

Untersuchungen zur Präsentation von endogenen Antigenen auf MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen



Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

eingereicht von

Anne-Wiebe Mohr

München, 2016

angefertigt am Helmholtz Zentrum München

Erstgutachter: PD Dr. Josef Mautner

Zweitgutachter: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Eingereicht am: 24.11.2016

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2017

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. SUMMARY	3
3. EINLEITUNG	4
3.1 DAS IMMUNSYSTEM: ANGEBORENE UND ADAPTIVE IMMUNABWEHR	4
3.1.1 Zellen des Immunsystems	5
3.1.1.1 B-Zellen	5
3.1.1.2 T-Zellen.....	5
3.1.2 MHC-Moleküle	6
3.2 ANTIGENPRÄSENTATION AUF MHC-KLASSE-I-MOLEKÜLEN	7
3.2.1 MHC-Moleküle der Klasse I	7
3.2.2 Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen.....	7
3.2.2.1 Degradation von Proteinen durch den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg	7
3.2.2.2 Weitere Degradation von Proteinen im Zytosol	9
3.2.2.3 Transport der Peptide in das Endoplasmatische Retikulum	9
3.2.3 Alternative Wege der Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen	10
3.2.4 Modelle zur Herkunft der auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierten Antigene	10
3.2.4.1 Proteom-Modell.....	10
3.2.4.2 Hypothese der <i>Defective Ribosomal Products</i> (DRiP)	10
3.2.4.3 Modell der Polypeptide aus der ersten Translationsrunde	11
3.2.4.4 Modell der prä-mRNA-Translationsprodukte	11
3.3 ANTIGENPRÄSENTATION AUF MHC-KLASSE-II-MOLEKÜLEN	12
3.3.1 MHC-Moleküle der Klasse II	12
3.3.2 Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-II-Molekülen.....	13
3.3.2.1 Autophagie.....	14
3.3.2.2 Regulation von Autophagie durch mTOR.....	17
3.4 FRAGESTELLUNG.....	18
4. MATERIAL	19
4.1 CHEMIKALIEN.....	19
4.2 GERÄTE.....	20
4.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN	21
4.4 ALLGEMEINE PUFFER UND LÖSUNGEN.....	21
4.5 ZELLEN.....	22
4.5.1 Antigen-präsentierende Zelllinien	22
4.5.2 T-Zellen.....	22
4.5.3 Zellkulturmedien	23
4.6 BAKTERIEN	24
4.7 PLASMIDE	24

4.8	IMMUNOLOGISCHE REAGENZIEN	29
4.8.1	<i>Antikörper</i>	30
4.8.1.1	Primärantikörper	30
4.8.1.2	Sekundärantikörper	30
4.9	PROTEINBIOCHEMISCHE REAGENZIEN	31
4.10	AUTOPHAGIE- UND MTOR-INHIBITOREN	32
5.	METHODEN	33
5.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	33
5.1.1	<i>DNA-Klonierung</i>	33
5.1.1.1	Vervielfältigung von DNA-Sequenzen mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion	33
5.1.1.2	Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen	34
5.1.1.3	Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol Fällung	35
5.1.1.4	Ligation von DNA-Fragmenten	35
5.1.2	<i>Elektrophorese von DNA in Agarosegelen</i>	35
5.1.3	<i>Extraktion von DNA aus Agarosegelen</i>	36
5.1.4	<i>Sequenzanalyse</i>	36
5.1.5	<i>Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion</i>	36
5.1.5.1	RNA Extraktion	36
5.1.5.2	Reverse Transkription	36
5.1.5.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	37
5.2	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	39
5.2.1	<i>Vervielfältigung von Plasmid-DNA in Bakterien</i>	39
5.2.1.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien zur Transformation	39
5.2.1.2	Transformation von elektrokompenten Bakterien	39
5.2.1.3	Isolation von kleinen DNA-Mengen	39
5.2.1.4	Vervielfältigung von großen Mengen DNA	40
5.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	40
5.3.1	<i>Allgemeine Anmerkung zu zellbiologischen Methoden</i>	40
5.3.2	<i>Kultivierung humaner Zellen</i>	41
5.3.2.1	Kultivierung von etablierten Zelllinien	41
5.3.3	<i>Kultivierung und Stimulation von etablierten T-Zellen</i>	41
5.3.3.1	PHA-Stimulation	41
5.3.3.2	Protein- und Peptid-Stimulation	42
5.3.4	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	42
5.3.5	<i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i>	42
5.3.6	<i>Zellseparation mittels Ficoll-Dichtegradienten</i>	42
5.3.7	<i>Transfektion von Zellen</i>	43
5.3.7.1	Elektroporation von Suspensionszelllinien	43
5.3.7.2	Chemische Transfektion von adhärennten Zellen	43
5.3.8	<i>Etablierung stabiler Zelllinien</i>	43
5.3.9	<i>T-Zell-Assay</i>	44
5.3.10	<i>Analyse der Zytokinausschüttung von T-Zellen mittels ELISA</i>	44
5.4	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	45
5.4.1	<i>Durchflusszytometrie</i>	45

5.4.1.1	Analyse GFP-exprimierender Zellen.....	45
5.4.2	Konfokalmikroskopie.....	45
5.4.3	Magnetische Zellseparation.....	46
5.5	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	46
5.5.1	Herstellung von RIPA-Extrakten.....	46
5.5.2	Herstellung von Zelllysaten mit Harnstoff-Lysepuffer.....	46
5.5.3	Proteinaufreinigung mithilfe der 6xHistidin-Markierung.....	47
5.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	47
5.5.5	Western-Transfer.....	47
5.5.6	Dot-Blot.....	47
5.5.7	Immundetektion von Proteinen.....	48
6.	ERGEBNISSE.....	49
6.1	DER EINFLUSS VON DEFECTIVE RIBOSOMAL PRODUCTS AUF DIE PRÄSENTATION VON MODELLANTIGENEN.....	49
6.1.1	Transiente Expression eines Modellantigens.....	49
6.1.2	Expression und Lokalisation der Fusionsproteine CFTRwt-GFP und CFTRmut-GFP.....	50
6.1.3	Präsentation des an CFTRwt bzw. CFTRmut fusionierten YVL-Epitops auf MHC-Klasse-I-Molekülen.....	51
6.1.4	Die Faltungsmodulatoren beeinflussen die Expression der Modellproteine.....	52
6.1.5	Die Faltungsmodulatoren haben keinen Einfluss auf die Präsentation der fusionierten Epitope.....	56
6.2	DIE BEDEUTUNG DER PRÄ-MRNA ALS MÖGLICHE ANTIGENQUELLE.....	57
6.2.1	Expressionssystem zur Untersuchung des Einflusses von prä-mRNA.....	57
6.2.2	Die Spleißmutationen reduzieren die Proteinexpression.....	59
6.2.3	Die Spleißmutationen beeinflussen die mRNA-Menge.....	60
6.2.4	Prä-mRNAs stellen keine effiziente Quelle für Antigene dar.....	61
6.3	DER EINFLUSS DER 3' UNTRANSLATIERTEN REGIONEN AUF DIE PRÄSENTATION VON MODELLANTIGENEN.....	63
6.3.1	Modulation der mRNA-Stabilität durch unterschiedliche 3' untranslatierte Regionen.....	63
6.3.2	Der Einfluss der unterschiedlichen 3'UTR auf die Präsentation des Modellantigens.....	64
6.3.3	Der Einfluss der 3'UTR auf die Protein-Expressionslevel.....	66
6.3.4	Die Stabilität der mRNA ist abhängig von der 3'UTR.....	67
6.4	UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON FLANKIERENDEN SEQUENZEN AUF DIE ANTIGENPRÄSENTATION EINES MODELLANTIGENS AUF MHC-KLASSE-II-MOLEKÜLEN.....	69
6.4.1	Endogene Expression von modifizierten und verkürzten NeoR-Proteinen und deren Auswirkungen auf die MHC-Klasse-II Präsentation.....	69
6.4.2	Repetitive flankierende Regionen beeinflussen die Präsentation des DRY-Epitops auf MHC-Klasse-II-Molekülen bei endogener Expression.....	72
6.4.3	Die flankierenden Sequenzen beeinflussen die Präsentation von DRY-Epitopen auch bei exogener Beladung von APC.....	75
6.5	EINFLUSS DES AUTOPHAGOSOMALEN ABBAUS AUF DIE PRÄSENTATION EINES MODELLANTIGENS AUF MHC-KLASSE-II-MOLEKÜLEN.....	77
6.5.1	Autophagie-Inhibitoren führen zu einer Akkumulation des Modellantigens NeoR-GFP... ..	79
6.5.2	Autophagie-Inhibitoren reduzieren die Präsentation des Modellantigens NeoR-GFP.....	81
6.5.3	Einfluss von mTOR-Inhibitoren auf die Expression des Modellantigens NeoR-GFP.....	83

6.5.4	<i>Die Inhibition von mTOR führt zu keiner gesteigerten Präsentation des Modellantigens NeoR-GFP auf MHC-Klasse-II-Molekülen</i>	85
7.	DISKUSSION	86
7.1	WOHER STAMMEN ANTIGENE, DIE AUF MHC-KLASSE-I-MOLEKÜLEN PRÄSENTIERT WERDEN?	86
7.1.1	<i>CFTR und die DRiP-Hypothese</i>	86
7.1.1.1	Die Präsentation von CFTR folgt nicht den Vorhersagen der DRiP-Hypothese	86
7.1.1.2	Die Auswahl von DRiP für die Antigenpräsentation	88
7.1.2	<i>Nukleäre Translation von prä-mRNA</i>	89
7.1.2.1	Die prä-mRNA des Modellantigens BZLF1 ist keine Quelle von Epitopen, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden	90
7.1.2.2	Verwendung von internen und alternativen Initiationskodons	90
7.1.3	<i>Der Einfluss der mRNA-Menge auf die Antigenpräsentation</i>	91
7.2	ANTIGENPRÄSENTATION AUF MHC-KLASSE-II-MOLEKÜLEN	92
7.2.1	<i>Die Präsentation eines endogen exprimierten Epitops auf MHC-Klasse-II-Molekülen wird durch die flankierende Sequenzen beeinflusst</i>	93
7.2.2	<i>NeoR wird nicht durch Chaperon-assoziierte Autophagie in den Antigenpräsentationsweg eingeschleust</i>	95
7.2.3	<i>Der Einfluss von Autophagie und mTOR auf die Antigenpräsentation</i>	95
7.2.3.1	Der Einfluss des ULK-Komplexes auf die Antigenpräsentation	96
7.2.3.2	Der Einfluss des Vps34-Komplexes auf die Antigenpräsentation	96
7.2.3.3	Der Einfluss des Lysosoms auf die Antigenpräsentation	98
7.2.3.4	Der Einfluss von mTOR auf die Antigenpräsentation	99
7.2.3.5	Die Regulation der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen erfolgt mTOR unabhängig	100
8.	AUSBLICK	101
9.	LITERATUR	102
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	115
	TABELLENVERZEICHNIS	116
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	118
	ERKLÄRUNG	118
	DANKSAGUNG	119
	LEBENS LAUF	120

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
α	Alpha/anti	DOC	Desoxycholsäure
β	Beta	DRiP	<i>Defective ribosomal products</i> (fehlerhafte ribosomale Translationsprodukte)
γ	Gamma	DRY	Epitop DRYQDIALATRDIA des Antigens NeoR
μ L	Mikroliter	DTT	Dithiothreitol
μ g	Mikrogramm	EBV	Epstein-Barr-Virus
3'UTR	3' untranslatierte Region	ECL	Elektrochemilumineszenz
APC	<i>Antigen presenting cells</i> (antigenpräsentierende Zellen)	EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
APS	Ammoniumpersulfat	ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent assay</i>
ARE	AU-reiche Elemente	ER	Endoplasmatisches Retikulum
AREm	Mutierte AU-reiche Elemente	FACS	<i>Fluorescence-activated cell scanning</i> (Durchflusszytometrie)
AS	Aminosäure	FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
ATP	Adenosintriphosphat	FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
BCR	<i>B cell receptor</i> (B-Zell-Rezeptor)	gDNA	<i>Genomic DNA</i> (genomische DNS)
BSA	Bovines Serum Albumin	GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
BZwt	BZLF1 Wildtyp	GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (Granulozyten- Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor)
bzw.	Beziehungsweise	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ca.	Circa	H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (komplementäre DNS)	HEPES	2-(4-(2-Hydroethyl)-1-Piperazinyl)- Ethansulfonsäure
CF	Cystische Fibrose	HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> (Ionenkanal in Cystischer Fibrose)	Hsc70	<i>Heat-shock-protein 70</i> (Hitzeschock- Protein 70)
CFTRmut	CFTR Mutante Δ F508	IFN γ	Interferon gamma
CFTRwt	CFTR Wildtyp	li	Invariante Kette
CIP	<i>Calf intestinal phosphatase</i> (Phosphatase aus dem Darmtrakt von Kälbern)	IL	Interleukin
CLIP	<i>Class II-associated invariant chain peptide</i> (Klasse II-assoziertes Peptid der invarianten Kette)	KFERQ	Pentamerische Signalsequenz für CMA
CMA	<i>Chaperone mediated autophagy</i> (Chaperon-assozierte Autophagie)	LAMP2a	<i>Lysosome-associated membrane proteine 2a</i> (Lysosom-assoziertes Membranprotein 2a)
CMV	Cytomegalievirus	LC3	<i>Light chain 3</i> (leichte Kette 3)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid		
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol		
DC	<i>Dendritic cells</i> (Dendritische Zellen)		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure, DNS)		

LCL	<i>Lymphoblastoid cell line</i> (lymphoblastoide Zelllinie)	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
LLW	Epitop LLWTLVLL des Antigens LMP2a	pg	Picogramm
M1-8	BZLF1 Mutate 1-8	PHA	Phytohämagglutinin
M/mM	Stoffmengenkonzentration molar/millimolar	PRR	<i>Pathogen recognition receptors</i> (Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren)
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i> (magnetische Trennung von Zellen)	PTP	<i>Pioneer translation products</i> (Produkte der ersten Translationsrunde)
MCS	<i>Multiple cloning sites</i> (Ansammlung von Restriktionsenzym- Schnittstellen)	PVDF	Polyvinylidenfluorid-Transfer- Membran
MFI	Mediane Fluoreszenz-Intensität	qPCR	<i>Quantitative Polymerase chain reaction</i> (quantitative Polymerase- Kettenreaktion)
mg	Milligramm	RAK	Epitop RAKFKQLL des Antigens BZLF1
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)	RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure, RNS)
mL	Milliliter	rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Boten-RNS)	RT	Raumtemperatur
mTOR	<i>Mammalian target of Rapamycin</i> (Ziel von Rapamycin im Säugetier)	RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
MW	Mittelwert	SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
NaOH	Natriumhydroxid	SV40	<i>Simian-Virus 40</i> (Affenvirus 40)
NeoR	Neomycin-Phosphotransferase II	TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Saline)
ng	Nanogramm	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
NGFR	<i>Nerve growth factor receptor</i> (Nerven-Wachstumsfaktor Rezeptor)	TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i> (Antigenprozessierungs- assoziierter Transporter)
NK	Natürliche Killerzellen	TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
NLR	<i>Nucleotide-binding oligomerisation domain protein-like receptors</i> (Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomänen-ähnliche Rezeptoren)	Tet	Tetracyclin-induzierbarer, bi- direktionaler Promotor
nm	Nanometer	TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Toll-ähnlicher Rezeptor)
NMD	<i>Nonsense-mediated decay</i> (Abbau von Nonsense-Mutationen tragender mRNA)	TPPII	Tripeptidyl Peptidase II
PAA	Polyacrylamid	U	<i>Units</i> (wirksame Einheiten)
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen)	UPS	<i>Ubiquitin-proteasome-system</i> (Ubiquitin-Proteasom-Signalweg)
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)	UV	Ultraviolettes Licht
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Saline)	V	Volt
		VQT	Epitop VQTAAAVVF des Antigens BZLF1
		WB	Western-Blot

x g	X-fache Schwerkraft	z.B.	Zum Beispiel
YVL	Epitop YVLDHLIVV des Antigens BRLF1	%	Prozent

In dieser Arbeit wurden englische Begriffe in kursiver Schreibweise dargestellt.

1. Zusammenfassung

Grundlage für die Entstehung adaptiver Immunantworten ist die Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen. Die hierfür verantwortlichen Antigen-Prozessierungswege sind weitgehend aufgeklärt, jedoch ist die molekulare Basis der Antigen-Auswahl noch immer unverstanden. Neuere Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, dass Antigene, die über endogene Präsentationswege auf MHC-Moleküle geladen werden, vornehmlich von neusynthetisierten und nicht von maturen Proteinen abstammen. Wie und welcher Teil der neusynthetisierten Translationsprodukte ausgewählt und in die Antigenpräsentationswege dirigiert wird und ob biochemische Charakteristika der Antigene die Auswahl beeinflussen, ist noch ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Postulate und Hypothesen zur Antigen-Auswahl und -Präsentation untersucht: (1) der Beitrag von *Defective Ribosomal Products* (DRiP) sowie (2) prä-mRNA-Translationsprodukten zum Antigenpool und (3) der Einfluss von Antigen-mRNA-Stabilität. Desweiteren wurden (4) der Einfluss biochemischer Eigenschaften, sowie Größe der Antigene auf die Präsentation und (5) die Beteiligung verschiedener Autophagie-Komponenten und des mTOR-Signalwegs in der Antigenpräsentation studiert.

Um die DRiP-Hypothese zu überprüfen, wurde die Präsentation des Modellantigens *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) und der instabilen Variante CFTR Δ F508 auf MHC-Klasse-I-Molekülen untersucht. Nach Expression in Zielzellen wurden Antigene aus beiden Proteinen mit ähnlicher Effizienz präsentiert und die Behandlung mit CFTR-Faltungsmodulatoren, die zu erhöhten Proteinspiegeln führte, hatte keinen Einfluss auf die T-Zellerkennung. Für dieses Modellantigen konnten somit keine Anhaltspunkte für einen Beitrag von DRiP zum Antigenpool gefunden werden.

Die Bedeutung von prä-mRNA-Translationsprodukten als Antigenquelle wurde durch den Vergleich der Präsentation von Exon- und Intron-kodierten T-Zellepitopen untersucht. Eine T-Zellerkennung Intron-kodierter Epitope erfolgte nur nach Mutation der Spleiß-Stellen und der dadurch bedingten Translation von Intronsequenzen. Neben fehlenden Evidenzen für einen bedeutenden Beitrag von prä-mRNA-Translationsprodukten zum Antigenpool lieferten diese und weitere Untersuchungen auch keine Hinweise auf einen Einfluss der Antigenmenge und der Antigen-mRNA-Stabilität auf die Antigenpräsentation.

