Stellen inhibieren, könnten Rückschlüsse zulassen, welche Protein(komplexe) bei MVA eine Rolle spielen und welchen möglicherweise keine Bedeutung zukommt. Da MRT67307, MRT68921 und SBI-0206965 sowohl UKL1 als auch ULK2 inhibieren und wir eine deutliche Reduktion der Aktivität der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen konnten, scheinen diese in MVA relevant zu sein.

Warum eine adäquate Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in unserem Setting ausblieb, konnte nicht vollständig geklärt werden. Funktionell könnte Autophagie in MVA eine eher untergeordnete Rolle spielen. Möglicherweise werden auch alternative Wege der Autophagie verwendet. Außerdem stellte sich heraus, dass die Funktion von nsOVA/LC3 nicht der vom endogenen LC3 entsprach. Ob nsOVA/LC3 überhaupt funktionell ist und es einerseits zu einer zuverlässigen Markierung von Autophagosomen kommt und andererseits zu einer Präsentation der Antigene über den MHC Klasse II Komplex, konnte nicht abschließend geklärt werden. Eventuell könnten elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt werden mit der Fragestellung, ob MVA-infizierten Zellen überhaupt Autophagosomen aufweisen.

Methodisch stellte sich im Verlauf der Arbeit heraus, dass das Virus MVA-nsOVA/LC3\_P11 kein optimales Studienobjekt ist. Zum einen kam es zur Bildung einer nur recht geringen Proteinmenge, zum anderen konnte unsere Arbeit bestätigen, dass spät exprimierte Antigene zunächst in den Virusfabriken eingeschlossen und nach ca. 7 Stunden erstmals außerhalb der Virusfabriken nachweisbar sind. Dadurch kommt es zu einer geringeren oder ausbleibenden Präsentation der Antigene über den MHC Klasse II Komplex, woraus eine verspätete oder ausbleibende Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen resultiert. Die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist jedoch ein wesentlicher Bestandteil unserer Arbeit, da hiermit letztendlich Autophagie quantitativ „gemessen“ wird. Möglicherweise wäre die Verwendung eines Promotors, der frühe Genexpression erlaubt – z.B. P7.5 (MVA-nsOVA/LC3\_P7.5 und MVA-nsOVA\_P7.5) – hier zielführender gewesen. Damit wäre das Fusionsprotein nicht nur eher nach Infektion, sondern eventuell auch in größerer Menge synthetisiert worden, wodurch vermutlich eine bessere Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen hätte stattfinden können. Möglicherweise hätten dann die Auswirkungen der Autophagie sowie der Autophagieinhibitoren auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung besser beurteilt werden können.

Letztendlich muss auch die Frage beantwortet werden, inwiefern die Ergebnisse von der Zellkultur auf den menschlichen Organismus übertragbar sind. Hier sind weitere *in vivo* Studien erforderlich. Erst wenn ein sicheres Verständnis davon gegeben ist, wie unterschiedliche Zellarten, Viren, Antigene und Umgebungsfaktoren Autophagie beeinflussen können, ist eine Breite und sichere Anwendung für medizinische Fragestellungen möglich.

## Quellen

1. Moss B. Poxvirus DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(9).
2. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology.* Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
3. Cairns J. The initiation of vaccinia infection. *Virology.* 1960;11:603-23.
4. Katsafanas GC, Moss B. Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions. *Cell Host Microbe.* 2007;2(4):221-8.
5. Baldick CJ, Jr., Moss B. Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by vaccinia virus intermediate-stage genes. *J Virol.* 1993;67(6):3515-27.
6. Broyles SS. Vaccinia virus transcription. *J Gen Virol.* 2003;84(Pt 9):2293-303.
7. Lefkowitz EJ, Wang C, Upton C. Poxviruses: past, present and future. *Virus Res.* 2006;117(1):105-18.
8. Kates JR, McAuslan BR. Messenger RNA synthesis by a "coated" viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1967;57(2):314-20.
9. Munyon WH, Kit S. Induction of cytoplasmic ribonucleic acid (RNA) synthesis in vaccinia-infected LM cells during inhibition of protein synthesis. *Virology.* 1966;29(2):303-9.
10. Joklik WK. The Intracellular Uncoating of Poxvirus DNA. li. The Molecular Basis of the Uncoating Process. *J Mol Biol.* 1964;8:277-88.
11. Blanchard TJ, Alcamì A, Andrea P, Smith GL. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J Gen Virol.* 1998;79 ( Pt 5):1159-67.
12. Carroll MW, Moss B. 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.* 1997;238(2):198-211.
13. Altenburger W, Suter CP, Altenburger J. Partial deletion of the human host range gene in the attenuated vaccinia virus MVA. *Arch Virol.* 1989;105(1-2):15-27.
14. Meyer H, Sutter G, Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol.* 1991;72 ( Pt 5):1031-8.
15. Meisinger-Henschel C, Schmidt M, Lukassen S, Linke B, Krause L, Konietzny S, et al. Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 12):3249-59.
16. Meisinger-Henschel C, Spath M, Lukassen S, Wolferstatter M, Kachelriess H, Baur K, et al. 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.* 2010;84(19):9907-19.
17. Chahroudi A, Garber DA, Reeves P, Liu L, Kalman D, Feinberg MB. Differences and similarities in viral life cycle progression and host cell physiology after infection of human dendritic cells with modified vaccinia virus Ankara and vaccinia virus. *J Virol.* 2006;80(17):8469-81.
18. Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(21):11341-8.
19. Birgisdottir AB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif - crucial for selective autophagy. *Journal of cell science.* 2013;126(Pt 15):3237-47.
20. Harris J, De Haro SA, Master SS, Keane J, Roberts EA, Delgado M, et al. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Immunity.* 2007;27(3):505-17.
21. Delgado M, Singh S, De Haro S, Master S, Ponpuak M, Dinkins C, et al. Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunol Rev.* 2009;227(1):189-202.
22. Xu Y, Jagannath C, Liu XD, Sharafkhaneh A, Kolodziejaska KE, Eissa NT. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity.* 2007;27(1):135-44.
23. Sridharan S, Jain K, Basu A. Regulation of autophagy by kinases. *Cancers (Basel).* 2011;3(2):2630-54.

24. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069-75.
25. Longatti A, Tooze SA. Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell death and differentiation*. 2009;16(7):956-65.
26. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Current topics in microbiology and immunology*. 2009;335:1-32.
27. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004;6(4):463-77.
28. Sica V, Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Izzo V, Maiuri MC, Kroemer G. Organelle-Specific Initiation of Autophagy. *Molecular cell*. 2015;59(4):522-39.
29. Schmid D, Munz C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity*. 2007;27(1):11-21.
30. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006;441(7095):880-4.
31. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006;441(7095):885-9.
32. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*. 2008;183(5):795-803.
33. Nguyen TN, Padman BS, Lazarou M. Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy. *Trends Cell Biol*. 2016;26(10):733-44.
34. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*. 2007;39(2):207-11.
35. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet*. 2007;39(5):596-604.
36. Nakahira K, Pabon Porras MA, Choi AM. Autophagy in Pulmonary Diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(10):1196-207.
37. Shirakabe A, Ikeda Y, Sciarretta S, Zablocki DK, Sadoshima J. Aging and Autophagy in the Heart. *Circ Res*. 2016;118(10):1563-76.
38. Kim KH, Lee MS. Autophagy--a key player in cellular and body metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(6):322-37.
39. Rockel JS, Kapoor M. Autophagy: controlling cell fate in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(9):517-31.
40. Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Karin M. Autophagy, Inflammation, and Immunity: A Troika Governing Cancer and Its Treatment. *Cell*. 2016;166(2):288-98.
41. Melendez A, Tallozy Z, Seaman M, Eskelinen EL, Hall DH, Levine B. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*. 2003;301(5638):1387-91.
42. Madeo F, Tavernarakis N, Kroemer G. Can autophagy promote longevity? *Nature cell biology*. 2010;12(9):842-6.
43. Lopez-Otin C, Galluzzi L, Freije JMP, Madeo F, Kroemer G. Metabolic Control of Longevity. *Cell*. 2016;166(4):802-21.
44. Amaravadi R, Kimmelman AC, White E. Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes Dev*. 2016;30(17):1913-30.
45. Onorati AV, Dyczynski M, Ojha R, Amaravadi RK. Targeting autophagy in cancer. *Cancer*. 2018.
46. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(25):15077-82.

47. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(12):1809-20.
48. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*. 2004;119(6):753-66.
49. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 1994;78(5):761-71.
50. Deretic V. Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Current opinion in immunology*. 2012;24(1):21-31.
51. Henell F, Berkenstam A, Ahlberg J, Glaumann H. Degradation of short- and long-lived proteins in perfused liver and in isolated autophagic vacuoles-lysosomes. *Exp Mol Pathol*. 1987;46(1):1-14.
52. Ding WX, Yin XM. Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy*. 2008;4(2):141-50.
53. Knorr RL, Lipowsky R, Dimova R. Autophagosome closure requires membrane scission. *Autophagy*. 2015;11(11):2134-7.
54. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*. 2012;151(6):1256-69.
55. Jiang P, Nishimura T, Sakamaki Y, Itakura E, Hatta T, Natsume T, et al. The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Molecular biology of the cell*. 2014;25(8):1327-37.
56. Diao J, Liu R, Rong Y, Zhao M, Zhang J, Lai Y, et al. ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature*. 2015;520(7548):563-6.
57. Wang Z, Miao G, Xue X, Guo X, Yuan C, Wang Z, et al. The Vici Syndrome Protein EPG5 Is a Rab7 Effector that Determines the Fusion Specificity of Autophagosomes with Late Endosomes/Lysosomes. *Molecular cell*. 2016;63(5):781-95.
58. Matsui T, Jiang P, Nakano S, Sakamaki Y, Yamamoto H, Mizushima N. Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. *The Journal of Cell Biology*. 2018.
59. Dunn WA, Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol*. 1990;110(6):1935-45.
60. Dunn WA, Jr. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol*. 1994;4(4):139-43.
61. Yokota S, Himeno M, Kato K. Formation of autophagosomes during degradation of excess peroxisomes induced by di-(2-ethylhexyl)-phthalate treatment. III. Fusion of early autophagosomes with lysosomal compartments. *Eur J Cell Biol*. 1995;66(1):15-24.
62. Koyama-Honda I, Tsuboyama K, Mizushima N. ATG conjugation-dependent degradation of the inner autophagosomal membrane is a key step for autophagosome maturation. *Autophagy*. 2017;13(7):1252-3.
63. Berg TO, Fengsrud M, Stromhaug PE, Berg T, Seglen PO. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem*. 1998;273(34):21883-92.
64. Liou W, Geuze HJ, Geelen MJ, Slot JW. The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol*. 1997;136(1):61-70.
65. Zwart W, Griekspoor A, Kuijl C, Marsman M, van Rheenen J, Janssen H, et al. Spatial separation of HLA-DM/HLA-DR interactions within MIIC and phagosome-induced immune escape. *Immunity*. 2005;22(2):221-33.
66. Klionsky DJ, Eskelinen EL, Deretic V. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... wait, I'm confused. *Autophagy*. 2014;10(4):549-51.
67. Schmid D, Pypaert M, Munz C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*. 2007;26(1):79-92.