Untersuchungen zur endogenen Präsentation eines Modellantigens auf MHC-Klasse-II-Molekülen ergaben, dass sowohl die Länge des Polypeptids als auch seine Aminosäuresequenz einen großen Einfluss auf die Autophagie-abhängige Präsentation des Antigens haben. Durch Verwendung verschiedener chemischer Inhibitoren wurden Hinweise auf eine mTOR-unabhängige Regulation dieses Präsentationswegs erhalten.

2. Summary

Basis for the development of adaptive immune response is the presentation of antigens on MHC class I and II molecules. While the pathways involved in antigen processing have been extensively studied, the molecular basis for the selection of antigens still remains unknown. Recent results from different labs showed that antigens loaded on MHC molecules via endogenous presentation pathways are mainly derived from newly synthesized and not from mature proteins. How and which fraction of the newly synthesized translation products is selected and channeled into presentation pathways and whether biochemical characteristics of antigens influence the selection, is still unclear.

In this study, different theories and hypotheses regarding antigen selection and presentation were analyzed: (1) the contribution of Defective Ribosomal Products (DRiP) and (2) pre-mRNA translation products to the antigen pool, (3) the influence of mRNA stability and (4) biochemical properties as well as size of polypeptides on antigen presentation, and (5) the involvement of different components of autophagy and of the mTOR signaling pathway in antigen presentation.

In order to examine the DRiP hypothesis, the presentation of the model antigen Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) and the instable CFTR Δ F508 variant on MHC class I molecules was analyzed. Following expression in target cells, antigens from both proteins were presented with similar efficiency and treatment with CFTR folding modulators, which resulted in increased protein levels, had no effect on T-cell recognition. Thus, no evidence for a significant contribution of DRiP to the antigenic pool was obtained for this model antigen.

The relevance of pre-mRNA translational products in antigen presentation was investigated by comparing T-cell recognition of epitopes derived from exon sequences to those derived from intron sequences. T cells recognized intronic epitopes only if the splicing sites were mutated and, consequently, when intron sequences became part of the open reading frame. Besides challenging the relevance of pre-mRNA translational products for the antigenic pool, these and additional experiments also demonstrated that the abundance of the antigenic protein, or the stability of the antigen mRNA, does not correlate with efficiency of antigen presentation.

Analysis of endogenous presentation of a model antigen on MHC class II molecules demonstrated that size and amino acid composition of the antigenic polypeptide has a major effect on autophagy-dependent antigen presentation. By using different chemical inhibitors, a mTOR-independent regulation of this antigen presentation pathway was revealed.

3. Einleitung

3.1 Das Immunsystem: Angeborene und adaptive Immunabwehr

Das Immunsystem schützt den Körper vor Pathogenen und wird in einen angeborenen und einen adaptiven Teil unterteilt.

Die angeborene Immunabwehr vermittelt die sofortige, eher unspezifische Immunabwehr, entwickelt aber kein immunologisches Gedächtnis (Murphy et al., 2012). Die angeborene Immunabwehr umfasst physikalische Barrieren, wie die Haut und Schleimhäute, mechanische Schutzmechanismen, wie Zilien und enge Zell-Zell-Kontakte, und lösliche Komponenten, wie antimikrobielle Enzyme und Peptide sowie das Komplementsystem (Medzhitov and Janeway Jr, 2000, Albiger et al., 2007, Murphy et al., 2012). Das angeborene Immunsystem umfasst Zellen, wie z.B. Makrophagen, Dendritische Zellen (DC), Granulozyten und Natürliche Killerzellen (NK), die körperfremde von körpereigenen Strukturen anhand von gleichbleibenden molekularen Mustern, sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP; Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen), unterscheiden können. Diese molekularen Muster werden mithilfe von evolutionär konservierten *pathogen recognition receptors* (PRR; Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren) erkannt (Medzhitov and Janeway Jr, 2000). Zu dieser Gruppe gehören unter anderem *Toll-like receptors* (TLRs; Toll-ähnliche Rezeptoren) und *Nucleotide-binding oligomerisation domain protein-like receptors* (NLRs; Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomänen-ähnliche Rezeptoren) (Albiger et al., 2007, Murphy et al., 2012). Durch die verschiedenen Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems können Pathogene eliminiert oder die Infektion eingedämmt werden, bis sich eine spezifische, adaptive Immunantwort ausgebildet hat (Albiger et al., 2007).

Die adaptive Immunabwehr richtet sich spezifisch gegen bestimmte Merkmale von Pathogenen, sogenannte Antigene (Murphy et al., 2012). Antigenpräsentierende Zellen (APC; *antigen presenting cells*) präsentieren anderen Zellen Antigene auf ihrer Zelloberfläche, daher sind sie wichtige Bestandteile des adaptiven Immunsystems. Essentiell für die adaptive Immunität sind zudem T-Zellen, die diese Antigene erkennen und die Zell-vermittelte Immunabwehr einleiten, und B-Zellen, die nach der Erkennung von Antigenen spezifische Antikörper produzieren (Prlic et al., 2007). Das adaptive Immunsystem kann ein immunologisches Gedächtnis ausbilden, das bei einem weiteren Kontakt eine schnellere und intensivere Reaktion ermöglicht (Prlic et al., 2007).

Lange Zeit wurden angeborene und adaptive Immunabwehr als getrennte Bestandteile der Immunität angesehen, mittlerweile ist offensichtlich, dass sie sich gegenseitig beeinflussen. So

wurde gezeigt, dass das Komplementsystem die Bildung von B-Gedächtniszellen positiv beeinflusst (Carroll and Prodeus, 1998). Zudem sind DC ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität und für beide Arten der Immunantwort essentiell (Waisman et al., 2016).

3.1.1 Zellen des Immunsystems

Leukozyten, die Zellen des Immunsystems, stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab. Im Knochenmark differenzieren diese zu lymphoiden oder myeloischen Vorläuferzellen aus, die sich weiter spezialisieren. Aus lymphoiden Vorläuferzellen entstehen T-, B- und NK-Zellen und aus myeloischen Vorläuferzellen bilden sich Granulozyten, Mastzellenvorläufer und Monozyten (Kondo, 2010). DC können von beiden Linien abstammen (Kondo, 2010).

3.1.1.1 B-Zellen

B-Zellen besitzen B-Zell-Rezeptoren (BCR; *B cell receptors*) auf der Oberfläche. Das sind membranständige Antikörpermoleküle, durch die Antigene gebunden werden können (Batista and Harwood, 2009). B-Zellen können jedoch Antigene nicht nur erkennen, sondern auch anderen Zellen präsentieren (Trombetta and Mellman, 2005, Batista and Harwood, 2009). Fragmente von endogenen und exogenen Proteinen werden auf der Oberfläche gezeigt, können dort von anderen Zellen gebunden werden und dadurch eine Immunreaktion auslösen.

3.1.1.2 T-Zellen

T-Zellen besitzen zur Erkennung von Antigenen T-Zell-Rezeptoren (TCR; *T cell receptors*). Im Gegensatz zu B-Zellen erkennen T-Zellen nicht ganze Proteine, sondern kurze Peptide, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden (Rudolph et al., 2006). TCR sind Heterodimere, die zumeist aus einer α - und einer β -Kette, seltener aus einer γ - und einer δ -Kette bestehen und im Aufbau den Immunglobulinen ähneln (Rudolph et al., 2006). CD3-Moleküle sind Ko-Rezeptoren des TCR, bilden mit diesen zusammen den TCR-Komplex und regulieren die Aktivierung der T-Zellen.

Neben dem TCR-Komplex sind die kostimulatorischen Rezeptoren CD4 oder CD8 für die Aktivierung von T-Zellen erforderlich (Smith-Garvin et al., 2009). Diese Korezeptoren interagieren mit nicht-variablen Regionen der MHC-Moleküle. T-Zellen werden nach ihrer Expression von CD4- oder CD8-Korezeptoren klassifiziert.

Neben der Erkennung des Antigens durch den TCR-Komplex wird für eine Aktivierung der T-Zelle ein zweites Signal durch kostimulatorische Rezeptoren benötigt (Mueller et al., 1989). Ein kostimulatorischer Rezeptor ist CD28, der die Liganden CD80 oder CD86 (auch B7-Moleküle genannt)

auf APC bindet und dadurch ein zusätzliches Signal auslöst (Chen and Flies, 2013). Weitere stimulatorische Rezeptoren sind z.B. ICOS, 4-1BB und OX40, die die Liganden B7-H2, 4-1BBL und OX40L auf APC binden. Daneben gibt es auch inhibitorische Korezeptoren, wie z.B. CTLA4 und PD1, die eine Aktivierung unterbinden (Chen and Flies, 2013).

Das alleinige Auftreten eines kostimulatorischen Signals hat keine Aktivierung der T-Zellen zur Folge und das alleinige Auftreten des antigenspezifischen Signals induziert Anergie in T-Zellen (Murphy et al., 2012). Ein drittes Signal durch Zytokine wird für die Differenzierung zu verschiedenen Effektor T-Zellen benötigt (Curtsinger and Mescher, 2010).

CD4⁺ T-Zellen erkennen Antigene, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, und werden in verschiedene Subtypen unterteilt. Klassischerweise unterscheidet man aufgrund des Zytokin-Profiles und ihrer Funktion zwischen T-Helferzellen Typ 1 (T_{H1}), T_{H2}, T_{H17} sowie folliculären T-Helferzellen (T_{FH}) und regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) (Swain et al., 2012). Zwischen den einzelnen Untergruppen scheint jedoch eine gewisse Plastizität zu bestehen (Zhou et al., 2009, O'Shea and Paul, 2010).

CD4⁺ T-Zellen haben verschiedene Aufgaben innerhalb des Immunsystems: nach der Erkennung von Antigen schütten sie Zytokine aus, die eine Entzündungsreaktion einleiten und andere lymphoide Zellen zum Ort der Infektion bringen (Swain et al., 2012). Darüber hinaus besitzen CD4⁺ T-Zellen eine direkte, zytotoxische Wirkung auf infizierte Zellen (Marshall and Swain, 2011).

CD8⁺ T-Zellen erkennen Antigene, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. Sie werden auch zytotoxische T-Zellen genannt, da sie gezielt infizierte Zellen eliminieren können (Bedoui et al., 2016). CD8⁺ T-Zellen werden durch CD4⁺ T-Zellen unterstützt, indem sie antigenpräsentierende Zellen aktivieren, sodass diese vermehrt kostimulatorische Moleküle exprimieren (Laidlaw et al., 2016). Nach Aktivierung können CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu Gedächtniszellen differenzieren, wodurch bei einer erneuten Infektion eine schnellere Immunreaktion erfolgt (Laidlaw et al., 2016).

3.1.2 MHC-Moleküle

Der Ausdruck MHC leitet sich aus dem Englischen *major histocompatibility complex* (MHC; Haupthistokompatibilitätskomplex) ab und bezeichnet das am stärksten polymorphe Gencluster im Menschen. Dieses Gencluster kodiert für Membranproteine, die antigene Peptide, sogenannte Epitope, binden und auf der Zelloberfläche präsentieren. Diese Membranproteine werden auch HLA (Humanes Leukozyten-Antigen) Moleküle, genannt. Im Menschen wird zwischen zwei Klassen von MHC-Molekülen unterschieden, MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle (Zinkernagel and

Doherty, 1974). Sie unterscheiden sich in ihrem Aufbau und werden von verschiedenen Klassen von T-Zellen erkannt.

Innerhalb der menschlichen Population sind die für MHC-Moleküle kodierenden Gene äußerst polymorph. Die Polymorphismen befinden sich hauptsächlich in der Region, die für die Epitop-Bindestellen im späteren MHC-Molekül kodieren, wodurch ein breites Spektrum an Peptiden präsentiert werden kann (Blum et al., 2013). Die Transmembran-Region von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen ist hingegen konserviert.

3.2 Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen

3.2.1 MHC-Moleküle der Klasse I

MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer schweren α -Kette und aus dem nicht-kovalent gebundenem β_2 -Mikroglobulin (Blum et al., 2013). Die drei Genloci, die im Menschen für die schweren Ketten kodieren, heißen HLA-A, -B und -C (Wright et al., 2004). Jeder Mensch besitzt sechs Allele für MHC-Klasse-I-Moleküle. MHC-Klasse-I-Moleküle können in der Regel Peptide von einer Länge von 8-10 Aminosäuren binden. Die Bindung erfolgt mithilfe von Anker-Aminosäuren und geladenen Enden. Jedes HLA-Molekül bindet eine spezifische Gruppe von Peptiden, die durch die Verteilung der Anker-Aminosäuren definiert wird (Wright et al., 2004). Da die Bindetaschen von MHC-Klasse-I-Molekülen geschlossen sind und daher kein Überhängen von Peptiden erlauben, ist die Länge der gebundenen Peptide determiniert. MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf fast allen Zellen exprimiert, einzige Ausnahme sind rote Blutzellen (Murphy et al., 2012).

3.2.2 Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen

Der klassische Weg der Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

3.2.2.1 Degradation von Proteinen durch den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg

Mithilfe des Ubiquitin-Proteasom-Signalwegs (UPS; *ubiquitin-proteasome-system*) werden intrazelluläre Proteine abgebaut. Dabei entstehen auch Antigene, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden (Rock et al., 1994). Dazu werden zytosolische Proteine mit Ubiquitin markiert, die ubiquitin-markierten Proteine vom Proteasom gebunden und in Peptide fragmentiert (Rock and Goldberg, 1999).

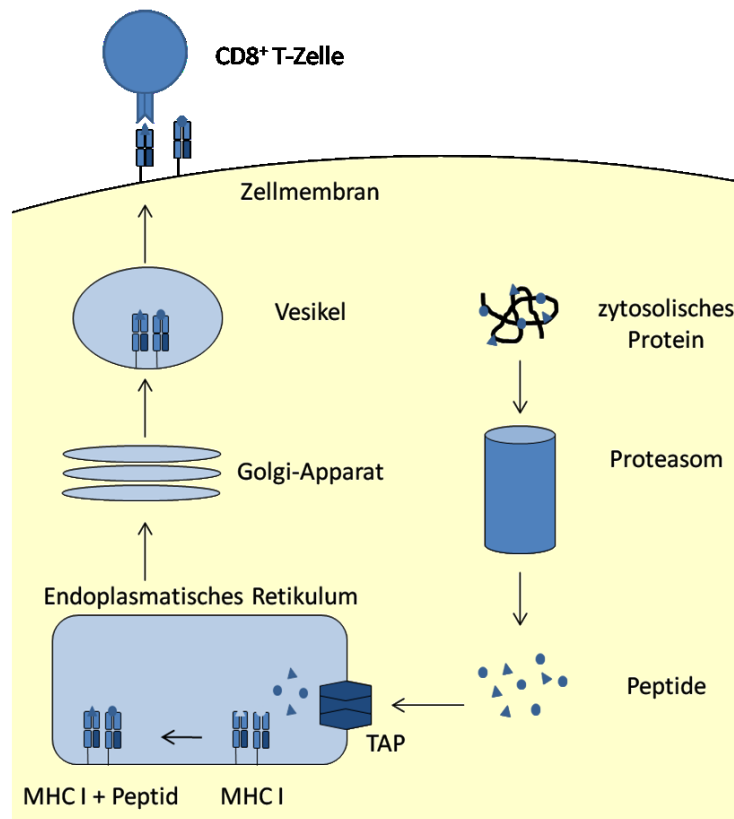


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Prozessierung und Präsentation von Antigen auf MHC-Klasse-I-Molekülen. Zytosolisches Protein wird mithilfe des Proteasoms und gegebenenfalls anderer zytosolischer Proteasen in kurze Peptidketten gespalten. Diese werden durch den Antigenprozessierungs-assoziierten Transporter (TAP) in das Endoplasmatische Retikulum importiert. Dort werden MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC I) mit den Peptiden beladen und über das Golgi-Netzwerk an die Zellemembran transportiert, wo sie von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden können.

Das Proteasom ist ein großer Proteinkomplex, der aus einem katalytischen 20S-Molekül und zwei regulatorischen 19S-Molekülen besteht. Die regulatorischen 19S-Moleküle bestehen jeweils aus 6 ATPase-Untereinheiten und 10 nicht-ATPase-Untereinheiten und binden an die α -Untereinheiten des katalytischen Teils des Proteasoms (Blum et al., 2013). Sie regulieren die Bindung von Substraten, sowie die Entfaltung und Weitergabe des Substrats an die 20S-Einheit (Leone et al., 2013). Die katalytische 20S-Einheit ist zylinderförmig und besteht aus 4 ringförmigen Untereinheiten. Die 4 Ringe bestehen aus jeweils sieben Untereinheiten, die zwei äußeren Ringe sind α -Untereinheiten, die zwei inneren Ringe sind β -Untereinheiten (Rock and Goldberg, 1999). Die Zusammensetzung der β -Untereinheiten der 20S-Einheit kann in Abhängigkeit von Interferon γ (IFN γ) variieren (Gaczynska et al., 1993, Aki et al., 1994). Diese Variation wird Immunoproteasom genannt und besitzt eine leicht erhöhte Prozessierungsrate (Cascio et al., 2001) und verändertes Spaltungsverhalten im Vergleich zum regulären Proteasom (Leone et al., 2013).

Experimente mit Proteasomen aus Kaninchen zeigten, dass 95 % der durch Proteasomen hergestellten Fragmente eine Länge von 3-22 Aminosäuren haben. Des Weiteren zeigen diese

Untersuchungen, dass weniger als 15 % der Fragmente die Ideal-Länge von 8-9 Aminosäuren haben und etwa 60 % der Fragmente zu kurz sind, um auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert zu werden. Weitere 15-20 % der Fragmente sind länger als 10 Aminosäuren (Kisselev et al., 1999).

Untersuchungen mit Proteasom-Inhibitoren ergaben, dass das Proteasom die einzige Protease ist, die den korrekten C-Terminus eines Antigens generiert, und es keine weiteren Carboxy-Peptidasen im Zytosol gibt (Rock et al., 2004). Sofern die Peptid-Fragmente länger sind, als die erforderlichen 8-10 Aminosäuren, bedarf es nach der Fragmentierung durch das Proteasom noch weiterer Prozessierung des N-Terminus im Zytosol oder Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Cascio et al., 2001, Kloetzel, 2004, Leone et al., 2013). Schätzungen zufolge werden 99 % der Peptide, die durch das Proteasom produziert werden, abgebaut bevor sie TAP (*transporter associated with antigen processing* = Antigenprozessierungs-assoziiierter Transporter) binden können (Rock et al., 2004).

3.2.2.2 Weitere Degradation von Proteinen im Zytosol

Die Tripeptidyl Peptidase II (TPPII) ist eine sich im Zytosol befindliche Protease, die mit der Prozessierung von auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierten Antigenen in Verbindung gebracht wird (Rock et al., 2004, Kloetzel, 2004, van Endert, 2011, Rockel et al., 2012). Neben der TPPII gibt es auch andere Peptidasen im Zytosol (Lévy et al., 2002), die einen Einfluss auf die Generierung von antigenen Peptiden haben könnten. Jedoch ist unklar, ob Peptide durch zytosolische oder ER-lokalisierte Aminoproteasen prozessiert werden und ob die verschiedenen Enzyme redundante Funktion haben (Rock et al., 2004).

3.2.2.3 Transport der Peptide in das Endoplasmatische Retikulum

Die Peptidketten werden mithilfe des TAP in das Innere des ER transportiert (Androlewicz et al., 1993, Neefjes et al., 1993). TAP gehört zur Familie der ABC-Transporter, ist ein Heterodimer und besteht aus den zwei Untereinheiten TAP1 und TAP2. Peptide von 7 bis mehr als 20 Aminosäuren (Koopmann et al., 1996, Rock et al., 2004) werden ATP-abhängig in das ER transportiert. Das Vorhandensein von TAP ist von großer Bedeutung für die Antigenpräsentation; TAP-negative Zellen exprimieren niedrigere Mengen an MHC-Klasse-I-Molekülen auf ihrer Oberfläche (Spies et al., 1992, Kelly et al., 1992, Paulsson et al., 2001). Jedoch gibt es auch vereinzelte Berichte über TAP-unabhängige Antigen-Präsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen (Wei and Cresswell, 1992, Snyder et al., 1994, Lee et al., 1996). Diese werden darauf zurückgeführt, dass antigene Peptide auf alternativen Wegen in das ER gelangen (Wright et al., 2004).

3.2.3 Alternative Wege der Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen

In DC wurde beobachtet, dass exogene Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. Eine solche Präsentation von Antigenen aus exogenen Proteinen auf MHC-Klasse-I-Molekülen wird als Kreuzpräsentation bezeichnet (Norbury, 2016). Nur wenige Zelltypen scheinen zur Kreuzpräsentation befähigt.

3.2.4 Modelle zur Herkunft der auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierten Antigene

Die Herkunft von Peptiden, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, ist umstritten.

3.2.4.1 Proteom-Modell

Ursprünglich wurde angenommen, dass die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierten Antigene aus Abbauprodukten des Proteoms einer Zelle stammen (Townsend et al., 1985, Moore et al., 1988). Nach diesem Modell werden Proteine durch Abbauprozesse in der Zelle degradiert und gelangen anschließend TAP-abhängig ins ER, wo sie an MHC-Klasse-I-Moleküle binden. In mehreren Fällen korrelierte jedoch die Menge von Antigenen, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert wurden, nicht mit der Häufigkeit der Ursprungsproteine.

3.2.4.2 Hypothese der *Defective Ribosomal Products* (DRiP)

Im Jahr 1996 stellten Yewdell *et al.* die Hypothese der *Defective Ribosomal Product* (DRiP; Defekte ribosomale Translationsprodukte) auf. Die Hypothese besagt, dass frühzeitig terminierte oder falsch gefaltete Polypeptide, die durch die Translation von mRNA im richtigen Leserahmen entstehen, als Quelle von Antigenen für die Präsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen dienen. Die Ursache für die Entstehung von DRiP sind zufällig auftretende Fehler während der Proteinsynthese und/oder -Faltung (Yewdell et al., 1996).

Grundlage der DRiP-Hypothese ist die Beobachtung, dass die Menge der auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierter Antigene nicht mit der Menge oder der Halbwertszeit des antigenen Proteins korreliert (Yewdell et al., 1996, Yewdell and Nicchitta, 2006). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die Inhibition der Proteinsynthese die Präsentation von Antigenen reduziert. Würden Antigene von murenen Proteinen abstammen, so sollte dies nicht der Fall sein (Qian et al., 2006b).

3.2.4.3 Modell der Polypeptide aus der ersten Translationsrunde

Ein weiteres Modell zur Erklärung des Ursprungs von Antigenen wurde von Apcher *et al.* aufgestellt. Sie postulierten, dass bei der ersten Runde der Translation einer mRNA (*pioneer round of translation*) Polypeptide, sogenannte PTP (*pioneer translation products*; Produkte der ersten Translationsrunde) entstehen, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden (Apcher *et al.*, 2011). Dieses Modell basiert auf ihrer Beobachtung, dass das Einfügen von frühzeitigen Stoppkodons zwar den Abbau der mRNA durch *Nonsense mediated decay* (NMD, Abbau von Nonsense-Mutationen tragenden mRNAs) bedingt, aber trotzdem Präsentation von Antigenen weiterhin stattfand, sofern das Epitop vor dem frühzeitigen Stoppkodon lag (Apcher *et al.*, 2011).

Das Modell der PTP steht nicht im Gegensatz zur DRiP-Hypothese, sondern definiert eine Untergruppe von DRiP. Das Modell könnte eine Erklärung für die beobachtete Abhängigkeit der Antigenproduktion von der *de-novo* Translation bieten (Roscoe *et al.*, 1991, Reits *et al.*, 2000, Khan *et al.*, 2001).

3.2.4.4 Modell der prä-mRNA-Translationsprodukte

Kürzlich wurde von der gleichen Arbeitsgruppe postuliert, dass Translationsprodukte eines nicht-kanonischen Translationsprozesses von prä-mRNA im Nukleus die Hauptquelle von Antigenen darstellen (Apcher *et al.*, 2013). Prä-mRNA haben noch nicht den Spleiß-Vorgang durchlaufen und enthalten daher noch Intron-Sequenzen.

Bereits bevor Apcher *et al.* im Jahr 2013 ihr Modell der Translation von prä-mRNA aufstellten, gab es Berichte über die Präsentation intronischer Epitope. Coulie *et al.* berichteten von einem Epitop, das von Tumorzellen eines Melanom-Patienten präsentiert und von autologen T-Zellen erkannt wurde (Coulie *et al.*, 1995). Die Sequenz des Epitops stammte zum Teil aus einem Exon und aus einem Intron. Innerhalb des Introns befand sich eine Punktmutation, die laut der Autoren die Erkennung durch T-Zellen bedingte, jedoch nicht das Spleißen beeinflusste (Coulie *et al.*, 1995). Auch Guilloux *et al.* veröffentlichten Daten, die in Melanomzellen eine Präsentation eines intronischen Epitops nachwiesen (Guilloux *et al.*, 1996). In diesem Fall stammte das Epitop ausschließlich aus der intronischen Sequenz, die Translation wurde durch ein internes Startkodon bedingt.

Das Modell der prä-mRNA-Translationsprodukte stellt keine Weiterentwicklung der DRiP-Hypothese dar, da prä-mRNA nicht als fehlerhafte ribosomale Translationsprodukte angesehen werden können. Ebenso konkurriert dieses Modell mit dem Modell der PTP als Quelle von Antigenen, da die nukleäre Translation vor dem Spleiß-Vorgang stattfinden muss und somit eine Verwendung der Produkte der

ersten Translationsrunde überflüssig machen würde. Eine parallele Existenz beider Modelle zur Generierung von antigenen Peptiden wäre vorstellbar, jedoch stellte sich die Frage der Notwendigkeit für zwei Systeme.

3.3 Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen

3.3.1 MHC-Moleküle der Klasse II

MHC-Klasse-II-Moleküle sind Heterodimere, bestehend aus einer α - und einer β -Kette, die durch nicht-kovalente Bindung verbunden sind (Afridi et al., 2016). Sie binden Peptide, die in ihrer Länge zwischen 9 und 18 Aminosäuren variieren können (Blum et al., 2013). Grund dafür ist die Tatsache, dass die Bindetasche für das Peptid an beiden Seiten offen ist, sodass ein Überhang von nicht gebundenen Aminosäuren möglich ist (Afridi et al., 2016). Auch Peptide, die von MHC-Klasse-II-Molekülen gebunden werden, besitzen Anker-Aminosäuren, meist sind es drei bis vier (Unanue et al., 2016). Ihre Verteilung kann variabel innerhalb des Peptids sein, die Positionen sind abhängig vom jeweiligen HLA-Molekül (Falk et al., 1994, Unanue et al., 2016).

Menschen besitzen auch für MHC-Klasse-II-Moleküle je drei Genloci für α - und β -Ketten, die als HLA-DR, -DP und -DQ bezeichnet werden. Der HLA-DR-Locus kann noch ein weiteres Gen für eine β -Kette enthalten (Murphy et al., 2012).

MHC-Klasse-II-Moleküle werden konstitutiv lediglich auf sogenannten professionellen APC, wie z.B. DC, Makrophagen und B-Zellen exprimiert (Forsyth and Eisenlohr, 2016). In einer Reihe von Zellen kann die MHC-Klasse-II-Molekül-Expression durch IFN γ induziert werden (Reith et al., 2005).

Die beiden Ketten der MHC-Klasse-II-Moleküle assemblieren im ER und binden dort die Invariante Kette (Ii). Das Binden der Invarianten Kette verhindert die Beladung mit antigenen Peptiden im ER (Blum et al., 2013). Die Invariante Kette, die auch als CD74 bezeichnet wird, besitzt ein spezielles Motiv für den Transport des MHC-Klasse-II-Molekül-Ii-Komplexes durch das Golgi-Netzwerk zu den späten Endosomen (Blum et al., 2013). Im späten Endosom wird die Invariante Kette schrittweise durch verschiedene Proteasen verdaut, bis lediglich CLIP (*class II-associated invariant chain peptide*; Klasse-II-assoziertes Peptid der Invarianten Kette) in der Bindespalte der MHC-Klasse-II-Moleküle verbleibt (Riese et al., 1996, Villadangos et al., 1999, Beisner et al., 2013).

CLIP wird mithilfe von HLA-DM entfernt. HLA-DM ist ein weiteres, durch das MHC-Gencluster kodiertes Heterodimer, das dem MHC-Klasse-II-Molekül sehr ähnelt (Blum et al., 2013). Nach der Entfernung von CLIP können die im späten Endosom vorhandenen Peptide an das MHC-Klasse-II-

Molekül binden. HLA-DM entfernt zudem Peptide, die mit einer niedrigen Affinität an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden sind (Blum et al., 2013). In Zellen, die kein HLA-DM besitzen, kommt es zu einer langsameren Dissoziation von CLIP und auch zur Bindung von Peptiden mit niedriger Affinität (Blum et al., 2013, Unanue et al., 2016).

Beladene MHC-Klasse-II-Moleküle werden gemeinsam mit anderen Bestandteilen des späten Endosoms mithilfe des Vesikeltransportsystems an die Oberfläche gebracht (Neefjes et al., 2011). Der Abbau von MHC-Klasse-II-Peptidkomplexen auf der Zelloberfläche erfolgt mithilfe von Ubiquitin-Markierungen (Shin et al., 2006, van Niel et al., 2006). Die Aktivierung von DC kann zur Verringerung der Ubiquitinylierung von MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Zelloberfläche führen, was eine verlängerte Verweildauer der Moleküle auf der Zelloberfläche bewirkt und somit die Wahrscheinlichkeit der Antigenerkennung durch T-Zellen erhöht (Rabenstein et al., 2014).

3.3.2 Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-II-Molekülen

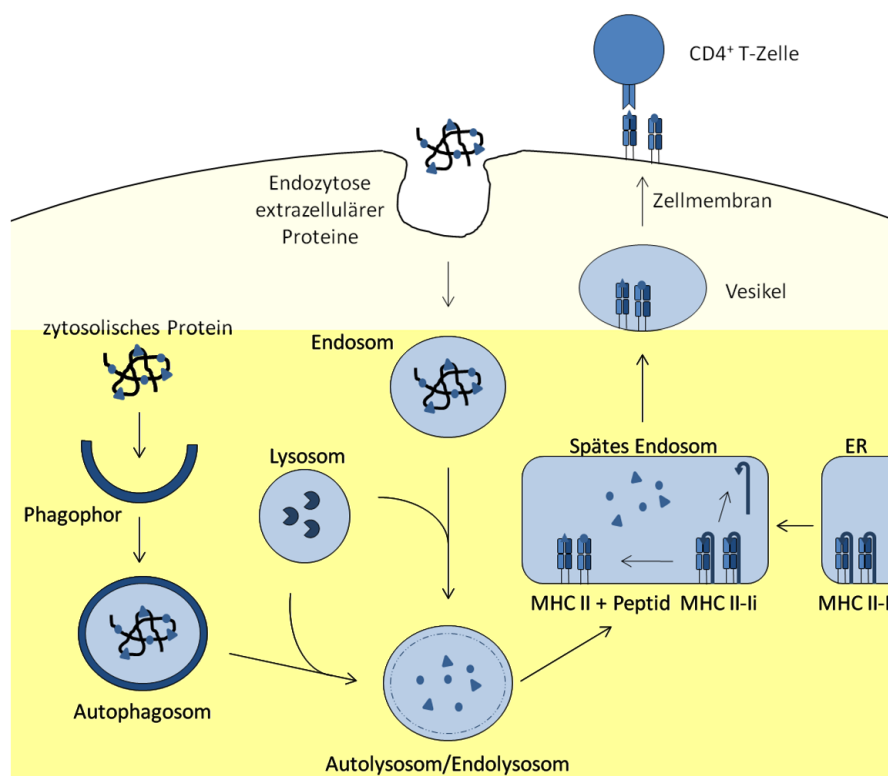


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Prozessierung und Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-II-Molekülen. MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC II) werden in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, wo sie an die Invariante Kette (Ii) binden und durch Ii über den Golgi Apparat in Endosomen dirigiert werden. Dort wird Ii gespalten, sodass Peptide an MHC-Klasse-II-Molekülen binden können. Diese Peptide stammen entweder von intrazellulären Proteinen, die über den Einschluss in Autophagosomen ins vesikuläre Kompartiment gelangen, oder von extrazellulären Proteinen, die über Endozytose aufgenommen wurden. In beiden Fällen werden die aufgenommenen Proteine durch lysosomale Proteasen gespalten und die Spaltprodukte auf MHC-Klasse-II-Moleküle geladen und anschließend an die Zelloberfläche transportiert. Dort kann der MHC-Klasse-II-Molekül-Peptid-Komplex durch CD4⁺ T-Zellen erkannt werden.

In Abbildung 2 ist schematisch die Prozessierung von Antigenen und die Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen dargestellt.

Lange Zeit wurde angenommen, dass nur durch Endozytose oder Phagozytose aufgenommene, exogene Antigene auf MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden. Mittlerweile konnte vielfach gezeigt werden, dass auch endogene Proteine via Autophagie in den Prozessierungs- und Präsentationsweg für MHC-Klasse-II-Moleküle gelangen können (Brazil et al., 1997, Nimmerjahn et al., 2003, Paludan et al., 2005, Dengjel et al., 2005, Clement et al., 2016).

Verschiedenen Schätzungen zufolge stammen zwischen 20 und 55 % der auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentierten Antigene von endogenen Proteinen (Roche and Furuta, 2015, Stern and Santambrogio, 2016). In DC, B-Zellen und Epithelzellen konnte ein konstanter, nicht stress-induzierter Abbau von endogenen Proteinen durch Autophagie nachgewiesen werden (Schmid et al., 2007).

3.3.2.1 Autophagie

Neben dem Proteasom ist Autophagie der zweite Haupt-Mechanismus für den Proteinabbau in Zellen. Der Prozess des „Selbst-Verdaus“ ist abhängig von Lysosomen, das sind Proteasen-enthaltende Vesikel mit niedrigem pH-Wert (Levine and Kroemer, 2008, He and Klionsky, 2009, Münz, 2016). Autophagie ist wichtig für die Zell-Homöostase, da sie zum einen Proteine in ihre Bestandteile aufspaltet und für die Biosynthese wieder zur Verfügung stellt. Zum anderen spielt Autophagie eine Rolle in der zellulären Stressantwort, in der Eliminierung von Pathogenen und in der Bereitstellung von Peptiden für Antigenpräsentation.

Autophagie ist ein evolutionär konservierter Prozess, der stark reguliert wird, und bei Dysfunktion zu Krankheiten wie z.B. Krebs, Neurodegeneration oder Infektionen führen kann (Levine and Kroemer, 2008, He and Klionsky, 2009, Choi et al., 2013). Man unterscheidet drei verschiedene Formen der Autophagie: Makroautophagie, Chaperon-assoziierte Autophagie und Mikroautophagie. Sie unterscheiden sich darin, auf welchem Weg die Proteine in Lysosomen gelangen (Levine and Kroemer, 2008).

Makroautophagie

Makroautophagie basiert auf der Ausbildung einer Doppelmembran zu einem Vesikel, dem Autophagosom, und der anschließenden Fusion mit dem Lysosom zum Autolysosom. Makroautophagie macht den größten Teil der autophagosomalen Prozesse in Zellen aus und wird daher häufig synonym als Autophagie bezeichnet (Levine and Kroemer, 2008). Der autophagosomale

Abbau von Bakterien wird Xenophagie, von Mitochondrien Mitophagie und von Peroxisomen Pexophagie genannt (Mizushima et al., 2011).

Makroautophagie wird auf mehreren Ebenen unter anderem durch verschiedene Atg-Proteine (*autophagy-related genes*; Autophagie-assoziierte Gene) reguliert (Mizushima et al., 2011).

Die Initiation der Phagophor-Bildung beginnt mithilfe des ULK-Komplexes, der aus einer ULK-Protease (ULK1 oder ULK2), Atg13, FIP200 und Atg101 besteht (Kaur and Debnath, 2015). An der Doppelmembran, deren Herkunft bisher nicht eindeutig festgestellt werden konnte (Deretic et al., 2013), aktiviert der ULK-Komplex den Klasse III PI3-Kinase-Komplex, bestehend aus Beclin1, Vps15, Vps34 und Atg14L (Mizushima et al., 2011). Dies führt zur Phosphorylierung von Phosphatidyl-Inositol in der Membran, welche essentiell für die weitere Bindung der Atg-Proteine und die Elongation der Membran ist (Glick et al., 2010).

Zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme regulieren die weiteren Schritte der Initiation der Makroautophagie. Das erste dieser Systeme bedingt die Elongation der Membran und entsteht durch die Konjugation von Atg12 an Atg5 mithilfe von Atg7, einem E1-ähnlichen Aktivierungsenzym, und Atg10, einem E2-artigen Überträger-Molekül. Sobald Atg12 und Atg5 aneinander gebunden sind, können Atg16L-Dimere binden, sodass sich Multimere bilden (Glick et al., 2010).

Im zweiten Regulationsmechanismus wird das Protein LC3 (*light chain 3*; leichte Kette 3) schrittweise prozessiert. Hierfür wird LC3 zunächst durch die Protease Atg4 zu LC3-I gespalten. Das E1-ähnlich Aktivierungsenzym Atg7 überträgt LC3-I an Atg3, einem E2-artigen Überträger-Molekül. Dieses konjugiert Phosphatidylethanolamin an LC3-I, dadurch wird es zum LC3-II (Glick et al., 2010). Der Atg12-Atg5-Atg16L-Komplex bedingt das Einfügen des LC3-II in die Doppelmembran (Münz, 2009).