68. Munz C. Of LAP, CUPS, and DRibbles - Unconventional Use of Autophagy Proteins for MHC Restricted Antigen Presentation. *Frontiers in immunology*. 2015;6:200.
69. Munz C. Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation. *Trends Immunol*. 2016;37(11):755-63.
70. Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Molecular cell*. 2009;34(3):259-69.
71. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 2011;7(3):279-96.
72. Kraft C, Peter M, Hofmann K. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nature cell biology*. 2010;12(9):836-41.
73. Noda NN, Ohsumi Y, Inagaki F. Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS Lett*. 2010;584(7):1379-85.
74. Rogov VV, Stolz A, Ravichandran AC, Rios-Szwed DO, Suzuki H, Kniss A, et al. Structural and functional analysis of the GABARAP interaction motif (GIM). *EMBO Rep*. 2017;18(8):1382-96.
75. Parzych KR, Ariosa A, Mari M, Klionsky DJ. A newly characterized vacuolar serine carboxypeptidase, Atg42/Ybr139w, is required for normal vacuole function and the terminal steps of autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*. 2018;29(9):1089-99.
76. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(7):458-67.
77. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 1993;333(1-2):169-74.
78. Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(1):7-12.
79. Wen X, Klionsky DJ. An overview of macroautophagy in yeast. *J Mol Biol*. 2016;428(9 Pt A):1681-99.
80. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*. 2011;13(2):132-41.
81. Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell*. 2010;40(2):280-93.
82. Carling D, Sanders MJ, Woods A. The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *International journal of obesity (2005)*. 2008;32 Suppl 4:S55-9.
83. Egan D, Kim J, Shaw RJ, Guan KL. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy*. 2011;7(6):643-4.
84. Alers S, Loffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(1):2-11.
85. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;124(3):471-84.
86. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002;110(2):163-75.
87. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell*. 2008;30(2):214-26.
88. Lee JW, Park S, Takahashi Y, Wang HG. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS One*. 2010;5(11):e15394.
89. Mortimore GE, Schworer CM. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature*. 1977;270(5633):174-6.
90. Lee CH, Inoki K, Guan KL. mTOR pathway as a target in tissue hypertrophy. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2007;47:443-67.
91. Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*. 2009;284(18):12297-305.

92. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular biology of the cell*. 2009;20(7):1981-91.
93. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell*. 2009;20(7):1992-2003.
94. Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, Natsume T, Hara T, Mizushima N. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*. 2009;5(7):973-9.
95. Burman C, Ktistakis NT. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett*. 2010;584(7):1302-12.
96. Nishimura T, Tamura N, Kono N, Shimanaka Y, Arai H, Yamamoto H, et al. Autophagosome formation is initiated at phosphatidylinositol synthase-enriched ER subdomains. *EMBO J*. 2017;36(12):1719-35.
97. Nascimbeni AC, Giordano F, Dupont N, Grasso D, Vaccaro MI, Codogno P, et al. ER-plasma membrane contact sites contribute to autophagosome biogenesis by regulation of local PI3P synthesis. *EMBO J*. 2017;36(14):2018-33.
98. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*. 2010;141(4):656-67.
99. Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature cell biology*. 2010;12(8):747-57.
100. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:107-32.
101. Bakula D, Takacs Z, Proikas-Cezanne T. WIPI beta-propellers in autophagy-related diseases and longevity. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(4):962-7.
102. Grimm M, Backhaus C, Proikas-Cezanne T. WIPI-Mediated Autophagy and Longevity. *Cells*. 2015;4(2):202-17.
103. Dooley HC, Razi M, Polson HE, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Molecular cell*. 2014;55(2):238-52.
104. Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*. 1998;395(6700):395-8.
105. . !!! INVALID CITATION !!! (27, 43).
106. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 2000;408(6811):488-92.
107. Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*. 2005;1(2):84-91.
108. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222.
109. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*. 2000;19(21):5720-8.
110. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. 2007;3(6):542-5.
111. Kuma A, Matsui M, Mizushima N. LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy*. 2007;3(4):323-8.
112. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 2010;140(3):313-26.
113. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*. 2007;282(33):24131-45.

114. Gueguen M, Long EO. Presentation of a cytosolic antigen by major histocompatibility complex class II molecules requires a long-lived form of the antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(25):14692-7.
115. Jacobson S, Sekaly RP, Jacobson CL, McFarland HF, Long EO. HLA class II-restricted presentation of cytoplasmic measles virus antigens to cytotoxic T cells. *J Virol*. 1989;63(4):1756-62.
116. Jaraquemada D, Marti M, Long EO. An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J Exp Med*. 1990;172(3):947-54.
117. Brazil MI, Weiss S, Stockinger B. Excessive degradation of intracellular protein in macrophages prevents presentation in the context of major histocompatibility complex class II molecules. *Eur J Immunol*. 1997;27(6):1506-14.
118. Nimmerjahn F, Milosevic S, Behrends U, Jaffee EM, Pardoll DM, Bornkamm GW, et al. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol*. 2003;33(5):1250-9.
119. Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, et al. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol*. 1998;72(11):8586-96.
120. Nardacci R, Amendola A, Ciccocanti F, Corazzari M, Esposito V, Vlassi C, et al. Autophagy plays an important role in the containment of HIV-1 in nonprogressor-infected patients. *Autophagy*. 2014;10(7):1167-78.
121. Dreux M, Chisari FV. Viruses and the autophagy machinery. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2010;9(7):1295-307.
122. Munz C. The Macroautophagy Machinery in Endo- and Exocytosis. *J Mol Biol*. 2016.
123. Leib DA, Alexander DE, Cox D, Yin J, Ferguson TA. Interaction of ICP34.5 with Beclin 1 modulates herpes simplex virus type 1 pathogenesis through control of CD4+ T-cell responses. *J Virol*. 2009;83(23):12164-71.
124. Gobeil PA, Leib DA. Herpes simplex virus gamma34.5 interferes with autophagosome maturation and antigen presentation in dendritic cells. *MBio*. 2012;3(5):e00267-12.
125. Orvedahl A, Alexander D, Tallozy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W, et al. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe*. 2007;1(1):23-35.
126. Tallozy Z, Jiang W, Virgin HWt, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, et al. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(1):190-5.
127. Lussignol M, Queval C, Bernet-Camard MF, Cotte-Laffitte J, Beau I, Codogno P, et al. The herpes simplex virus 1 Us11 protein inhibits autophagy through its interaction with the protein kinase PKR. *J Virol*. 2013;87(2):859-71.
128. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005;122(6):927-39.
129. Dales S, Eggers HJ, Tamm I, Palade GE. Electron Microscopic Study of the Formation of Poliovirus. *Virology*. 1965;26:379-89.
130. Jackson WT, Giddings TH, Jr., Taylor MP, Mulinyawe S, Rabinovitch M, Kopito RR, et al. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol*. 2005;3(5):e156.
131. Pedersen KW, van der Meer Y, Roos N, Snijder EJ. Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. *J Virol*. 1999;73(3):2016-26.
132. Prentice E, Jerome WG, Yoshimori T, Mizushima N, Denison MR. Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *J Biol Chem*. 2004;279(11):10136-41.
133. Prentice E, McAuliffe J, Lu X, Subbarao K, Denison MR. Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins. *J Virol*. 2004;78(18):9977-86.
134. Lee YR, Lei HY, Liu MT, Wang JR, Chen SH, Jiang-Shieh YF, et al. Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology*. 2008;374(2):240-8.
135. Gannage M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Ramer PC, et al. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe*. 2009;6(4):367-80.
136. Munz C. Enhancing immunity through autophagy. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:423-49.