Man unterscheidet zwischen selektiver und nicht-selektiver Makroautophagie. Bei der selektiven Makroautophagie kommt es im nächsten Schritt zur Substrat-Erkennung und -Bindung in das sich bildende Autophagosom. Die Selektivität wird bedingt durch autophagosomale Adaptermoleküle, die einerseits ein Substrat mithilfe von spezifischen Bindedomänen und andererseits LC3 mithilfe von LC3-Interaktionsregionen binden können (Boyle and Randow, 2013, Kaur and Debnath, 2015). Als autophagosomale Adaptermoleküle im Menschen wurden bisher die Proteine p62/Sequestosome1 (Bjørkøy et al., 2005), NBR1 (Kirkin et al., 2009), Optineurin (Wild et al., 2011), NDP52 (Thurston et al., 2009) und TAX1BP1 (Verstrepen et al., 2011) beschrieben. Alle bisher identifizierten Adaptermoleküle können ubiquitinyliertes Substrat mithilfe verschiedener Ubiquitin-Binderegionen binden (Boyle and Randow, 2013). NDP52 kann darüber hinaus das bakterielle

Strukturprotein Galectin binden und trägt somit zum selektiven Abbau von Bakterien bei (Boyle and Randow, 2013).

In der nicht-selektiven Makroautophagie werden die Bestandteile des Zytosols, die sich im Umkreis des sich bildenden Autophagosoms befinden, umschlossen (Levine and Kroemer, 2008).

Nach der Aufnahme von Substrat in Autophagosomen fusionieren diese mit Lysosomen zu Autolysosomen. Lysosomen besitzen eine einfache Lipidmembran, einen sauren pH-Wert und enthalten verschiedene Proteasen (Perera and Zoncu, 2016). Bisher wurden etwa 60 Proteasen identifiziert und es wird angenommen, dass noch einige unbekannt sind (Perera and Zoncu, 2016). Während einige Proteasen unerlässlich sind für die Prozessierung von Antigenen und des teilweisen Abbaus der Invarianten Kette, scheinen andere Proteasen redundante Funktionen zu haben (Unanue et al., 2016). Die Aktivität der Proteasen wird durch den pH-Wert reguliert (Kaminsky and Zhivotovsky, 2012).

Autophagolysosomen fusionieren mit Endosomen, wo die entstandenen Peptide an MHC-Klasse-II-Moleküle binden können (Vyas et al., 2008).

Chaperon-assoziierte Autophagie

Chaperon-assoziierte Autophagie (CMA; *chaperone-mediated autophagy*) ist eine gerichtete Form der Autophagie. Dabei werden Proteine anhand einer Signalsequenz gezielt durch das konstitutive Hsc70 (*heat-shock-protein 70*) Chaperon erkannt und gebunden (Dice, 1990). Die Signalsequenz ist ein Peptidpentamer und wird allgemein mit KFERQ bezeichnet, kann aber auch andere Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften enthalten (Cuervo and Wong, 2014).

Der Chaperon-Substrat-Komplex interagiert mit dem Membranprotein LAMP2a (*lysosome-associated membrane proteins 2a*) an der Oberfläche von Lysosomen. Durch die Interaktion multimerisiert LAMP2a zu einem Translokationskomplex. Das Ziel-Protein wird, vermutlich mithilfe von Hsc70 und Ko-Chaperonen, entfaltet (Cuervo and Wong, 2014) und anschließend in das Lumen des Lysosoms transportiert (Tasset and Cuervo, 2016). Dort kommt es zum Abbau des Proteins durch lysosomale Proteasen.

Mikroautophagie

Als Mikroautophagie wird der Prozess der Invagination der lysosomalen Membran bezeichnet. Dabei kommt es zum Ausbilden einer nach innen gestülpten Membran, die sich zu einem Vesikel abschließt. Hierbei werden zytosolische Proteine in das Innere des Lysosoms aufgenommen. Im Lysosom wird der Vesikel enzymatisch aufgespalten (Mijaljica et al., 2011, Sahu et al., 2011, Li et al.,

2012). Der Prozess der Mikroautophagie ist bisher nicht gut untersucht und verstanden. Erkenntnisse über Mikroautophagie stammen hauptsächlich aus Untersuchungen in Hefe und bisher ist unklar, in wieweit Mikroautophagie in humanen Zellen stattfindet (Li et al., 2012).

3.3.2.2 Regulation von Autophagie durch mTOR

Die Proteinkinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) reguliert Proteinsynthese, Wachstum, Überleben und Metabolismus in Zellen (Shor et al., 2009). Die Kinase mTOR kann in zwei verschiedenen Komplexen vorkommen, mTORC1 und mTORC2, die sich in ihrer Zusammensetzung und ihren Funktionen unterscheiden (Dowling et al., 2010b, Mizushima et al., 2011).

mTORC1 beeinflusst Autophagie, Translation, Ribosom-Synthese und Transkription und wird selbst durch Wachstumsfaktoren, Nährstoffmangel und Hypoxie reguliert. mTORC2 wird durch Wachstumsfaktoren reguliert und moduliert das Zytoskelett (Guertin and Sabatini, 2007). mTORC2 aktiviert Akt, diese Kinase wiederum inhibiert TSC1/2, welche negative Regulatoren von Rheb sind, einem Aktivator von mTORC1. mTORC2 ist mithilfe von Akt daher in der Lage, indirekt mTORC1 zu aktivieren (Guertin and Sabatini, 2007, O'Farrell et al., 2013).

mTORC1 ist ein Negativ-Regulator der Autophagie und wird auf mehrere Arten reguliert. Zum einen inhibiert AMPK mTORC1 Nährstoff-abhängig durch Phosphorylierung. Zudem aktiviert AMPK TSC1/2, was zu einer weiteren Inhibition von mTORC1 führt (O'Farrell et al., 2013). Da mTORC1 ein negativer Regulator von ULK ist (Ganley et al., 2009, Hosokawa et al., 2009, Jung et al., 2009), einem essentiellen Teil des Initiator-Komplexes der Autophagie, führt die Inhibition von mTORC1 zur De-Repression von ULK und somit zur Initiation von Autophagie (Gallagher et al., 2016).

mTOR wird weiterhin vom *Inside-Out Mechanism* (von Innen nach Außen-Mechanismus) in der lysosomalen Membran reguliert (Zoncu et al., 2011). In Abhängigkeit von der Anwesenheit von Aminosäuren wird mTORC1 an lysosomalen Membranen mithilfe von verschiedenen Proteinen rekrutiert und aktiviert (Puertollano, 2014, Gallagher et al., 2016). Ist die Menge an Aminosäuren im Lysosom hoch, so befindet sich mTORC1 an der Membran, wo der Komplex aktiviert wird und seinerseits unter anderem ULK inhibiert. Bei Nährstoffmangel wird mTORC1 nicht aktiviert, was zur De-Repression von ULK und somit zur Initiation der Autophagie führt. Zusätzlich kommt es zu einer erhöhten Biogenese von Lysosomen und zur verstärkten Ansäuerung in Lysosomen (Puertollano, 2014).

3.4 Fragestellung

Die Prozessierung und Präsentation von Antigenen ist wichtiger Bestandteil des Immunsystems. Während über die verschiedenen Schritte der Antigenprozessierung und -präsentation relativ viel bekannt ist, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, woher Antigene stammen, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. Daher gibt es verschiedene Modelle, die versuchen, den Ursprung von Antigenen zu erklären. In dieser Arbeit sollten zwei aktuelle Theorien zur Quelle von Antigenen auf ihre Anwendbarkeit in der Präsentation von Modellantigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen hin untersucht werden.

Im Sinne der DRiP-Hypothese sollte analysiert werden, ob fehlgefaltete Proteine zur Präsentation von Antigenen beitragen. Hierfür wurde mithilfe des Modellantigens CFTR und der Mutante CFTR Δ F508 untersucht, ob diese als Antigene präsentiert werden und ob das Entfernen des Modellantigens aus dem DRiP-Pool einen Einfluss auf die Antigenpräsentation hatte.

Die zweite Theorie zur Quelle von Antigenen, die untersucht werden sollte, war die der nukleären Translation von prä-mRNA. Mithilfe des Modellantigens BZLF1 und verschiedenen Mutanten wurde untersucht, ob Hinweise für diese Theorie gefunden werden können. Darüber hinaus sollte der Einfluss der Stabilität von mRNA auf die Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen anhand des Modellantigens BZLF1 untersucht werden.

Durch Autophagie werden endogene Proteine abgebaut und Peptide für die Präsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen generiert. Die Charakteristika, die die Auswahl der Antigene bestimmt, sind bisher unbekannt. Daher wurden anhand des Modellantigens Neomycin Phosphotransferase II (NeoR) untersucht, welche Eigenschaften eine Präsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen fördern.

Der Regulation der Autophagie ist größtenteils verstanden, unklar ist jedoch, ob für die Generierung von Antigenen für die Präsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen eine spezifisch regulierte Form der Autophagie existiert. Dazu wurde zum einen analysiert, welchen Einfluss verschiedene Komponenten der Autophagie auf die Antigenpräsentation haben. Zum anderen wurde untersucht, ob der Autophagie-Regulator mTOR einen Einfluss auf das Entstehen von Antigenen hat.

4. Material

4.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
AZD8055	Selleckchem
β -Mercaptopethanol	Sigma-Aldrich
Bacto-Agar	Invitrogen
Bovines Serum Albumin (BSA)	BioFroxx
Bromphenolblau (1 %)	Merck
CFTR-F508del Corrector II Corr4a	Merck Calbiochem
Chloroform	Merck
Chloroquin	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Desoxycholsäure (DOC)	Sigma-Aldrich
Doxycyclin	Sigma-Aldrich
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck
Ethanol	Merck
Everolimus	Selleckchem
Glycerin	Appllichem Panreac
Glycin	Merck
Glucose	Merck
Hydrogenperoxid 30 %	Roth
Imidazol	Appllichem Panreac
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Komposition LB-Broth (Hefeextrakt, Trypton, NaCl)	Sigma-Aldrich
KU-55933	Selleckchem
KU-63794	Selleckchem
Leupeptin	Roche Diagnostics
Luminol	Santa Cruz Biotechnologies
Magermilchpulver	Appllichem Panreac
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Appllichem Panreac
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Sigma-Aldrich
Methanol	Merck
Natrium-Acetat	Merck
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Alfa Aesar
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Nonidet P-40 (NP-40)	ICN Biochemical Industries
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich
Phenol	Roth
Polyacrylamid (PAA) 30	Roth
Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat (Tween-20)	Sigma-Aldrich
PP242	Selleckchem
<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>	Roche Diagnostics
Phytohämagglutinin (PHA)	Murex
Rapamycin	Selleckchem

SBI0206965	Selleckchem
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck
Spautin1	Merck Calbiochem
Sucrose	Merck
Torin1	Selleckchem
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma-Aldrich
Vecta-Shield with DAPI	Vector Laboratories Inc.
VX-809 (Lumacoftor)	Selleckchem
Wortmannin	Selleckchem

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien in der Qualität p.A. verwendet. Nicht weiter angegebene Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth oder Sigma-Aldrich bezogen. Einige zusätzliche Bezugsquellen werden im Methodenteil angegeben.

4.2 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Gerät	Whatman Horizon 20-25
Bestrahlungsanlage	Gammacell 40 der Firma AECL mit Cäsium-137 (γ -Strahler)
Brutschrank	Hera Cell 150
Eismaschine	Scotsman
ELISA-Lesegerät	Tecan
ELISA-Waschgerät	Tecan
FACS Canto	Becton Dickinson
Falcon-Roller	Coulter Electronics Limited
Gefrierschrank -80°C	Colora bzw. Thermo
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Kühlschrank	Liebherr
Konfokalmikroskop	Leica
Lichtmikroskop / Axioskop	Zeiss
LightCycler 480 II	Roche
Nanodrop Spektrometer	Peqlab
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
pH-Messgerät	Knick
PCR-Machine	Perkin Elmer
Pipetten	Eppendorf, VWR, Rainin, Gilson
Pipettierhilfe, elektrisch	Integra Biosciences
Reinstwasser-Anlage	Millipore
Schüttelinkubator	Eppendorf
SDS-Gelelektrophorese-Gerät	Hofer
Spannungsquellen	BioRad
Sterilwerkbank	Hera Safe
Ultraschall-Wasserbad	Diagenode
Vortexer Genie 2	Scientific Industries
Zentrifugen	Beckman, Eppendorf, Hettich, Sorvall und Thermo

4.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
AIM-V	Invitrogen
DMEM	Invitrogen
ECL Plus Western Blotting Detection	GE Healthcare
ELISA-Platten	Corning Incorporated
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Development System Human IFN γ , GM-CSF	Mabtech
Eppendorf Reagenzgefäße 0,5/1,5/2 mL	Eppendorf
FACS-Röhrchen	Micronic, Sarstedt
Filter 0,22 μ m	Millipore
Fötale Kälberserum; FCS	PAA
Fungizone, Amphotericin B 250 μ g/mL	Gibco
Gentamycin	Gibco
Gestopfte Pipettenspitzen	ART molecular Bioproducts
HEPES	Gibco
Humanes Serum	aus peripherem Blut freiwilliger humaner Spender
Interleukin-2	Novartis
Kryoröhrchen	Nunc
L-Glutamin, 200 mM	Gibco
Lochplatten	Nunc, 4titude
MACS Säulen LS	Miltenyi Biotec
Natriumpyruvat	Gibco
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Gibco
OptiMEM	Invitrogen
Pancoll	Pan Biotech
Parafilm „M“	American National Can
Polystyren-Zellkulturschalen	BD-Falcon
Reaktionsgefäße (15 und 50 mL)	BD-Falcon
Röntgenfilm	Agfa Healthcare und Amersham GE Healthcare
RPMI 1640	Invitrogen
SYBR green QuantiNova	Quiagen
Trypanblau	Gibco
Zellkulturflaschen	Greiner-Bio-One
Zellkulturplatten	BD-Falcon

4.4 Allgemeine Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Puffer

Puffer	enthält
PBS (<i>Phosphate-buffered saline</i>)	154 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBS-T	PBS 0,05 % Tween-20
TBS (<i>Tris-buffered saline</i>)	50 mM Tris

	150 mM NaCl
TBS-T	TBS 0,05 % Tween
TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	40 mM Tris 5 mM Acetat 1 mM EDTA
TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)	10 mM Tris 2 mM EDTA pH 8,0

4.5 Zellen

4.5.1 Antigen-präsentierende Zelllinien

Zur Herstellung der lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) LCL1.11 und GBW3 wurden humane B-Zellen in vitro mit dem EBV-Stamm B95.8 infiziert. Bei DG75 (EBV-negativ) handelt es sich um eine etablierte Suspensionszelllinie, die aus einem Burkitt-Lymphom abstammt. Die adhärente Zelllinie HEK293T wurde aus embryonalen Nierenzellen etabliert und enthält das große T-Antigen von SV40. Diese Zelllinie stammt aus dem Labor von Professor Hoborn der Universität Gießen. Das Vorhandensein des großen T-Antigens von SV40 wurde mithilfe von PCR überprüft.

Tabelle 5: HLA-Typisierung der verwendeten Zelllinien

Name	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1*	HLA-DQ	HLA-DPB1*	weitere HLA-DRB Allele
DG75	0201, 6601	4101, 5001	0602, 1701	0404, 1301	A1*0103, 0303 B1*0402, 0603	0401	3*0101 4*0103
GBW3	0101	1501, 37	0304, 0602	1101, 1301	A1*0103, 0501 B1*0301, 0603	0401, 0402	3*0202
LCL 1.11	0201, 6601	1801, 4102	1203, 1701	1303, 1501	A1*0102, 05FE B1*0301, 0602	0301, 0402	3*0101 5*0101
HEK293T	0201	0702			0602		5*0101

4.5.2 T-Zellen

Es wurden unterschiedliche T-Zellklone bekannter Spezifität verwendet, die wie beschrieben etabliert worden waren (Mautner et al., 2004).

Tabelle 6: Verwendete T-Zellen

Name	Erkanntes Antigen	HLA-Restriktion	Epitop	Art
FL #4 CD8 ⁺	EBV BZLF1	HLA-B*0801	AA ₁₉₀₋₁₉₇ -RAKFKQLL-	Klon
GB VQT #2 CD8 ⁺	EBV BZLF1	HLA-B*1501	AA ₁₂₂₋₁₃₁ -VQTAAAVVF-	Klon
JM LLW CD8 ⁺	EBV LMP2A	HLA-A*0201	AA ₃₂₈₋₃₃₇ -LLWTLVLL-	Linie
YVL CD8 ⁺	EBV BRLF1	HLA-A*0201	AA ₁₀₉₋₁₁₇ -YVLDHLIVV-	Linie/ Klon
20-4/A4 CD4 ⁺	Neomycin Phosphotransferase II	HLA- DPB1*0301	AA ₂₁₆₋₂₂₉ - DRYQDIALATRDIA-	Klon

4.5.3 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien wurden bei einer Temperatur von 4°C gelagert. Sofern die Medien Serum enthielten, wurden diese bis zu zwei Wochen nach Anbruch verwendet. Serum wurde bei einer Temperatur von -20°C gelagert, alle anderen Zusätze den Hersteller-Angaben entsprechend.

Tabelle 7: Verwendete Zellkultur-Reagenzien

Medium	enthält
Einfriermedium	90 % FCS 10 % DMSO
LCL-Medium (RPMI 1640-Komplettmedium)	RPMI 1640 10 % FCS 1,25 µg/mL Fungizone (Amphotericin B) 50 µg/mL Gentamycin 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren
Polyethylenimin (PEI)	1mg/mL in Wasser; pH 7,0
DMEM-Medium	DMEM 10 % FCS 1,25 µg/mL Fungizone (Amphotericin B) 50 µg/mL Gentamycin 2 mM L-Glutamin
T-Zell-Medium [+/- Interleukin-2 (IL-2)]	AIM-V 10 % Humanserum (Hitze-inaktiviert) 1,25 µg/mL Fungizone (Amphotericin B) 2 mM L-Glutamin 10 mM HEPES optional 10 U/mL IL-2
Waschmedium	RPMI 1640-Medium ohne Zusätze
Minimalmedium	OptiMEM ohne Zusätze

4.6 Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden *Escherichia coli* K12 Bakterien mit dem entsprechenden Plasmid transformiert und kultiviert. Die verwendeten Bakterienstämme *Escherichia coli* XL1-blue MRF' (Stratagene), STBL4 (Life Technologies) und DH10B (Gibco BRL) wurden auf Fest- oder in Flüssigmedium kultiviert.

Tabelle 8: Verwendete Bakterienmedien

Medium	enthält
LB Medium	10 g/L NaCl 10 g/L Trypton 5 g/L Hefe-Extrakt pH 7,0
LB Agar	LB-Medium 20 g/L Bacto-Agar pH 7,0
Superbroth-Medium	35 g/L Trypton 20 g/L Hefeextrakt 5 g/L NaCl 5 mL/L 1 N NaOH
SOB-Medium	20 g/L Trypton 5 g/L Hefe-Extrakt 0,5 g/L NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄
SOC-Medium	SOB 0,2 % Glucose sterilfiltriert (22 µm)
Einfriermedium	LB-Medium 30 % Glycerin

4.7 Plasmide

Bei Plasmiden, die pCMV in der Bezeichnung tragen, befindet sich das danach folgende Gen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Dieses Plasmid enthält zudem ein Gen, das eine Ampicillin-Resistenz vermittelt, und das Gen *NeoR*. Bei den mit pCMV-s bezeichneten Plasmiden handelt es sich um eine verkleinerte Version des vorher beschriebenen Plasmids, die das Gen *NeoR* nicht enthält.

Bei Plasmiden, die mit pEBOpuro bezeichnet sind, sind das nachfolgende Gen und die Selektionsmarker NGFR und GFP unter der Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren, bidirektionalen

Promotors. Zusätzlich tragen diese Plasmide das Puromycin-Resistenzgen und enthalten die den plasmidalen Replikationsursprung oriP des Epstein-Barr-Virus (EBV), das den Verbleib des Plasmids als Episom in EBV-positiven Zellen gewährleistet.

Tabelle 9: Verwendete Plasmide

Name	Eigenschaft	Herstellung
pCMV-cyto	Leervektor	Arbeitsgruppe
pCMV-s-cyto	reduzierter Leervektor	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1-EHis	gDNA von BZLF1 mit EBNA1- und His-Markierung	Arbeitsgruppe
pCMV-BZLF1-2AI-Ehis	BZLF1 mit EBNA1- und His-Markierung; LMP2A-Epitop1 in Intron 1 eingefügt	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1-2AI ^{Δf} -Ehis	BZLF1 mit EBNA1- und His-Markierung; LMP2A-Epitop-1 mit nachfolgender Leserasterverschiebung in Intron 1	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1- ^{Δf} 2AI-Ehis	BZLF1 mit EBNA1- und His-Markierung; LMP2A-Epitop-1 mit vorangehender Leserasterverschiebung in Intron 1	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1- ^{Δff} 2AI-Ehis	BZLF1 mit EBNA1- und His-Markierung; LMP2A-Epitop-1 mit zwei vorangehenden Leserasterverschiebungen in Intron 1	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1-2AI-SPLmut-Ehis	BZLF1 mit EBNA1- und His-Markierung; LMP2A-Epitop-1 in Intron 1 eingefügt, mit mutierten Spleiß-Sequenzen	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1-2AI ^{Δf} -SPLmut-Ehis	BZLF1 mit EBNA1- und His-Markierung; LMP2A-Epitop-1 mit nachfolgender Leserasterverschiebung in Intron 1, mit mutierten Spleiß-Sequenzen	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1- ^{Δf} 2AI-SPLmut-Ehis	BZLF1 mit EBNA1- und His-Markierung; LMP2A-Epitop-1 mit vorangehender Leserasterverschiebung in Intron 1, mit mutierten Spleiß-Sequenzen	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1- ^{Δff} 2AI-SPLmut-Ehis	BZLF1 mit EBNA1- und His-Markierung; LMP2A-Epitop-1 mit zwei vorangehende Leserasterverschiebungen in Intron 1, mit mutierten Spleiß-Sequenzen	vorliegende Arbeit
pCMV-CFTR-cdo-DDE-YVL-EHis*	Codon-optimiertes CFTR mit DDE-, YVL-, EBNA1- und His-Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-CFTR-cdo-DDE-YVL-GFP*	Codon-optimiertes CFTR mit DDE-, YVL- und GFP-Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-CFTR-cdo*	Codon-optimiertes, ohne Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-CFTR-cdo-3xYVL-EHis*	Codon-optimiertes CFTR mit 3 YVL-, sowie EBNA1- und His-Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-s-CFTR-cdo-DDE-YVL-EHis*	Codon-optimiertes CFTR mit DDE-, YVL-, EBNA1- und His-Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-s-CFTR-cdo-DDE-YVL-GFP*	Codon-optimiertes CFTR mit DDE-, YVL- und GFP-Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-s-CFTR-cdo-3xYVL-EHis*	Codon-optimiertes CFTR mit 3 YVL-, und jeweils 1 EBNA1- und His-Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-CFTR-cdo-508F-DDE-YVL-EHis*	Codon-optimiertes CFTR mit ΔF508 Mutation mit DDE-, YVL-, EBNA1- und His-Markierung	vorliegende Arbeit

pCMV-CFTR-cdo-508F-DDE-YVL-GFP*	Codon-optimiertes CFTR mit Δ F508 Mutation mit DDE-, YVL- und GFP-Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-CFTR-cdo-508F*	Codon-optimiertes CFTR mit Δ F508 Mutation, ohne Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-CFTR-cdo-508F-3xYVL-EHis*	Codon-optimiertes CFTR mit Δ F508 Mutation mit 3 YVL- und EBNA1- und His-Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-s-CFTR-cdo-508F-DDE-YVL-EHis	Codon-optimiertes CFTR mit Δ F508 Mutation mit DDE-, YVL-, EBNA1- und His-Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-s-CFTR-cdo-508F-DDE-YVL-GFP*	Codon-optimiertes CFTR mit Δ F508 Mutation mit DDE-, YVL- und GFP-Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-s-CFTR-cdo-508F-3xYVL-EHis*	Codon-optimiertes CFTR mit Δ F508 Mutation mit 3 YVL- und jeweils EBNA1- und His-Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-HLA-B0801	HLA-B0801	Arbeitsgruppe
pCMV-HLA-B1501	HLA-B1501	Arbeitsgruppe
pCMV-s-HLA-DPB1-0301	HLA-DPB1-0301	vorliegende Arbeit
pCMV-s-NeoR	Neomycin Phosphotransferase II (NeoR) mit angefügtem YVL-Epitop, EBNA1-Epitop und sechsfacher Histidin-Markierung	Arbeitsgruppe
pCMV-s-NeoRmut	NeoR mit mutierten CKST-Aminosäuren mit angefügtem YVL-Epitop, EBNA1-Epitop und sechsfacher Histidin-Markierung	Masterarbeit von Kati Böhm
pCMV-s-NeoR-RN	78 AS-großes C-Terminales Fragment von NeoR mit angefügtem YVL-Epitop, EBNA1-Epitop und sechsfacher Histidin-Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-s-NeoRmut-RN	78 AS-großes C-Terminales Fragment von NeoR mit mutierten CKST-Aminosäuren mit angefügtem YVL-Epitop, EBNA1-Epitop und sechsfacher Histidin-Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-s-NeoR-RA	56 AS-großes C-Terminales Fragment von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin	vorliegende Arbeit
pCMV-s-Li+DRY	Invariante Kette fusioniert an 14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+NeoR(15)	14 AS-großes DRY-Epitop und zusätzlich 15 AS aus NeoR mit vorangestelltem Methionin	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+NeoR(30)	14 AS-großes DRY-Epitop und zusätzlich 30 AS aus NeoR mit vorangestelltem Methionin	vorliegende Arbeit
pCMV-s-NeoR(55)-DRY	70 AS-großes Fragment von NeoR mit vorangestelltem Methionin	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+A(15)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 15 Alanine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+A(10)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 10 Alanine	vorliegende Arbeit

pCMV-s-DRY+A(5)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 5 Alanine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-A(15)+DRY	15 Alanine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-A(10)+DRY	10 Alanine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-A(5)+DRY	5 Alanine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+E(15)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 15 Asparaginsäuren	vorliegende Arbeit
pCMV-s-E(15)+DRY	15 Asparaginsäuren mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+E(15)H(6)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Asparaginsäuren fusioniert an 15 Valine und sechs Histidine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+F(15)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 15 Phenylalanine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+G(15)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 15 Glycine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+G(10)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 10 Glycine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+G(5)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 5 Glycine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-G(15)+DRY	15 Glycine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-G(10)+DRY	10 Glycine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-G(5)+DRY	5 Glycine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+GE(15)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an die Aminosäurenabfolge GEGGGGEGGGGEGGG	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+GF(15)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an die Aminosäurenabfolge GFGGGGFGGGGFGGG	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+GS(15)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an die Aminosäurenabfolge	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+GQ(15)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an die Aminosäurenabfolge	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+GR(15)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an die Aminosäurenabfolge	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+H(15)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 15 Histidine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+L(15)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 15 Leucine	vorliegende Arbeit

pCMV-s-DRY+L(10)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 10 Leucine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+L(5)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 5 Leucine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-L(15)+DRY	15 Leucine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-L(10)+DRY	10 Leucine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-L(5)+DRY	5 Leucine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+Q(15)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 15 Glutamine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-Q(15)+DRY	15 Glutamine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+R(15)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 15 Arginine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+R(10)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 10 Arginine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+R(5)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 5 Arginine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-R(15)+DRY	15 Arginine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-R(10)+DRY	10 Arginine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-R(5)+DRY	5 Arginine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+S(15)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 15 Serine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+S(10)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 10 Serine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+S(5)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 5 Serine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-S(15)+DRY	15 Serine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-S(10)+DRY	10 Serine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-S(5)+DRY	5 Serine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+V(15)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 15 Valine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+V(10)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 10 Valine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+V(5)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 5 Valine	vorliegende Arbeit
pCMV-s-V(15)+DRY	15 Valine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-V(10)+DRY	10 Valine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit

pCMV-s-V(5)+DRY	5 Valine mit vorangestelltem Methionin fusioniert an das 14 AS-große DRY-Epitop von NeoR	vorliegende Arbeit
pCMV-s-DRY+V(15)H(6)	14 AS-großes DRY-Epitop von NeoR mit vorangestelltem Methionin fusioniert an 15 Valine gefolgt von sechs Histidinen	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1+IFN- γ -3'UTR-EHis	BZLF1 mit EBNA1- und His-Markierung sowie IFN γ -3'UTR	Dissertation von B. M. Fiebiger
pCMV-BZLF1+IFN- γ -3'UTR-ARE1+2mut-EHis	BZLF1 mit mutierter IFN γ -3'UTR und EBNA1- und His-Markierung	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1+ β -Globin-3'UTR-EHis	BZLF1 mit EBNA1- und His-Markierung sowie β -Globin-3'UTR	Dissertation von B. M. Fiebiger
pEBOpuro-BZLF1-EHis-Tet-NGFR-GFP	BZLF1 mit EBNA1-His-Markierung und NGFR und GFP unter Tetracyclin-abhängigem Promotor; Puromycin-Resistenz und EBNA1-Expression	vorliegende Arbeit
pEBOpuro-BZLF1+IFN- γ -3'UTR-EHis-Tet-NGFR-GFP	BZLF1 mit IFN γ -3'UTR und EBNA1-His-Markierung und NGFR und GFP unter Tetracyclin-abhängigem Promotor; Puromycin-Resistenz und EBNA1-Expression	vorliegende Arbeit
pEBOpuro-BZLF1+IFN- γ -3'UTR-ARE1+2mut-EHis-Tet-NGFR-GFP	BZLF1 mit mutierten AU-reichen Elementen (ARE) in IFN γ -3'UTR und EBNA1-His-Markierung und NGFR und GFP unter Tetracyclin-abhängigem Promotor; Puromycin-Resistenz und EBNA1-Expression	vorliegende Arbeit
pEBOpuro-BZLF1+ β -Globin-3'UTR-EHis-Tet-NGFR-GFP	BZLF1 mit β -Globin-3'UTR und EBNA1-His-Markierung und NGFR und GFP unter Tetracyclin-abhängigem Promotor; Puromycin-Resistenz und EBNA1-Expression	vorliegende Arbeit
pEBOpuro-NeoRGFP	NeoR-GFP Fusionsprotein und NGFR unter Tetracyclin-abhängigem Promotor; Puromycin-Resistenz und EBNA1-Expression	vorliegende Arbeit

*Die Sequenz für das kodon-optimierte *CFTR* wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Rosenecker (Dr. von Haunersches Kinderspital, Ludwig Maximilians Universität, München) zur Verfügung gestellt.

4.8 Immunologische Reagenzien

Tabelle 10: Verwendete immunologische Reagenzien

Reagenz	enthält
ELISA-Färbelösung	50 % <i>TMB Substrate Reagent A</i> (BD) 50 % <i>TMB Substrate Reagent B</i> (BD)
ELISA-Blockpuffer	PBS 1 % BSA 5 % Sucrose 0,05 % NaN ₃
ELISA-Waschpuffer/ PBS-T	PBS 0,05 % Tween-20

ELISA-Stopplösung	2 M H ₂ SO ₄
FACS-Waschpuffer	PBS 2 % FCS 0,05 % NaN ₃
MACS-Puffer	PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA pH 7,2
<i>Reagent diluent</i> (RD-Puffer)	PBS 1 % BSA sterilfiltriert
SDS-Ladepuffer	0,15 M Tris pH 6,8 30 % Glycerin 0,03 % SDS 0,03 % β-Mercaptoethanol Bromphenolblau

4.8.1 Antikörper

Antikörper wurden nach Herstellerangaben in 1-3 % Western-Blot-Waschpuffer gelöst.

4.8.1.1 Primärantikörper

Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper

Erkanntes Antigen	Wirt	Isotyp	Anwendung	Bezugsquelle
6xHistidin	Maus	IgG	WB	Antikörper-Facility HMGU
α-Tubulin	Kaninchen	IgG	WB	Abcam
BZLF1	Ziege	IgG	WB	Santa Cruz Biotechnologies
CFTR	Maus	IgG	WB	Prof. Dr. Rosenecker
EBNA1	Ratte	IgG	WB	Antikörper-Facility HMGU
GAPDH	Maus	IgG	WB	Millipore
GFP	Ratte	IgG2	WB	Antikörper-Facility HMGU
NGFR	Maus	IgG	MACS	Antikörper-Facility HMGU

4.8.1.2 Sekundärantikörper

Tabelle 12: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Wirt	Bezugsquelle	gekoppelt an
anti-Maus	Schaf	Amersham	Peroxidase
anti-Maus	Ziege	Miltenyi Biotec	magnetische Kugeln
anti-Ziege	Esel	Santa Cruz Biotechnologies	Peroxidase
anti-Kaninchen	Ziege	Jackson	Peroxidase
anti-Ratte	Ziege	Jackson	Peroxidase

4.9 Proteinbiochemische Reagenzien

Tabelle 13: Verwendete Proteinbiochemische Reagenzien

Medium	enthält
10,5 % Polyacrylamid (PAA) Trenngel	10,5 % PAA 50 % 2 x Tris/SDS pH 8,8 (0,19 M Tris; 0,2 % SDS; H ₂ O) 0,085 % APS 0,085 % TEMED
8,0 % Polyacrylamid (PAA) Trenngel	8,0 % PAA 50 % 2 x Tris/SDS pH 8,8 (0,19 M Tris; 0,2 % SDS; H ₂ O) 0,085 % APS 0,085 % TEMED
4 % Polyacrylamid (PAA) Sammelgel	4 % PAA 50 % 2 x Tris/SDS pH 6,8 (62 mM Tris; 0,2 % SDS; H ₂ O) 0,06 % APS 0,06 % TEMED
Block-Puffer	PBS 5 % Magermilchpulver
ECL-Detektionslösung, selbst hergestellt	90 % ECL-Lösung A 9 % ECL-Lösung B 0,27 % H ₂ O ₂
ECL-Lösung A	H ₂ O 0,1 M Tris/HCl pH 8.6 0,056 mM Luminol
ECL-Lösung B	DMSO 0,137 mM para-Hydroxycoumarinsäure
Elutions-Puffer	Harnstoff-Lysepuffer 0,5 M Imidazol pH 7,5
Harnstoff-Lysepuffer	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 0,05 % Tween20 20 mM Imidazol pH 8,0
RIPA-Puffer	1 % NP40 0,5 % DOC 0,1 % SDS 0,15 M NaCl 5 mM EDTA 50 mM Tris pH 8,0 1 % <i>Protease Inhibitor Cocktail</i>
SDS-Gel-Laufpuffer	25 mM Tris 0,2 M Glycin

	0,1 % SDS
SDS-Gel-Ladepuffer	0,2 M Tris/HCl pH 6,8 8 % SDS 40 % Glycerin 0,4 M DTT 0,2 mM EDTA/NaOH pH 8,0 0,4 % Bromphenolblau
Western-Blot-Transferpuffer	25 mM Tris 0,2 M Glycin 20 % Methanol
Western-Blot-Waschpuffer	PBS 1 % Magermilchpulver

4.10 Autophagie- und mTOR-Inhibitoren

In dieser Arbeit wurden die Autophagie-Inhibitoren SBI0206965, 3-Methyladenin (3MA), KU55933 und Spautin1, die Inhibitoren lysosomaler Proteasen Chloroquin und Leupeptin, und die mTOR-Inhibitoren Rapamycin, Everolimus, PP242, Torin1, AZD8055 und KU63794 verwendet.

Die Initiation der Phagophor-Bildung wird durch SBI0206965 (Egan et al., 2015), das den ULK-Komplex inhibiert, oder durch 3MA (Seglen and Gordon, 1982), KU55933 (Hickson et al., 2004) oder Spautin1 (Liu et al., 2011), die alle negativ auf den Vps34-Komplex wirken, inhibiert. Leupeptin inhibiert lysosomale Proteasen (Aoyagi et al., 1969), was zu einer Akkumulation von Autolysosomen führt (Eskelinen, 2005). Chloroquin dagegen wirkt der Ansäuerung des Lysosoms und somit der Wirksamkeit einiger lysosomaler Enzyme entgegen (Steinman et al., 1983, Macintyre and Cutler, 1988). Die Wirkstoffe Torin1 (Thoreen et al., 2009), PP242 (Feldman et al., 2009), KU63794 (García-Martínez et al., 2009) und AZD8055 (Chresta et al., 2010) inhibieren beide mTOR-Komplexe, während Rapamycin (Edwards and Wandless, 2007) und Everolimus (Sedrani et al., 1998) nur mTORC1 inhibieren.

5. Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 DNA-Klonierung

DNA-Klonierung ist die Aneinanderreihung verschiedener Methoden, die zum Ziel hat, eine bestimmte DNA-Sequenz in ein Plasmid einzufügen. Als Vektoren dienen zumeist Plasmide, auf denen sich sogenannte *Multiple cloning sites* (MCS, Ansammlung von Restriktionsenzym-Schnittstellen) befinden. Diese MCS erlauben das spezifische Schneiden der DNA mithilfe von Restriktionsenzymen und das Einfügen der gewünschten DNA an dieser Stelle. Die einzufügende DNA muss entsprechend passend geschnitten werden, damit ein Einfügen und Schließen der Lücke, eine Ligation, mithilfe des Enzyms Ligase erfolgen kann.

5.1.1.1 Vervielfältigung von DNA-Sequenzen mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode, bei der mithilfe eines sich sequenziell wiederholenden Zyklus gezielt DNA-Sequenzen vervielfältigt werden.