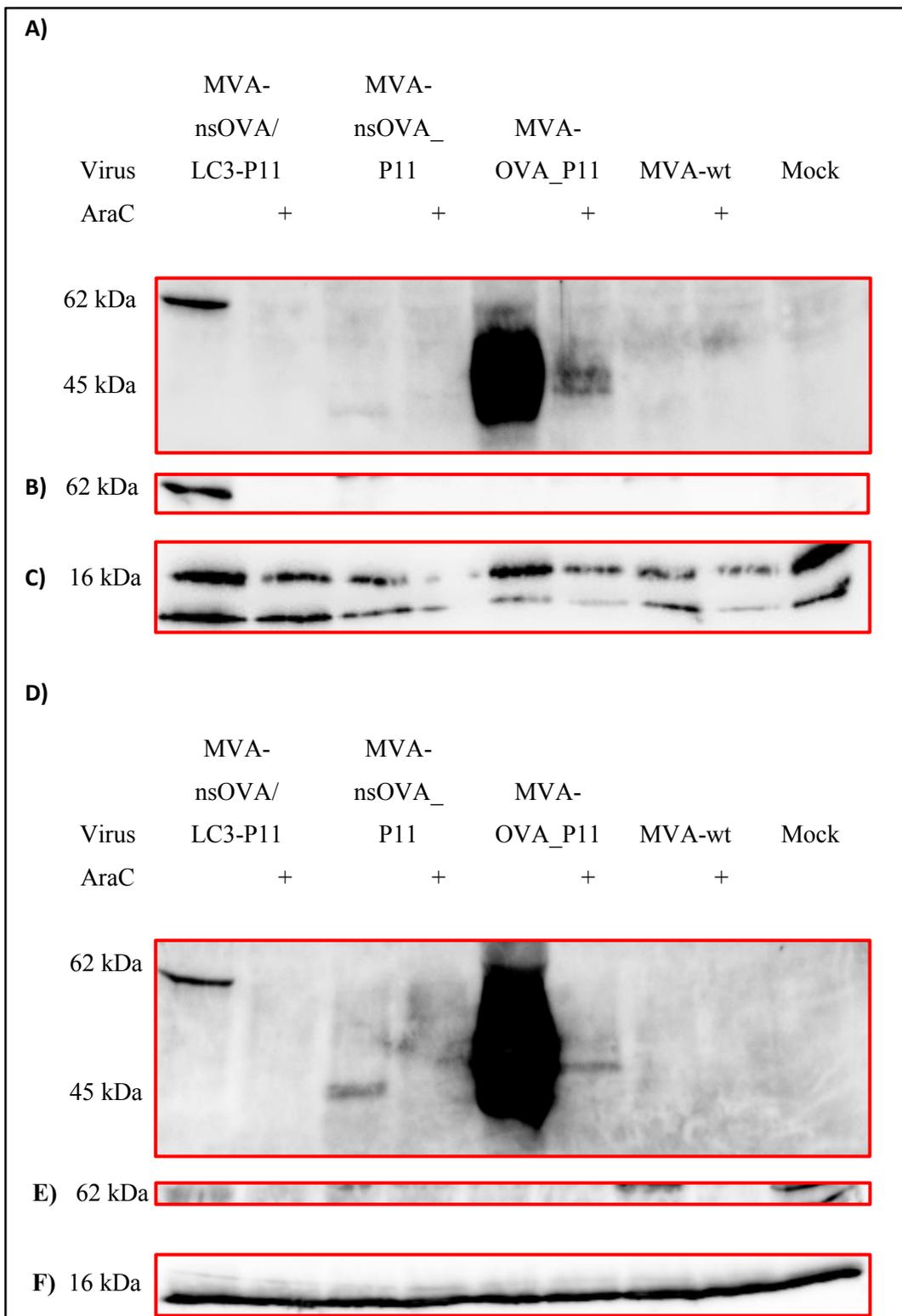
137. Berkova Z, Crawford SE, Trugnan G, Yoshimori T, Morris AP, Estes MK. Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasm. *J Virol.* 2006;80(12):6061-71.
138. Nakashima A, Tanaka N, Tamai K, Kyuuma M, Ishikawa Y, Sato H, et al. Survival of parvovirus B19-infected cells by cellular autophagy. *Virology.* 2006;349(2):254-63.
139. Schlegel A, Giddings TH, Jr., Ladinsky MS, Kirkegaard K. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol.* 1996;70(10):6576-88.
140. Suhy DA, Giddings TH, Jr., Kirkegaard K. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J Virol.* 2000;74(19):8953-65.
141. Meyers G, Stoll D, Gunn M. Insertion of a sequence encoding light chain 3 of microtubule-associated proteins 1A and 1B in a pestivirus genome: connection with virus cytopathogenicity and induction of lethal disease in cattle. *J Virol.* 1998;72(5):4139-48.
142. Fu Q, Shi H, Ren Y, Guo F, Ni W, Qiao J, et al. Bovine viral diarrhea virus infection induces autophagy in MDBK cells. *J Microbiol.* 2014;52(7):619-25.
143. Fu Q, Shi H, Zhang H, Ren Y, Guo F, Qiao J, et al. Autophagy during early stages contributes to bovine viral diarrhea virus replication in MDBK cells. *J Basic Microbiol.* 2014;54(10):1044-52.
144. Huston DP. The biology of the immune system. *JAMA.* 1997;278(22):1804-14.
145. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):723-37.
146. Rock KL. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today.* 1996;17(3):131-7.
147. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S3-23.
148. Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell.* 2006;124(4):815-22.
149. MacLennan IC, Gulbranson-Judge A, Toellner KM, Casamayor-Palleja M, Chan E, Sze DM, et al. The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. *Immunol Rev.* 1997;156:53-66.
150. Hedrick SM. Thymus lineage commitment: a single switch. *Immunity.* 2008;28(3):297-9.
151. Jenkinson EJ, Jenkinson WE, Rossi SW, Anderson G. The thymus and T-cell commitment: the right niche for Notch? *Nat Rev Immunol.* 2006;6(7):551-5.
152. Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(2):127-35.
153. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S33-40.
154. Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol.* 1988;6:629-62.
155. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89.
156. Klein L, Munz C, Lunemann JD. Autophagy-mediated antigen processing in CD4(+) T cell tolerance and immunity. *FEBS Lett.* 2010;584(7):1405-10.
157. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(12):823-36.
158. Kurts C, Robinson BW, Knolle PA. Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(6):403-14.
159. Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:47-64.
160. Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science.* 2005;307(5709):593-6.
161. Munz C. Antigen processing via autophagy--not only for MHC class II presentation anymore? *Current opinion in immunology.* 2010;22(1):89-93.
162. Crotzer VL, Blum JS. Autophagy and adaptive immunity. *Immunology.* 2010;131(1):9-17.

163. Tewari MK, Sinnathamby G, Rajagopal D, Eisenlohr LC. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat Immunol.* 2005;6(3):287-94.
164. Thiele F, Tao S, Zhang Y, Muschaweckh A, Zollmann T, Protzer U, et al. Modified vaccinia virus Ankara-infected dendritic cells present CD4+ T-cell epitopes by endogenous major histocompatibility complex class II presentation pathways. *J Virol.* 2015;89(5):2698-709.
165. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:975-1028.
166. Sadegh-Nasseri S, Chen M, Narayan K, Bouvier M. The convergent roles of tapasin and HLA-DM in antigen presentation. *Trends Immunol.* 2008;29(3):141-7.
167. Mellins ED, Stern LJ. HLA-DM and HLA-DO, key regulators of MHC-II processing and presentation. *Current opinion in immunology.* 2014;26:115-22.
168. Tabe L, Krieg P, Strachan R, Jackson D, Wallis E, Colman A. Segregation of mutant ovalbumins and ovalbumin-globin fusion proteins in *Xenopus* oocytes. Identification of an ovalbumin signal sequence. *J Mol Biol.* 1984;180(3):645-66.
169. McConkey SJ, Reece WH, Moorthy VS, Webster D, Dunachie S, Butcher G, et al. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nature medicine.* 2003;9(6):729-35.
170. Sebastian S, Gilbert SC. Recombinant modified vaccinia virus Ankara-based malaria vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2016;15(1):91-103.
171. Fournillier A, Gerossier E, Evlashev A, Schmitt D, Simon B, Chatel L, et al. An accelerated vaccine schedule with a poly-antigenic hepatitis C virus MVA-based candidate vaccine induces potent, long lasting and in vivo cross-reactive T cell responses. *Vaccine.* 2007;25(42):7339-53.
172. Amato RJ, Stepankiw M. Evaluation of MVA-5T4 as a novel immunotherapeutic vaccine in colorectal, renal and prostate cancer. *Future oncology (London, England).* 2012;8(3):231-7.
173. Harrop R, Chu F, Gabrail N, Srinivas S, Blount D, Ferrari A. Vaccination of castration-resistant prostate cancer patients with TroVax (MVA-5T4) in combination with docetaxel: a randomized phase II trial. *Cancer immunology, immunotherapy : CII.* 2013;62(9):1511-20.
174. Staib C, Drexler I, Sutter G. Construction and isolation of recombinant MVA. *Methods Mol Biol.* 2004;269:77-100.
175. Mahy BWJ, Kangro HO. *Virology methods manual.* London; San Diego: Academic Press; 1996.
176. Beeton C, Chandy KG. Preparing T cell growth factor from rat splenocytes. *J Vis Exp.* 2007(10):402.
177. Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Sin N, Crews CM. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(18):10403-8.
178. Satheshkumar PS, Anton LC, Sanz P, Moss B. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system prevents vaccinia virus DNA replication and expression of intermediate and late genes. *J Virol.* 2009;83(6):2469-79.
179. Jamur MC, Oliver C. Permeabilization of cell membranes. *Methods Mol Biol.* 2010;588:63-6.
180. Bengali Z, Satheshkumar PS, Moss B. Orthopoxvirus species and strain differences in cell entry. *Virology.* 2012;433(2):506-12.
181. Kaizuka T, Morishita H, Hama Y, Tsukamoto S, Matsui T, Toyota Y, et al. An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control. *Molecular cell.* 2016;64(4):835-49.
182. Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, et al. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 2010;285(14):10850-61.
183. Petherick KJ, Conway OJ, Mpamhanga C, Osborne SA, Kamal A, Saxty B, et al. Pharmacological inhibition of ULK1 kinase blocks mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent autophagy. *J Biol Chem.* 2015;290(18):11376-83.
184. Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett.* 2010;584(7):1393-8.

185. Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, et al. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol.* 2007;171(2):513-24.
186. Iwata A, Riley BE, Johnston JA, Kopito RR. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem.* 2005;280(48):40282-92.
187. Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature.* 2007;447(7146):859-63.
188. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol.* 1998;143(7):1883-98.
189. Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:193-224.
190. Abounit K, Scarabelli TM, McCauley RB. Autophagy in mammalian cells. *World J Biol Chem.* 2012;3(1):1-6.
191. Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(21):7972-6.
192. Hanada H, Moriyama Y, Maeda M, Futai M. Kinetic studies of chromaffin granule H<sup>+</sup>-ATPase and effects of bafilomycin A1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;170(2):873-8.
193. Werner G, Hagenmaier H, Drautz H, Baumgartner A, Zahner H. Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity. *J Antibiot (Tokyo).* 1984;37(2):110-7.
194. Crider BP, Xie XS, Stone DK. Bafilomycin inhibits proton flow through the H<sup>+</sup> channel of vacuolar proton pumps. *J Biol Chem.* 1994;269(26):17379-81.
195. Zhang J, Feng Y, Forgac M. Proton conduction and bafilomycin binding by the V0 domain of the coated vesicle V-ATPase. *J Biol Chem.* 1994;269(38):23518-23.
196. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct.* 1998;23(1):33-42.
197. Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem.* 1991;266(26):17707-12.
198. Carter GC, Law M, Hollinshead M, Smith GL. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 5):1279-90.
199. Townsley AC, Weisberg AS, Wagenaar TR, Moss B. Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *J Virol.* 2006;80(18):8899-908.
200. Armstrong JA, Metz DH, Young MR. The mode of entry of vaccinia virus into L cells. *J Gen Virol.* 1973;21(3):533-7.
201. Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science.* 2011;334(6056):678-83.
202. Juhasz G. Interpretation of bafilomycin, pH neutralizing or protease inhibitor treatments in autophagic flux experiments: novel considerations. *Autophagy.* 2012;8(12):1875-6.
203. Shacka JJ, Klocke BJ, Roth KA. Autophagy, bafilomycin and cell death: the "a-B-cs" of plecomacrolide-induced neuroprotection. *Autophagy.* 2006;2(3):228-30.
204. Carroll MW, Overwijk WW, Chamberlain RS, Rosenberg SA, Moss B, Restifo NP. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MVA) as an effective recombinant vector: a murine tumor model. *Vaccine.* 1997;15(4):387-94.
205. Tao S, Tao R, Busch DH, Widera M, Schaal H, Drexler I. Sequestration of Late Antigens Within Viral Factories Impairs MVA Vector-Induced Protective Memory CTL Responses. *Frontiers in immunology.* 2019;10(2850).
206. Comber JD, Robinson TM, Siciliano NA, Snook AE, Eisenlohr LC. Functional macroautophagy induction by influenza A virus without a contribution to major histocompatibility complex class II-restricted presentation. *J Virol.* 2011;85(13):6453-63.

207. Jin Y, Sun C, Feng L, Li P, Xiao L, Ren Y, et al. Regulation of SIV antigen-specific CD4+ T cellular immunity via autophagosome-mediated MHC II molecule-targeting antigen presentation in mice. *PLoS One*. 2014;9(3):e93143.
208. Coulon PG, Richetta C, Rouers A, Blanchet FP, Urrutia A, Guerbois M, et al. HIV-Infected Dendritic Cells Present Endogenous MHC Class II-Restricted Antigens to HIV-Specific CD4+ T Cells. *J Immunol*. 2016;197(2):517-32.
209. Fonteneau JF, Brilot F, Munz C, Gannage M. The Tumor Antigen NY-ESO-1 Mediates Direct Recognition of Melanoma Cells by CD4+ T Cells after Intercellular Antigen Transfer. *J Immunol*. 2016;196(1):64-71.
210. Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X. The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy*. 2013;9(2):124-37.
211. Egan DF, Chun MG, Vamos M, Zou H, Rong J, Miller CJ, et al. Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates. *Molecular cell*. 2015;59(2):285-97.
212. Goodwin JM, Murphy LO. Small-molecule inhibitors: bULKing up mTOR inhibition. *Nat Chem Biol*. 2015;11(10):758-60.
213. Moloughney JG, Monken CE, Tao H, Zhang H, Thomas JD, Lattime EC, et al. Vaccinia virus leads to ATG12-ATG3 conjugation and deficiency in autophagosome formation. *Autophagy*. 2011;7(12):1434-47.
214. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9).
215. Proikas-Cezanne T, Codogno P. Beclin 1 or not Beclin 1. *Autophagy*. 2011;7(7):671-2.
216. Gui X, Yang H, Li T, Tan X, Shi P, Li M, et al. Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway. *Nature*. 2019;567(7747):262-6.
217. Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, et al. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol*. 2005;170(7):1101-11.
218. Grotemeier A, Alers S, Pfisterer SG, Paasch F, Daubrawa M, Dieterle A, et al. AMPK-independent induction of autophagy by cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase. *Cell Signal*. 2010;22(6):914-25.
219. Yamamoto A, Cremona ML, Rothman JE. Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway. *J Cell Biol*. 2006;172(5):719-31.
220. Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*. 2009;461(7264):654-8.
221. Tsuboyama K, Koyama-Honda I, Sakamaki Y, Koike M, Morishita H, Mizushima N. The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science*. 2016;354(6315):1036-41.
222. Whilding LM, Archibald KM, Kulbe H, Balkwill FR, Oberg D, McNeish IA. Vaccinia virus induces programmed necrosis in ovarian cancer cells. *Mol Ther*. 2013;21(11):2074-86.
223. Zhang H, Monken CE, Zhang Y, Lenard J, Mizushima N, Lattime EC, et al. Cellular autophagy machinery is not required for vaccinia virus replication and maturation. *Autophagy*. 2006;2(2):91-5.
224. Gallego-Gomez JC, Risco C, Rodriguez D, Cabezas P, Guerra S, Carrascosa JL, et al. Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA and other strains (WR, Ankara, and NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells. *J Virol*. 2003;77(19):10606-22.
225. Mizushima N. The exponential growth of autophagy-related research: from the humble yeast to the Nobel Prize. *FEBS Lett*. 2017;591(5):681-9.