Um eine bestimmte DNA-Sequenz zu amplifizieren, müssen zumindest die äußeren Bereiche der Basenabfolge bekannt sein. Zu beiden bekannten Enden der Sequenz werden komplementäre Oligonukleotide hergestellt, sogenannte *Primer*. Im ersten Schritt der PCR wird doppelsträngige DNA durch Erhitzung auf etwas weniger als 100°C denaturiert und somit einzelsträngig gemacht. Die komplementären Primer können sich dann im zweiten Schritt bei Temperaturen zwischen 55°C und 70°C durch komplementäre Basenpaarung an die Zielsequenz anlagern, wobei jeder Primer eine ideale Anlagerungs-Temperatur, die sogenannte Schmelz-Temperatur, besitzt. In einem dritten Schritt wird bei 72°C mithilfe einer thermostabilen DNA Polymerase der zwischen den Oligonukleotiden gelegene Abschnitt mit Nukleotiden komplementär zur Matrizen-Sequenz aufgefüllt. Diese drei Schritte werden in der Regel 30- bis 40-mal wiederholt und bei jedem Schritt verdoppelt sich idealerweise jede einzelsträngige DNA.

Die Schmelztemperatur (T_m) wurde für alle Oligonukleotide mithilfe der folgenden Formel berechnet:

$$T_m = 4 \times \sum G; C + 2 \times \sum A; T$$

Die Komponenten eines 100 µL Reaktionsansatzes wurden nach der Tabelle zusammen gemischt:

Tabelle 14: PCR-Ansatz

5x Reaktionspuffer	100 μL
Oligonukleotide sense (100 μM)	2 μL
Oligonukleotide anti-sense (100 μM)	2 μL
dNTPs (je 10 mM)	2 μL
DNA bzw. cDNA	0,01 μg
DMSO	5 μL
Phusion Polymerase	1 μL
H ₂ O	ad 100 μL

Um ein Verdampfen der Flüssigkeit im Laufe der Reaktion zu verhindern, wurde der Reaktionsansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Nach Ablauf der Zyklen wurde der gesamte Ansatz in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

5.1.1.2 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die aus Bakterien stammen und DNA an oder in der Nähe von spezifischen Erkennungssequenzen schneiden. Dabei entstehen entweder glatte Enden der DNA (*blunt ends*) oder DNA-Überhänge (*sticky ends*). Die Restriktionsenzyme erkennen eine spezifische Sequenz, die zumeist 4-8 Basenpaare lang ist.

Für das Schneiden von DNA wurden folgende Komponenten zu einem 20 μL - bzw. 100 μL -Ansatz zusammen gemischt:

Tabelle 15: Restriktionsenzym-Verdau

	20 μL Ansatz	100 μL Ansatz
10x Reaktionspuffer (enzymabhängig)	2 μL	10 μL
DNA	1 μg	10 μg
Enzym	10 U	50 U
H ₂ O	ad 20 μL	ad 100 μL

Der Restriktionsenzym-Ansatz wurde für 90 Minuten bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

Um bei späteren Ligationen eine Re-Ligation des Ursprungsplasmids zu verhindern, wurden mithilfe der *calf intestinal phosphatase* (CIP) die 5' Überhänge des Vektors dephosphoryliert. Hierzu wurden einem 37°C-Restriktionsenzym-Ansatz 30 Minuten vor Ende der Inkubationszeit 50 U CIP hinzugefügt.

5.1.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol Fällung

Da Restriktionsenzyme verschiedene Puffer für ein optimales Schneiden der DNA benötigen, war das Wechseln von Puffern und Entfernen von Enzymen ein notwendiger Zwischenschritt. Dies wurde mithilfe einer Phenol-Chloroform-Ethanol-Fällung erreicht.

Der Restriktionsansatz wurde mit 1,5-facher Menge Phenol und 1,5-facher Menge Chloroform vermischt und bei 4°C und 18.000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit der 5-fachen Menge reinem Ethanol erneut bei 4°C und 18.000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend getrocknet und in Wasser gelöst.

5.1.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Das Zusammenfügen von mit Restriktionsenzymen geschnittenen DNA-Sequenzen erfolgte mithilfe der T4-Ligase. Dieses Enzym schließt ATP-abhängig und Sequenz-unspezifisch Lücken zwischen Nucleotiden durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen.

Die Mengen an Insert und Vektor-Fragment wurden grob anhand der DNA-Bandenintensität in einem Agarosegel abgeschätzt und im Verhältnis 3:1 verwendet. Zum Ligations-Ansatz wurden neben der DNA 1/10 Volumen 10x Ligase-Puffer und 4 U Ligase zugefügt und dieser entweder für 4 Stunden bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

5.1.2 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch Elektrophorese in Agarosegelen. Zur Sichtbarmachung der Fragmente wurde dem Agarosegel Ethidiumbromid zugefügt, welches die Eigenschaften besitzt, sich in doppelsträngige DNA einzulagern und unter UV-Licht sichtbar zu machen.

Die Agarose wurde in einer Konzentration von 1 % in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 40 °C wurden 0,005 % Ethidiumbromid hinzugegeben und die Lösung in die Gelvorrichtung gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in die Laufapparatur mit TAE-Puffer als Laufpuffer gegeben und die mit Ladepuffer versetzten Proben aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100-120 V für ca. eine Stunde. Die DNA-Banden wurden mithilfe eines UV-Transilluminators bei 312 nm Wellenlänge detektiert und die Größe der DNA-Fragmente durch Vergleich mit einem 1 kb-Größenstandard (New England Biolabs) festgestellt.

5.1.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die DNA-Banden wurden mithilfe des Gel-Extraktionskits peqGOLD (Peqlab) aus Agarosegelen isoliert. Hierfür wurden die entsprechenden Banden unter langwelligem UV-Licht (365 nm) ausgeschnitten, im gleichen Volumen Bindepuffer bei 56°C gelöst und auf die Säule aufgetragen. Durch Zentrifugation bei 18.000 x g für eine Minute lief die Lösung durch die Säule und die DNA konnte an die Matrix binden. Durch zweimaliges Auftragen von Waschpuffer und anschließender Zentrifugation bei 18.000 x g für eine Minute wurde die Säule gewaschen und anschließend bei gleichen Bedingungen trocken zentrifugiert. Das Lösen der DNA erfolgte auf die gleiche Weise, hierfür wurde jedoch Wasser auf die Säule aufgetragen.

5.1.4 Sequenzanalyse

Sofern ein neues Plasmid hergestellt wurde, wurde die Richtigkeit der Sequenz mithilfe der Sanger-Sequenzierung bei GATC Biotech (Konstanz) überprüft. Die erhaltene Sequenz wurde mithilfe der Programme Chromas Lite, Clone Manager Version 9 und der Internetfunktion BLASTN analysiert.

5.1.5 Quantitative *Real-Time* Polymerase-Kettenreaktion

Die Analyse von mRNA in Zellen erfolgte mithilfe der quantitativen *Real-Time* (Echtzeit) Polymerase-Kettenreaktion. Hierfür wurde aus Zelllysat RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mithilfe von definierten Oligonukleotiden vervielfältigt.

5.1.5.1 RNA Extraktion

Die Extraktion der RNA erfolgte mithilfe des Kits RNeasy (Qiagen). Hierfür wurden Zellen zunächst in PBS gewaschen, mithilfe des Lysepuffers und 1 % β -Mercaptoethanol lysiert und die DNA mechanisch durch das Hochziehen durch eine 26G Kanüle in eine Spritze gebrochen. Nach Zugabe von 70 %-igem Ethanol wurde die Probe auf eine Säule geladen und diese bei 8000 x g für 15 Sek. zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 350 μ L RW1-Puffer wurden 10 U DNase I (Roche) in Reaktionspuffer auf die Säule aufgetragen und bei RT für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift mit RW1. Danach folgten zwei weitere Waschschriffe mit 600 μ L RPE-Puffer und das Trocknen durch Zentrifugation bei 10000 x g. Zuletzt wurde die RNA mithilfe von Wasser von der Säule gelöst und die Menge an enthaltener RNA photometrisch bestimmt.

5.1.5.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der mRNA in cDNA erfolgte mithilfe des SuperScript II Reverse Transcriptase Kits (Invitrogen). Um lediglich mRNA zu transkribieren, wurden Oligo-d(T)₁₅-Nukleotide

(Roche) verwendet. Hierfür wurden 1 µg RNA mit 0,16 nM Oligo-dT-Oligonukleotiden in einem Gesamtvolumen von 18 µL bei 70°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend auf Eis gehalten. Dann wurde der Reaktionsmix nach folgendem Schema zusammen gemischt:

Tabelle 16: Enzymmix reverse Transkription

	Menge pro Ansatz
5x <i>First Strand Buffer</i> (Enzypuffer)	5 µL
dNTPs (je 10 mM)	1 µL
DTT (100 mM)	1 µL
Reverse Transkriptase (200 U/µL)	1 µL

Der Enzymmix wurde zur denaturierten RNA gegeben und das Gemisch bei 42°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70°C für 15 Minuten.

5.1.5.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde im LightCycler 480 II (Roche) mit dem Kit QuantiNova SYBR Green von Qiagen durchgeführt.

Zunächst wurde für die Vervielfältigung des Zielgens und der Referenzgene HMBS, HPRT1 und YWHAZ Standardkurven erstellt, um die Bindungseffizienz der Oligonukleotide zu ermitteln. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Sequenzen der Oligonukleotide für Zielgen und Referenzgene in der qPCR

Gen	Sequenz
BZLF1 sense	GGCCAAGTTTAAGCAACTGCT
BZLF1 anti-sense	GATCCTCGTGAAAACATCTG
HMBS sense	CTGAAAGGGCCTTCCTGAG
HMBS anti-sense	CAGACTCCTCCAGTCAGGTACA
HPRT1 sense	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC
HPRT1 anti-sense	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT
YWHAZ sense	CGAGATCCAGGGACAGAGTC
YWHAZ anti-sense	AGTCATTTTTATCCATGACTGG

Hierfür wurde eine Mischung der verschiedenen cDNAs verwendet und zehnfach in Wasser verdünnt, dies entsprach der 1x cDNA-Mischung. Diese cDNA-Mischung wurde nochmals 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. Für die zu analysierenden Gene wurden Mastermixe nach folgendem Schema vorbereitet:

Tabelle 18: Mastermix für ein Gen in der qPCR

	Menge pro Ansatz
SYBR green QuantiNova Mastermix	10 μ L
Oligonukleotide sense (100 μ M)	0,14 μ L
Oligonukleotide anti-sense (100 μ M)	0,14 μ L
Wasser	ad 15 μ L

Für jede der Verdünnungen (insgesamt vier) und jeden Mastermix wurden 3 Löcher einer weißen 96-Loch Platte (Framestar LC480/96 von 4titude) mit 15 μ L des Mastermixes befüllt. Dann wurden je 5 μ L der Verdünnungen der cDNA hinzu pipettiert. Zusätzlich gab es jeweils eine Negativkontrolle, in die keine cDNA, sondern Wasser zum Mastermix gegeben wurde. Als Programm wurde eine 2-stufige PCR laut Herstellerangaben eingegeben:

Die Schritte 2 und 3 wurden 35-mal wiederholt. Die Analyse der Ergebnisse wurde mithilfe des Begleitprogramms LightCycler SW 1.5.1.62SP3 von Roche durchgeführt. Die Standardkurve wurde errechnet und die Steigung des Graphen sollte möglichst nahe am Wert 2 liegen. War dies der Fall wurde die Messung der Proben vorgenommen.

Tabelle 19: qPCR-Programm im Lightcycler

Schritt	Zeit	Temperatur	Messung
Initiale Denaturierung	2 Min.	95°C	-
Denaturierung	5 Sek.	95°C	-
Kombination aus Anlagerung und Verlängerung	10 Sek.	60°C	am Ende
Finale Analyse der Schmelzkurve		alle in 1°C Schritten	bei jedem Schritt

Für jedes Gen waren je 4 Löcher für den Kalibrator vorgesehen, dies entsprach der 1:10-Verdünnung des cDNA-Mixes. Für jede Probe wurden zumindest Duplikate angesetzt. Als Negativkontrollen dienten Wasser statt cDNA und RNA, die nicht revers transkribiert worden war. Der Mastermix für jedes der Gene wurde nach

Tabelle 18 angesetzt. Die zu untersuchende cDNA wurde zehnfach in Wasser verdünnt und je 5 μ L verwendet. Die Vervielfältigung der cDNA erfolgte laut dem Programm in Tabelle 19. Die Analyse der Daten erfolgte erneut mit dem Programm LightCycler SW 1.5.1.62SP3 (Roche) in der Funktion *Advanced Relative Quantification* (Fortgeschrittene Relative Quantifizierung) mit Normalisierung zum Kalibrator.

5.2 Mikrobiologische Methoden

5.2.1 Vervielfältigung von Plasmid-DNA in Bakterien

Plasmide können in Bakterien eingebracht und durch diese vervielfältigt werden. Dabei macht man sich zunutze, dass Bakterien bei einer Zellteilung die enthaltenen Plasmide kopieren.

5.2.1.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien zur Transformation

Um eine erfolgreiche Transformation der Bakterien zu erwirken, wurden diese zuvor elektrokompetent gemacht.

Die Bakterien wurden zunächst aus einer Einzelkultur in 500 mL SOB-Medium angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 - 0,7 (bei einer Wellenlänge von 600 nm) bei 37 °C aerob kultiviert. Die Bakterien wurden auf Eis abgekühlt und anschließend bei 4.800 x g und 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 10 % Glycerin in Wasser resuspendiert, erneut zentrifugiert und anschließend in 2 - 4 mL 10 % Glycerin gelöst. Die Bakterien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

5.2.1.2 Transformation von elektrokompetenten Bakterien

Die Transformation der Bakterien erfolgte durch Elektroporation mit dem Gerät Gene Pulser II (BioRad). Hierfür wurde 1 µL der Ligation oder 1 µg Plasmid mit 20 µL elektrokompetenten Bakterien gemischt, in eine gekühlte Küvette mit einer Spaltbreite von 0,1 cm gegeben und sofort bei 1.500 V, 25 µF und 100 Ω elektroporiert. Die Bakterien wurden sofort in vorgewärmtes SOC-Medium aufgenommen und 30 Minuten bei 37°C aerob kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4.500 x g pelletiert, in 100 µL SOC-Medium gelöst und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgebracht. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert und am folgenden Tag Einzelkolonien zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet.

5.2.1.3 Isolation von kleinen DNA-Mengen

Um die Richtigkeit des Plasmids zu überprüfen, wurde DNA aus kleinen Mengen Bakterien isoliert und mithilfe eines Restriktionsverdau überprüft.

Die Präparation der DNA erfolgte mithilfe des Jetstar 2.0 Kits (Genomed). Hierfür wurden einzelne Bakterienkolonien in 4 mL LB-Medium mit Ampicillin bei 37°C und Schütteln über Nacht inkubiert. Nach der Pelletierung von 1 mL Kultur bei 4500 x g für fünf Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µL Puffer E1 resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien mit 100 µL

Lysispuffer (E2) versetzt und die Reaktion mit der gleichen Menge Neutralisierungspuffer (E3) gestoppt. Anschließend wurde das Gemisch bei 4°C und 18.000 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der vierfachen Menge Ethanol (100 %) gut vermengt und die DNA für 20 Minuten bei 4°C und 18.000 x g gefällt. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in Wasser resuspendiert.

5.2.1.4 Vervielfältigung von großen Mengen DNA

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid wurde eine Maxi-Präparation durchgeführt, ebenfalls mithilfe des Jetstar 2.0 Kits. Eine Kolonie eines Vereinzlungsausstrichs einer positiven Mini-Präparation wurde in Superbroth-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37°C aerob kultiviert. Die Kultur wurde am Folgetag 15 Minuten bei 4500 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 mL Puffer E1 resuspendiert und anschließend hiervon ein Aliquot mit der 1,25-fachen Menge Glycerin-LB-Medium vermengt und für spätere Verwendung weggefroren.

Die restliche Zell-Suspension wurde mit 10 mL Lysispuffer (E2) lysiert und anschließend mit der gleichen Menge Neutralisierungspuffer (E3) versetzt. Nach kräftigem Mischen wurde die Probe bei 4500 x g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Währenddessen wurde eine Säule mit Equilibrierungspuffer (E4) vorbereitet, und der flüssige Überstand der Probe nach der Zentrifugation durch Gaze gefiltert auf diese Säule überführt. Nach dem Durchfluss der Probe durch die Säule wurde diese dreimal mit jeweils 20 mL Waschpuffer (E5) gewaschen und anschließend die DNA mithilfe des Elutionspuffers (E6, 15 mL) von der Säule eluiert. Das Eluat wurde mit 10,5 mL Isopropanol (100 %) versetzt und für 30 Minuten bei 4°C und 4500 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen, das resultierende Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, in 0,5 bzw. 1,0 mL TE-Puffer resuspendiert und bei 4°C gelagert. Anschließend wurde ein Kontrollverdau mit Restriktionsenzymen angesetzt.

5.3 Zellbiologische Methoden

5.3.1 Allgemeine Anmerkung zu zellbiologischen Methoden

Zur Vermeidung von Kontaminationen der Zellkulturen wurde mit diesen unter Sicherheitswerkbänken gearbeitet. Dabei wurden ausnahmslos sterile oder autoklavierte Materialien und Lösungen verwendet.

5.3.2 Kultivierung humaner Zellen

Alle humanen Zellen wurden in einem Zellkultur-Inkubationsschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Handhabung der Zellen erfolgte innerhalb von Steril-Werkbänken unter Einhaltung aseptischer Bedingungen.

5.3.2.1 Kultivierung von etablierten Zelllinien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Suspensions-Zelllinien in LCL-Medium in Zellkulturflaschen kultiviert. Je nach Zelldichte wurden die Zellkulturen in regelmäßigen Zeitabständen von drei bis vier Tagen im Verhältnis von 1:2 bis 1:10 (Zellsuspension zu frischem Medium) geteilt. Die adhärente Zelllinie HEK293T wurde in DMEM-Medium in Zellkulturschalen kultiviert. Diese Kultur wurde ebenfalls alle drei bis vier Tage nach Ablösen von den Kulturschalen mithilfe von 0,05 % Trypsin im Verhältnis 1:10 geteilt.

5.3.3 Kultivierung und Stimulation von etablierten T-Zellen

Die verwendeten T-Zellen wurden in T-Zellmedium in 24-Loch Platten kultiviert. In einem 14-tägigen Rhythmus wurden die T-Zellen stimuliert, dabei wurden für T-Zelllinien und T-Zellklone verschieden Stimulationsarten verwendet. In der Zeit zwischen den Stimulationen wurden die T-Zellen entsprechend der Zelldichte in einem Verhältnis von 1:1 geteilt.

5.3.3.1 PHA-Stimulation

Das Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) ist ein Lektin pflanzlichen Ursprungs, welches die Proliferation von T-Zellen anregt. In Kombination mit APC wurde PHA zur Stimulation von T-Zellklonen eingesetzt.

Jeweils 10⁶ T-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit humanen *feeder*-Zellen und 2:1 mit APC in T-Zellstimulationsmedium [IL-2 (10 U/mL) und PHA (250 ng/mL)] restimuliert. Als *feeder*-Zellen dienten bestrahlte (40 Gray) mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), die aus Blut von mindestens zwei verschiedenen humanen Spendern gewonnen wurden. Als APC wurden Protein- oder Peptid-beladene LCL verwendet. Die Beladung mit spezifischem Protein (500 ng/mL) erfolgte durch eine 16-stündige, die Peptid-Beladung (2 µg/mL) durch eine zweistündige Inkubation. Vor der Stimulation wurden die APC mit 80 Gray bestrahlt und dreimal gewaschen, um eine Verschleppung von Proteinen oder Peptiden zu vermeiden. Nach 3-4 Tagen wurde das Medium durch frisches T-Zell-Medium mit 10 U/mL Interleukin-2 (IL-2) ersetzt.

5.3.3.2 Protein- und Peptid-Stimulation

T-Zelllinien wurden mithilfe von Peptid- oder Protein-beladenen APC und IL-2 stimuliert. Auch hier erfolgte eine Beladung der APC für 16 bzw. 2 Stunden und anschließende Bestrahlung mit 80 Gray. Nach dreimaligem Waschen wurden je 10^6 T-Zellen im Verhältnis von 2:1 mit APC in T-Zellmedium aufgenommen, jedoch ohne Zugabe von IL-2. Dies (10 U/ml) wurde erst am Folgetag der Stimulation zu den T-Zellen zugegeben.

5.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 μ L einer homogenen Zellkultur mit der gleichen Menge Trypanblau (0,4 %) vermischt und die Hälfte der Mischung in eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Trypanblau gelangt lediglich durch beschädigte Membranen in das Innere von Zellen und dient daher der Unterscheidung von toten und lebenden Zellen. Eine Neubauer-Zählkammer besitzt vier Großquadrate, die jeweils in 16 kleinere Einheiten unterteilt sind. Unter dem Lichtmikroskop wurde die Zellzahl in diesen vier Großquadraten bei 10-facher Vergrößerung bestimmt.

Der Mittelwert (MW) dieser Zählung wurde zur Bestimmung der Gesamtzellzahl verwendet: MW Zellzahl in Großquadrat x Faktor 2 (Trypanblau-Verdünnung) x 10^4 (Eichung Zählkammer) x Volumen (mL) der Zellsuspension.

5.3.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurde zunächst die Zellzahl bestimmt und jeweils 10^7 Zellen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,8 mL Einfriermedium gelöst und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden mehrfach mit Zellstoff umwickelt und bei -80°C eingefroren. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Röhrchen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Nach dem zügigen Auftauen bei 37°C wurden die Zellen sofort in Waschmedium aufgenommen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 mL Medium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche ausgebracht. T-Zellen wurden direkt stimuliert.

5.3.6 Zellseparation mittels Ficoll-Dichtegradienten

Ficoll (Pancoll; Pan Biotech) ist ein synthetisch hergestelltes Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin, das zur Separation von Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation verwendet wird. Die Zellseparation mit Ficoll wurde, neben der Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus Vollblut, auch zur Trennung lebender Zellen von toten Zellen eingesetzt.

Es wurden ca. 10^7 Zellen aus der Kultur in 10 mL Medium gesammelt und mit 3 mL Ficoll oder aber 30 mL Vollblut mit 10 mL Ficoll unterschichtet. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei $750 \times g$ für 30 Minuten ohne Zentrifugenbremse. Anschließend wurden die Zellen mehrfach gewaschen und sofort weiter verwendet.

5.3.7 Transfektion von Zellen

Das Einbringen von DNA in Zellen erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels Elektroporation oder durch Lipofektion.

5.3.7.1 Elektroporation von Suspensionszelllinien

Pro Transfektionsansatz wurden 5×10^6 Zellen gesammelt, zunächst in Waschmedium und anschließend in Minimalmedium gewaschen. Die zu verwendende DNA wurde in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und gegebenenfalls gemischt, die maximale DNA Menge betrug $30 \mu\text{g}$ pro Transfektion. Die Zellen für einen Transfektionsansatz wurden in $300 \mu\text{L}$ OptiMEM aufgenommen und mit der vorgelegten DNA vermischt. Die Zellen wurden in eine $0,4 \text{ cm}$ Küvette überführt, in dem Gerät Gene Pulser II (BioRad) einem Elektropuls von 260 V und $975 \mu\text{F}$ ausgesetzt und unverzüglich in 5 mL vorgewärmten LCL-Medium aufgenommen. Nach 24 Stunden erfolgte die Analyse der transfizierten Zellen.

5.3.7.2 Chemische Transfektion von adhärennten Zellen

Die adhärennte Zelllinie HEK293T wurden mithilfe des Liposomenbildners Polyethylenimin (PEI) transfiziert. Hierfür wurden die Zellen am Vortrag so gesplittet, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 70 % Konfluenz erreicht hatten, das entspricht einer ungefähren Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ Zellen in einer 6-Loch-Platte.

Pro Transfektion von Zellen in einer Vertiefung einer 6-Loch-Platte wurden $10 \mu\text{g}$ DNA in 1 mL Minimalmedium gelöst. Anschließend wurden $11,25 \mu\text{l}$ PEI ($100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) zugegeben, das Gemisch für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 5 mL DMEM-Medium aufgenommen. Dieses Gemisch wurde für 24 Stunden auf die HEK293T Zellen gegeben und anschließend durch Kulturmedium ersetzt.

5.3.8 Etablierung stabiler Zelllinien

Um stabil transfizierte Zelllinien zu erhalten, wurden zwei bis drei Tage nach Transfektion eine magnetische Zellseparation NGFR-positiver Zellen durchgeführt. Die verwendeten Plasmide enthielten den plasmidalen Replikationsursprung oriP von EBV sowie die kodierende Sequenz des

EBV-Proteins EBNA1, wodurch der Verbleib der Plasmide in den Zellen als Episom gewährleistet wurde. Darüber hinaus wurde regelmäßig auf den Verbleib des Plasmids in den Zellen durch die Zugabe von Puromycin (0,3 - 1 µg/mL) selektioniert. Die Expression des gewünschten Gens konnte durch Zugabe des Promotor-aktivierenden Moleküls Doxycyclin (100-400 ng/mL) induziert werden. Diese Induktion wurde standardisiert bei einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/mL durchgeführt.

5.3.9 T-Zell-Assay

Die Präsentation von Antigenen wurde mithilfe von T-Zell-Assays untersucht. Die APC wurden entweder transfiziert oder exogen mit Protein beladen und dann mit Antigen-spezifischen T-Zellen ko-kultiviert. Sofern T-Zellen ein Antigen auf den APC erkennen, werden Zytokine ausgeschüttet, die im Überstand mithilfe von *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) nachgewiesen wurden.

Zur Analyse der T-Zell-Erkennung wurden in einer 96-Loch Platte pro Loch 10^5 Antigen-präsentierende Zellen vorgelegt und 5×10^4 T-Zellen zugesetzt. T-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen wurden für 16 Stunden inkubiert und anschließend wurde der Überstand dieser Ko-Kultur weiter verwendet.

5.3.10 Analyse der Zytokinausschüttung von T-Zellen mittels ELISA

Die Analyse von T-Zellen hinsichtlich Zytokin-Ausschüttung nach Antigen-Erkennung erfolgte durch ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Die Zytokine Interferon-gamma (IFN- γ) und Granulozyten-Makrophagen-Colonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) wurden mithilfe von Mabtech-Kits laut Herstellerangaben untersucht.

Es wurden 96-Loch ELISA-Platten (Corning) mit 100 µL/Loch spezifischem *Capture*-Antikörper (1:1000 in PBS) über Nacht bei RT beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurden die Löcher mit je 300 µL Blockpuffer für eine Stunde inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern, und anschließend erneut dreimal gewaschen. Dann wurden 100 µL des Überstands einer Ko-Kultur in die Löcher überführt und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 100 µL/Loch spezifischer Detektions-Antikörper (1:2000 verdünnt in RD-Puffer) hinzugegeben und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Ansätze mit 100 µL Streptavidin-gekoppelter Peroxidase (1:1000 verdünnt in RD-Puffer) versetzt und für eine Stunde in Dunkelheit bei RT inkubiert. Schließlich wurde nach einem erneuten Waschschrift 100 µL/Loch ELISA-Färbelösung zugesetzt und die Reaktion nach 2-10 Minuten mit je 50 µL ELISA-Stopplösung abgestoppt. Die Quantifizierung erfolgte im ELISA-Lesegerät (Tecan) bei 450 nm und

620 nm Referenzwellenlänge. Als Vergleichsgröße diente jeweils das rekombinante Zytokin in einer Verdünnungsreihe.

5.4 Immunologische Methoden

5.4.1 Durchflusszytometrie

Die Analyse von GFP-exprimierenden Zellen erfolgte durchflusszytometrisch (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS). Die Messung erfolgte am FACS-Canto mit Hilfe des Programms Diva (BD), die Auswertung aller Ergebnisse mit Hilfe des Programms FlowJo (Tree Star).

5.4.1.1 Analyse GFP-exprimierender Zellen

GFP-exprimierende Zellen wurden zweimal in FACS-Puffer gewaschen (500 x g; 5 Minuten), in ein FACS-Röhrchen überführt und im FACS-Canto-Gerät analysiert. Die Population der lebenden Lymphozyten wurde mittels Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht ausgewählt. Von diesen Zellen wurden der Anteil an GFP-positiven Zellen und die mediane Fluoreszenz-Intensität (MFI) der GFP-positiven Zellen bestimmt.

5.4.2 Konfokalmikroskopie

Die Lokalisation von GFP-markierten Proteinen innerhalb von Zellen wurde mithilfe von konfokaler Mikroskopie durchgeführt.

Die adhärent wachsende Zelllinie HEK293T wurde auf gläsernen Deckgläschen kultiviert und mithilfe von Polyethylenimin transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in einem Tropfen DAPI-haltigem Einbettungsmedium Vecta-SHIELD (Vector Laboratories) auf einen Objektträger eingebettet. Die Ränder des Deckgläschens wurden mit Klarlack umschlossen, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Die Zellen wurden unverzüglich dunkel gelagert und unter dem Mikroskop Leica TCS SP5II untersucht. Die Zellen wurden in einer Fokusebene jeweils im Durchlicht-, GFP- und DAPI-Kanal fotografiert. Die Analyse der Bilder erfolgte mithilfe des Programms ImageJ. Es wurde eine gleichmäßige Anpassung von Helligkeit und Kontrast vorgenommen. Hierbei wurde das Maximum aller Bilder im GFP-Kanal von 255 auf 100 und im DAPI-Kanal von 255 auf 150 verschoben.

5.4.3 Magnetische Zellseparation

Zur spezifischen Isolation von Zellpopulationen aus einem Zellgemisch wurde die magnetische Zellseparation (*magnetic activated cell separation*; MACS) mit dem System der Firma Miltenyi Biotec durchgeführt und nach Herstellerangaben verfahren.

Zur Positivselektion von NGFR⁺ Zellen wurden diese gezählt und anschließend in eiskaltem MACS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200 μ L Maus α NGFR-Antikörper pro 10^7 Zellen gelöst und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen gewaschen, das Pellet in 100 μ L MACS-Puffer und 50 μ l magnetischer Kügelchen, die an α Maus-IgG-Antikörper gekoppelt waren, pro 10^7 Zellen gelöst und erneut für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 500 μ L MACS-Puffer resuspendiert. Eine MACS-Säule der Größe LS wurde am Magneten befestigt und mit 3 mL kaltem MACS-Puffer equilibriert. Auf diese Säule wurden die Zellen gegeben und nach Durchlauf dreimal mit je 3 mL kaltem MACS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Zellen zu entfernen. Anschließend wurde die Säule vom Magneten entfernt und die darin enthaltenen Zellen zweimal mit je 5 mL MACS-Puffer aus der Säule eluiert. Beim letzten Durchgang wurde der Puffer mithilfe eines Pistills durch die Säule gedrückt. Die selektierten NGFR⁺ Zellen wurden gezählt, gewaschen und direkt weiter verwendet.

5.5 Proteinbiochemische Methoden

5.5.1 Herstellung von RIPA-Extrakten

Zur Herstellung von Zellextrakten wurden die Zellen gezählt und 1×10^7 Zellen zweimal in PBS gewaschen. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 500 x g wurde der Überstand sorgfältig entfernt und das Pellet auf Eis mit 100 μ L RIPA-Puffer für zehn Minuten lysiert. Der Überstand wurde nach erneuter Zentrifugation bei 20.000 x g bei 4°C für 15 Minuten abgenommen und bis zu weiteren Analysen bei -20°C gelagert.

5.5.2 Herstellung von Zelllysaten mit Harnstoff-Lysepuffer

Eine andere Methode zur Herstellung von Zellextrakten ist die Lyse mithilfe von Harnstoff-Puffer. Hierfür wurden die Zellen ebenfalls gezählt und zweimal in PBS gewaschen. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und 1×10^7 Zellen in 100 μ L Harnstoff-Lysepuffer gelöst. Da das Lysat durch die enthaltene DNA noch sehr zähflüssig war, wurden die Lysate im Anschluss mithilfe von Ultraschall weiter aufgebrochen. Hierfür wurde das Gerät Biorupter (Diagenode) verwendet. Die Proben wurden in 1,5 ml-Reagenzgefäßen in das Gerät eingespannt, das Wasserbad mit Eiswasser gefüllt

und die Proben bei voller Leistung für 5 bis 15 Zyklen jeweils 30 Sek. sonifiziert und anschließend 30 Sek. gekühlt. Das Lysat wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.5.3 Proteinaufreinigung mithilfe der 6xHistidin-Markierung

Zur Anreicherung von Histidin-Etikett-tragenden Proteinen aus mit Harnstoff-Puffer lysierten Zellen wurden diese mithilfe von Nickel-markierten Agarose-Kügelchen (Qiagen) aus dem gesamten Zellextrakt isoliert. Das Lysat einer 6-Loch-Platte wurde hierfür mit 30 µL der Nickel-markierten Kügelchen über Nacht bei 4°C invertierend inkubiert und nach 24 Stunden bei 10.000 x g zentrifugiert, mit Harnstoff-Lysispuffer gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden die Kügelchen mit 30 µL Elutionspuffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Diese Elution erfolgte noch zwei weitere Male. Dann wurden die Überstände vereinigt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

5.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Separation von Proteinen erfolgte elektrophoretisch anhand ihrer molekularen Größe in einer Polyacrylamid-Gel-Matrix nach Laemmli (1970).

Die Proteinproben wurden mit SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95°C oder 55°C hitzedenaturiert. Die Polyacrylamid-Konzentration der verwendeten Trenngele betrug 8 %, 10 % oder 14 %, die der Sammelgele 4 %. Als Größenvergleich diente der Proteinmarker *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Fermentas). An das Gel wurde für 2-3 Stunden ein Strom von 120 V angelegt, anschließend erfolgte ein Western-Blot-Transfer mit Analyse.

5.5.5 Western-Transfer

Der elektrophoretische Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine aktivierte Polyvinylidenfluorid-Transfer-Membran (PVDF, Whatman) erfolgte nach der „Nassblot-Methode“ in einer Apparatur von Hoefer (Warwickshire, UK) in Transferpuffer bei einer Stromstärke von 0,3 A für zwei Stunden und 4°C. Anschließend wurde die Membran für die Immundetektion von Protein verwendet.

5.5.6 Dot-Blot

Das Aufbringen von Proteinextrakten auf eine PVDF-Membran erfolgte durch die Dot-Blot-Methode. Hierfür wurden die aufgereinigten Proteinextrakte auf die aktivierte Membran aufgetropft. Nach der Trocknung der Tropfen wurden die Proteine mithilfe von Immundetektion nachgewiesen.

5.5.7 Immundetektion von Proteinen

Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte durch Immundetektion auf der Membran. Dazu wurde die Membran für eine Stunde in Block-Puffer inkubiert und danach über Nacht bei 4°C mit Primärantikörper in WB-Waschpuffer rollend inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran in WB-Waschpuffer gewaschen und für zwei Stunden mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in WB-Waschpuffer bei RT auf einem Roller inkubiert. Die Detektion erfolgte mithilfe einer selbst hergestellten oder kommerziell erhältlichen ECL-Lösung (GE-Healthcare) auf einem Röntgenfilm (CEA Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive von Agfa Healthcare oder High Performance Chemiluminescence Film von Amersham GE Healthcare). Die Expositionszeit des Films wurde je nach Intensität des Signals variiert. Entwickelt wurde der Film maschinell mithilfe des Geräts Optimax (Typon). Die Filme wurde anschließend eingescannt und mithilfe des Programms ImageJ im schwarz-weiß-Kanal analysiert. Die Quantifizierung von Proteinmengen erfolgte immer in Bezug auf eine unbehandelte Kontrolle und normalisiert auf die Ladekontrolle.

6. Ergebnisse

6.1 Der Einfluss von Defective Ribosomal Products auf die Präsentation von Modellantigenen

Woher Antigene stammen, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, ist nach wie vor ungeklärt. Im Folgenden wurde untersucht, ob die DRiP-Hypothese mithilfe eines endogen exprimierten Modellantigens bestätigt werden kann.

6.1.1 Transiente Expression eines Modellantigens

Die Ursache von Cystischer Fibrose (CF) sind Mutationen im Gen des Chlorid-Ionenkanals *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Receptor* (CFTR) (Rommens et al., 1989). Das *CFTR*-Gen kodiert für ein aus ca. 1500 Aminosäuren bestehendes Protein, das normalerweise in der Membran von Epithelzellen vorkommt (Elborn, 2016). Die häufigste Mutation in Europa ist das Fehlen der Aminosäure Phenylalanin an Position 508 (CFTR Δ F508) (Kopito, 1999). Diese Mutation führt dazu, dass das Protein nicht die richtige dreidimensionale Struktur erreicht und daher ein Großteil des Proteins sofort durch den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg abgebaut wird (Lukacs et al., 1994, Ward et al., 1995, Jensen et al., 1995). Sowohl Translokation und Faltung im ER als auch die Ubiquitylierung von CFTR scheinen kotranslational zu erfolgen (Sato et al., 1998, Kim and Skach, 2012). Während das Wildtyp-CFTR (CFTR_wt) zu 50 % sofort abgebaut wird, werden ca. 99 % des CFTR Δ F508 (CFTR_mut) sofort degradiert (Sato et al., 1998). Der sofortige Abbau durch fehlerhafte Faltung des Proteins nach der Synthese macht CFTR_mut per Definition zu einem DRiP. Daher wurde CFTR als Modellantigen für die Untersuchung der Präsentation eines Antigens im Zusammenhang mit der DRiP-Hypothese ausgewählt.