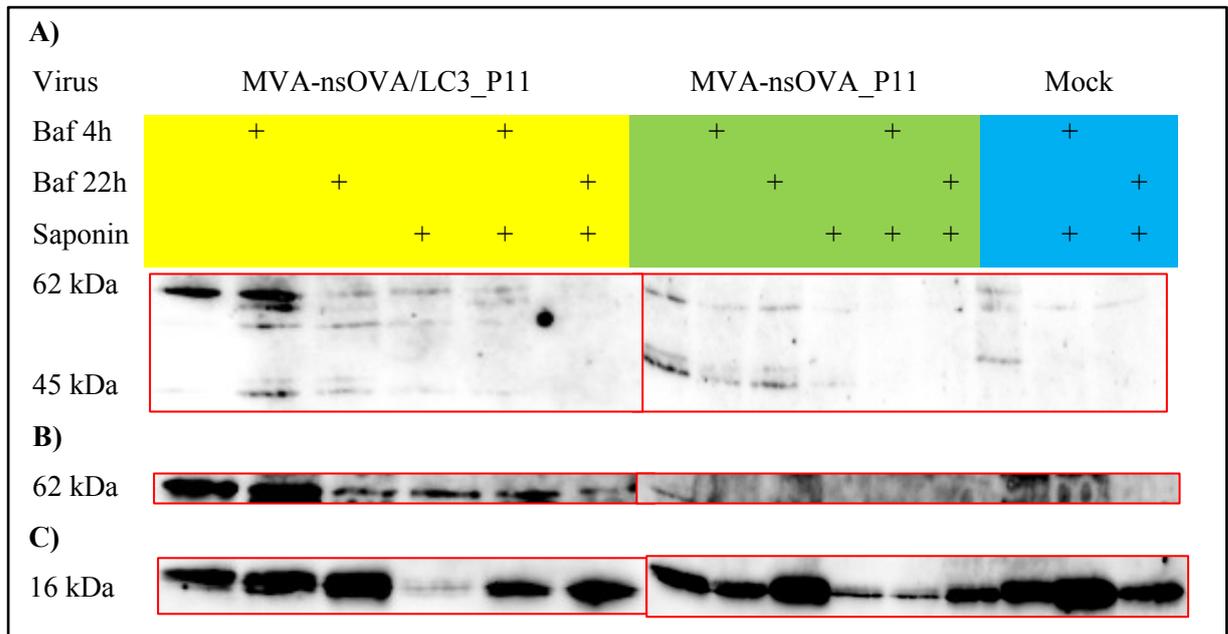
## Anhang:



**Abbildung 21: Der späte Promotor P11 kontrolliert die Expression der rekombinanten Gene**

BMDCs (A, B, C) und D.C 2.4 Zellen (D, E, F) wurden - wenn indiziert - eine halbe Stunde vor der Infektion mit 40 µg/mL AraC inkubiert (+) und anschließend zwei Mal mit AraC-haltigem M2-Medium gewaschen. Danach wurden sie mit den dargestellten Viren mit einer MOI von 10 oder mock infiziert. Die Ernte erfolgte 24 Stunden nach Infektion. Mit Hilfe der Western Blot Analyse wurde das Vorhandensein von Ovalbumin (OVA)

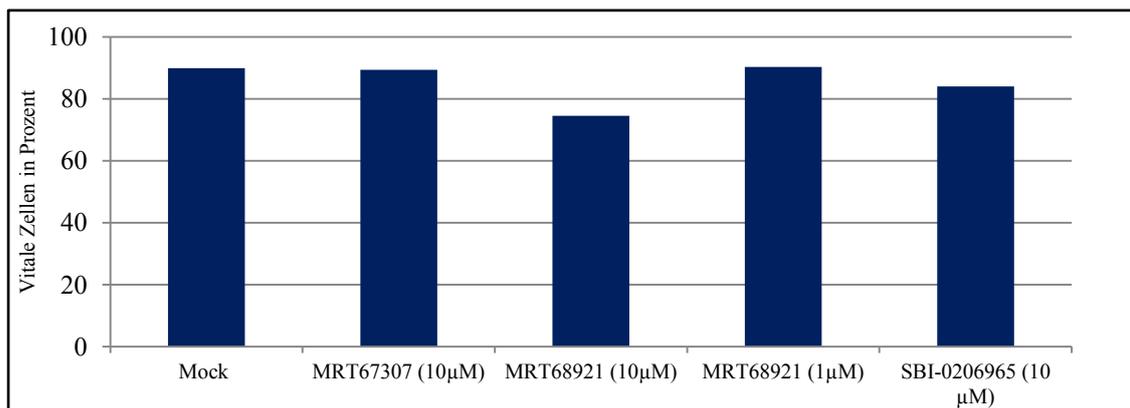
und nicht sekretierenden Ovalbumin (nsOVA) (ca. 45 kDa) sowie nsOVA/LC3 (ca. 62 kDa) bestimmt.  
 A, D) Antikörper gegen Ovalbumin; B, C, E, F) Antikörper gegen LC3; Abkürzungen: AraC = Arabinosid C.



**Abbildung 22: Integration des nsOVA/LC3 in eine membranöse Struktur in BMDCs**

BMDCs wurden mit den jeweiligen Viren mit einer MOI von 10 oder mock für 24 Stunden infiziert. Zwanzig Stunden (Baf 20h) bzw. 4 Stunden (Baf 4 h) vor der Ernte wurde Bafilomycin A1 in einer Konzentration von 100 nM hinzugefügt. Im Rahmen der Herstellung der Lysate wurde das Zellpellet, wenn angegeben, für zwei Minuten mit 300 µL 0,05% Saponin behandelt. Mit Hilfe des Western Blots wurde das Vorhandensein von nicht sekretierendem Ovalbumin (nsOVA) (ca. 45 kDa) sowie nsOVA/LC3 (ca. 62 kDa) bestimmt.

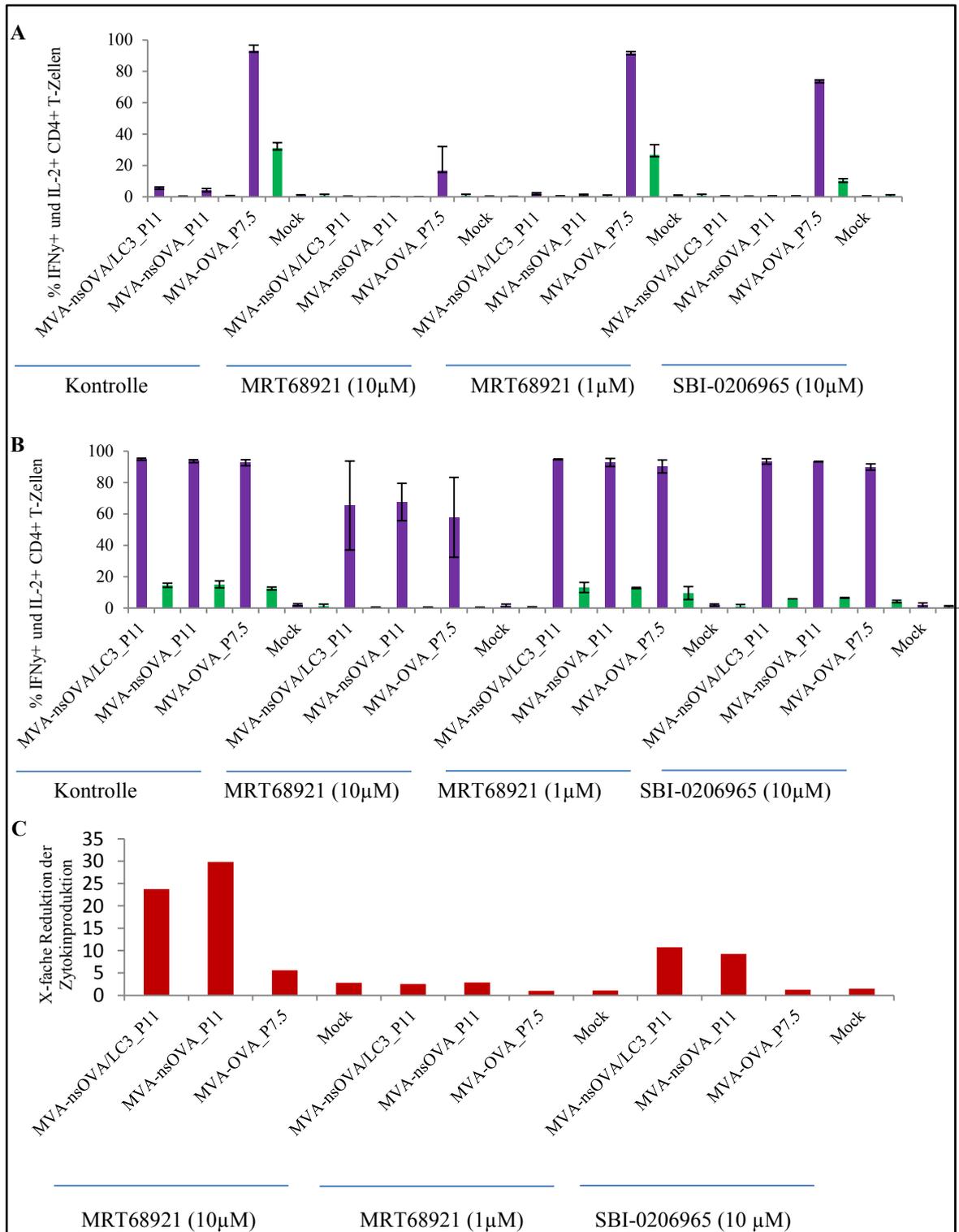
A) Antikörper gegen Ovalbumin; B, C) Antikörper gegen LC3; Abkürzungen: Baf A1 = Bafilomycin A1.



**Abbildung 23: Toxizität von MRT67307, MRT68921 und SBI-0206965 gegenüber BMDCs**

Es wurden  $1 \times 10^6$  BMDCs/mL in ein Falcon überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 500 µL M2-Medium, welches den Inhibitor in den in der Abbildung 23 dargestellten Konzentrationen enthielt, resuspendiert. Nach einer Stunde wurden von jeder Probe  $1 \times 10^5$  Zellen in das Loch einer 96-V-Mikro-Loch-Platte pipettiert und für weitere 7 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Im Anschluss daran erfolgte eine EMA-Färbung und die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert.



**Abbildung 24: Inhibierender Effekt von MRT68921 (10 μM und 1 μM) und SBI-0206965 auf OVA- und B5-spezifische T-Zellen**

A/B) Ein  $\times 10^6$  BMDCs/mL wurden mit einer MOI von 10 infiziert. Gleichzeitig wurden, wenn benötigt, die in der Abbildung dargestellten Inhibitoren in der jeweiligen Konzentration zu dem Infektionsansatz hinzugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in ein 96-V-Mikro-Loch einer 96-Mikro-Loch-Platte überführt und für weitere 7 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden  $2 \times 10^5$  T-Zellen sowie Brefeldin A in einer Endkonzentration von 1 μg/mL hinzugefügt. Nach einer vierzehnstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Stimulation der T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung analysiert.

A) Aktivierung OVA-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen; B) Aktivierung B5-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen; C) X-fache Reduktion der IFN- $\gamma$ -Produktion der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch MRT68921 (10  $\mu$ M und 1  $\mu$ M) und SBI-0206965 (10  $\mu$ M) behandelte BMDCs verglichen mit unbehandelten BMDCs (Mittelwerte).

Lila: IFN- $\gamma$ ; Grün: IL-2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, welche aus den Ergebnissen von drei unabhängig durchgeführten Versuchen berechnet wurden.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Virologie der Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf durchgeführt. Zusätzliche Unterstützung erhielt ich von der Research Training Group GRK 1949.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Ingo Drexler für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des interessanten Themas danken. Darüber hinaus waren sein offenes Ohr für Probleme, seine stets gute Erreichbarkeit sowie das Vertrauen in mich und meine Arbeit wesentliche Bestandteile für die schnelle und sichere Einführung in die experimentelle Forschung. Mit seiner Unterstützung lernte ich nicht nur Probleme zu lösen, sondern auch selbstständig zu arbeiten und daraus resultierend Freude an der Arbeit im Labor zu finden.

Außerdem bedanke ich mich bei Houda, Baila, Gregor, Sha und Ronny, die mich als Mitglieder der Arbeitsgruppe unterstützt haben.

Mein größter Dank geht an meine Familie. Insbesondere möchte ich meiner Mutter für die Unterstützung in den besonders schwierigen Phasen dieser Arbeit danken. Sie hat mich immer wieder dazu ermutigt, nicht aufzugeben und an mich geglaubt, wenn ich die Hoffnung bereits aufgegeben hatte. Ohne sie wäre diese Arbeit vermutlich niemals fertig geworden.

Zu guter Letzt danke ich meinen Fellnasen Charly, Cosmopolitan und Midnight, welche mir durch ihre verspielte und liebenswürdige Art auch in schwierigen Phasen ein Lächeln ins Gesicht zaubern konnten.