Die Kodon-optimierten Sequenzen von *CFTR*_wt und *CFTR*_mut wurden jeweils in ein Expressionsplasmid unter die Kontrolle des frühen CMV-Promotors kloniert. An das C-terminale Ende der kodierenden Sequenz wurde die Sequenz des aus dem EBV-Protein BRLF1 stammenden YVLDHLIVV-Epitop, im Folgenden YVL genannt, angefügt. Das YVL-Epitop wird auf dem MHC-Klasse I Molekül HLA-A*0201 präsentiert. Darüber hinaus wurde für die Detektion der CFTR-Proteine eine aus dem EBV-Protein EBNA1 stammende, 11 Aminosäuren lange Sequenz als Marker angefügt. Zur Detektion und Lokalisation von CFTR_wt bzw. CFTR_mut wurde ein weiteres Expressionsplasmid hergestellt, das zusätzlich carboxyterminal die Sequenz von GFP enthielt und dadurch für ein CFTR_wt-GFP bzw. CFTR_mut-GFP Fusionsprotein kodierte.

6.1.2 Expression und Lokalisation der Fusionsproteine CFTRwt-GFP und CFTRmut-GFP

Die Expression und Lokalisation von CFTRwt bzw. CFTRmut wurde zunächst mithilfe von konfokaler Mikroskopie untersucht.

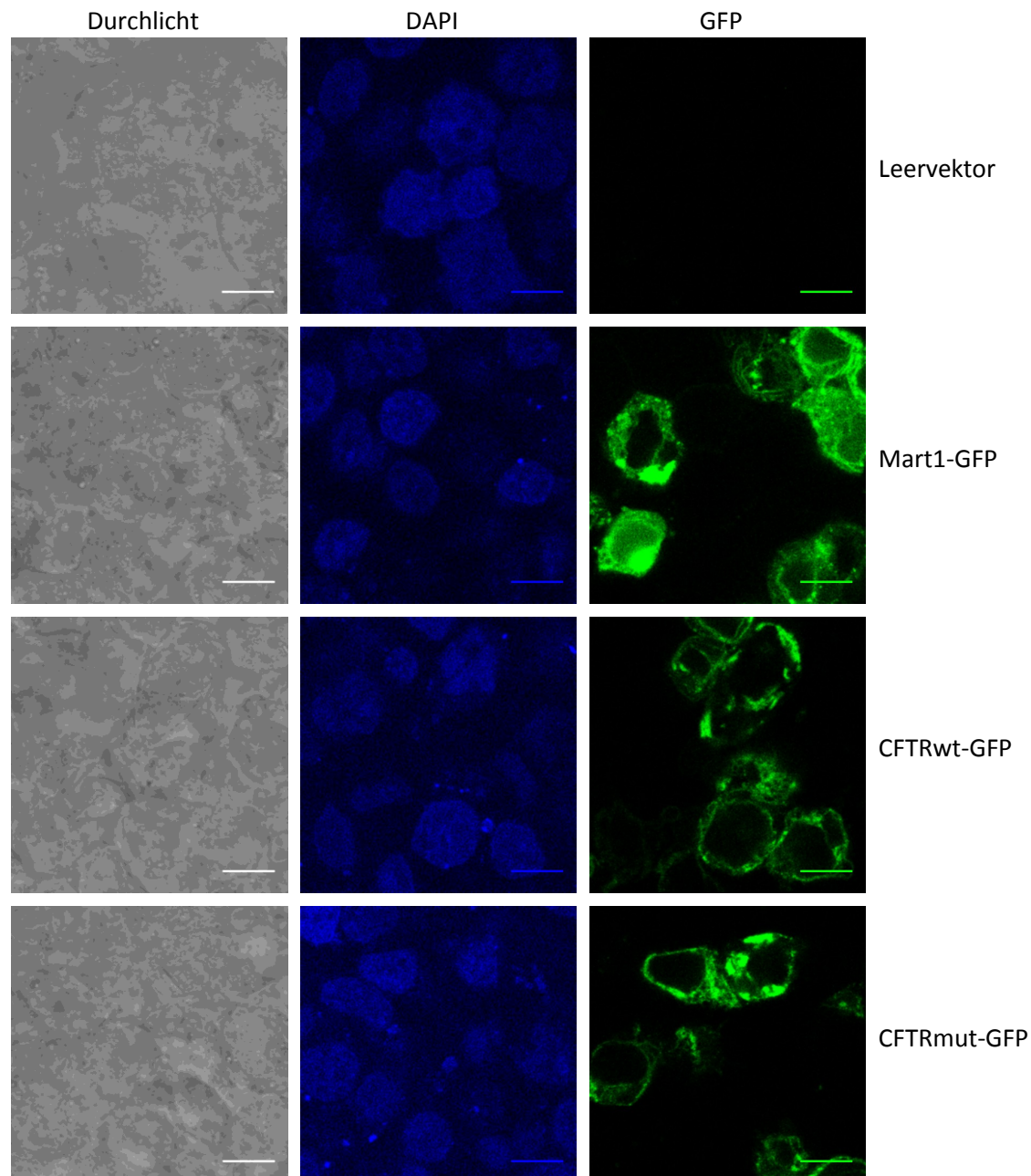


Abbildung 3: CFTRwt-GFP und CFTRmut-GFP Fusionsproteine werden exprimiert und sind in der Membran lokalisiert. Auf Deckgläschen wachsende HEK293T Zellen wurden mit je 10 µg Expressionsplasmid für die angegebenen Fusionsproteine mithilfe von PEI transfiziert, nach 24 Stunden in eine DAPI-haltige Lösung eingebettet und unter dem Mikroskop analysiert. Mart1-GFP diente als Kontrolle für ein membranständiges Protein. Jede Reihe zeigt den gleichen Bildausschnitt im Durchlicht, im DAPI-Kanal und im GFP-Kanal (v.l.n.r). Es handelt sich jeweils um eine Einzelaufnahme in der gleichen Fokusebene. Die eingezeichneten Balken repräsentieren jeweils eine Größe von 10 µm.

Hierfür wurden die GFP-Fusionsproteine in HEK293T-Zellen exprimiert und nach 24 Stunden analysiert. Als Kontrollen dienten ein Leervektor und das Membran-ständige Fusionsprotein Mart1-GFP. Die Zellen wurden vor der Analyse mit DAPI-haltigem Medium eingebettet, wodurch die Zellkerne angefärbt wurden.

In Abbildung 3 sind beispielhaft konfokalmikroskopische Aufnahmen der Zellen dargestellt. Sowohl in den mit CFTRwt-GFP als auch mit CFTRmut-GFP transfizierten Zellen gab es deutliche GFP-Signale, eine Expression der Fusionsproteine wurde hiermit nachgewiesen. Die Verteilung der CFTR-GFP-Proteine ähnelte der Verteilung von Mart1-GFP, was auf eine Lokalisation in der Zellmembran hinwies.

6.1.3 Präsentation des an CFTRwt bzw. CFTRmut fusionierten YVL-Epitops auf MHC-Klasse-I-Molekülen

Um die Präsentation des angefügten YVL-Epitops auf HLA-A*0201 zu untersuchen, wurden DG75 Zellen, die dieses HLA-Allel exprimieren, mit CFTRwt, CFTRmut, oder den jeweiligen GFP-Fusionsplasmiden transfiziert und nach 24 Stunden mit YVL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen für 16 Stunden ko-kultiviert. Nach Aktivierung durch Antigenerkennung schütten T-Zellen Zytokine, wie z.B. IFN γ , aus, welches quantifiziert wurde und als Indikator für die Präsentation der Antigene diente (Abbildung 4A). Als Negativkontrolle dienten untransfizierte Zellen, als Positivkontrolle wurden mit YVL-Peptid beladene APC verwendet.

Die T-Zellen erkannten sowohl APC, die mit CFTRwt und CFTRwt-GFP, als auch mit CFTRmut und CFTRmut-GFP transfiziert worden waren, jedoch nicht untransfizierte APC. Somit dienten sowohl CFTRwt als auch CFTRmut als Antigenquelle. Die Intensität der T-Zell-Aktivierung durch CFTRwt-transfizierte APC war dabei etwa genauso stark, wie die Aktivierung durch CFTRmut-transfizierte APC. Um einen möglichen Sättigungseffekt durch zu große Mengen an transfizierter Plasmid-DNA auszuschließen, wurden diese Experimente unter Verwendung von jeweils 3 μ g CFTRwt- oder CFTRmut-Plasmiden wiederholt (Daten nicht gezeigt). Auch unter diesen Bedingungen wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

Um zu untersuchen, ob die Prozessierung von YVL-markiertem CFTRwt und CFTRmut abhängig von TAP war (Abbildung 4B), wurden die APC zusätzlich zu den CFTR-Plasmiden mit einem Plasmid transfiziert, das für das EBV-Protein BNLF2a kodierte. BNLF2a ist ein beschriebener Inhibitor der TAP-Funktion und verhindert dadurch die Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen (Horst et al., 2009). Durch die Ko-Transfektion von BNLF2a mit CFTRwt und CFTRmut wurde jeweils

die Präsentation der YVL-Epitope stark reduziert. Dies zeigte, dass die YVL-Epitope aus CFTRwt und CFTRmut TAP-abhängig auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert wurden. Auch hier wurden mit jeweils 3 µg CFTRwt oder CFTRmut transfizierter Plasmid-DNA die gleichen Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt).

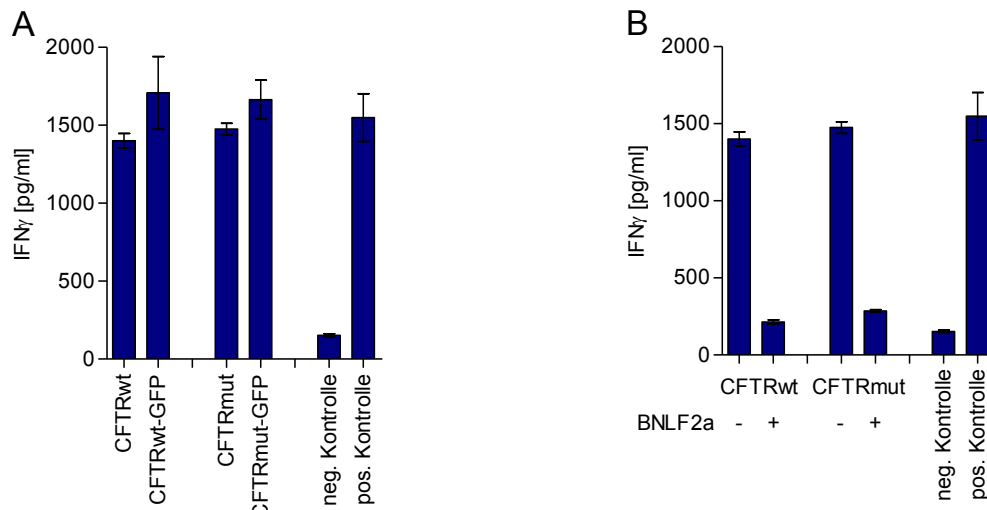


Abbildung 4: CFTRwt und CFTRmut werden TAP-anhängig auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert. (A) DG75 Zellen wurden mit je 10 µg der angegebenen Expressionsplasmide für CFTRwt bzw. CFTRmut transfiziert und nach 24 Stunden mit T-Zellen für 16 Stunden ko-kultiviert. Anschließend wurde mittels ELISA die IFN γ -Konzentration im Kulturüberstand bestimmt. (B) Zusätzlich zu den CFTRwt- /CFTRmut-Plasmiden wurden DG75-Zellen mit gleicher Menge eines Expressionsplasmids für BNL2a oder eines Leervektors transfiziert. Als Negativkontrolle (neg. Kontrolle) dienten untransfizierte APC, als Positivkontrolle (pos. Kontrolle) dienten untransfizierte APC, die mit Peptid beladen worden waren. Diese Versuche wurden dreimal wiederholt. Gezeigt werden die repräsentativen Ergebnisse eines Einzelversuchs. Die Standardabweichungen waren das Ergebnis von Dreifach-Bestimmungen.

6.1.4 Die Faltungsmodulatoren beeinflussen die Expression der Modellproteine

Da die Ursache für die CF die fehlerhafte Faltung des CFTR-Proteins ist, wurden niedermolekulare Stoffe entwickelt, die die Faltung von verschiedenen mutierten CFTR-Proteinen modulieren. Für CFTRmut stehen einige solcher Moleküle zur Verfügung, die klinisch vielversprechendsten scheinen VX-809 und Corr4a zu sein (Lukacs and Verkman, 2012). Das Molekül VX-809, auch Lumacaftor genannt, befindet sich zurzeit in verschiedenen klinischen Studien in Phase 3 und soll die Faltung während der Prozessierung im ER unterstützen (Van Goor et al., 2011). Dagegen soll Corr4a durch indirekte Interaktion Transport, Glykosylierung und Membranexpression von CFTRmut erhöhen (Pedemonte et al., 2005, Wang et al., 2007). Als wirksame Konzentrationen für *in vitro*-Versuche werden für VX-809 0,1-3 µM (Van Goor et al., 2011) und für Corr4a 5-30 µM angegeben (Wang et al., 2007, Pedemonte et al., 2010).

Um den Einfluss von VX-809 und Corr4a auf die Expression von CFTRwt-GFP oder CFTRmut-GFP zu untersuchen, wurden DG75-Zellen mit je 10 μg CFTRwt-GFP bzw. CFTRmut-GFP transfiziert und mit verschiedenen Konzentrationen VX-809 oder Corr4a für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 5). Da der Faltungsmodulator Corr4a bereits ab Konzentrationen von 1 μM eine Toxizität aufwies, wurden geringere als die in der Literatur angegebenen optimalen Konzentrationen verwendet.

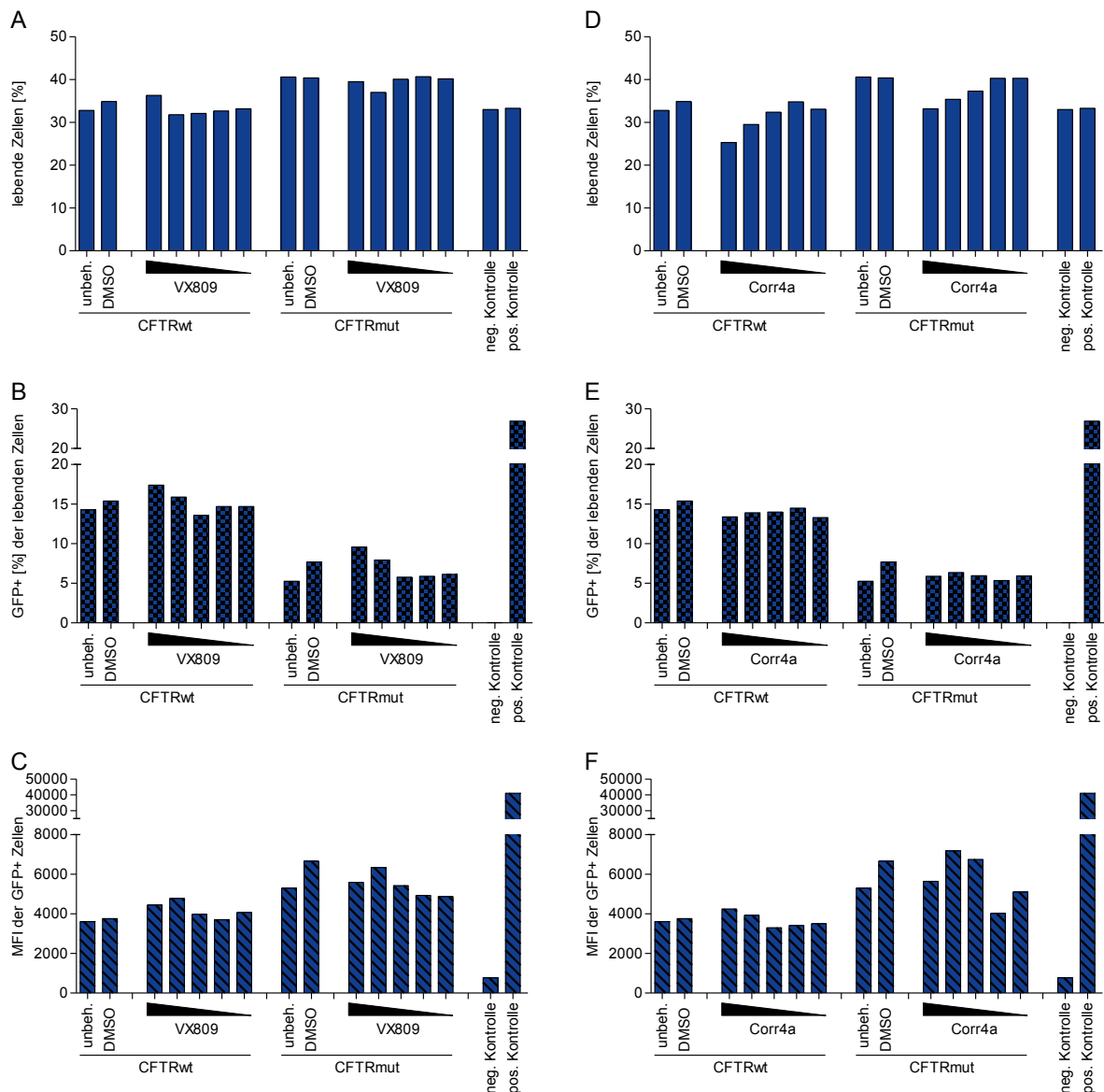


Abbildung 5: Einfluss der Faltungsmodulatoren VX-809 und Corr4a auf die CFTRwt-GFP- und CFTRmut-GFP-Proteinmengen. DG75-Zellen wurden mit 10 μg CFTRwt-GFP- oder CFTRmut-GFP-Plasmid transfiziert und mit jeweils 10; 1; 0,1; 0,01 und 0,001 μM VX-809 oder Corr4a, beides in DMSO gelöst, für 24 Stunden inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Unbehandelte Zellen und Zellen, die mit den äquivalenten maximalen Mengen an DMSO behandelt worden waren, dienten dem Vergleich. Als Negativkontrolle (neg. Kontrolle) dienten mit Leervektor transfizierte und als Positivkontrolle (pos. Kontrolle) Mart1-GFP-transfizierte Zellen. In (A) und (D) ist der Anteil an lebenden Zellen, in (B) und (E) der prozentuale Anteil an GFP-positiven Zellen unter den lebenden Zellen und in (C) und (F) die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der GFP-positiven Zellen gezeigt. Diese Untersuchungen wurden fünfmal durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis.

Diese Untersuchungen ergaben, dass VX-809 keine toxische Wirkung auf die transfizierten Zellen hatte, da der Anteil lebender Zellen, verglichen mit Zellen, die nicht mit VX-809 behandelt wurden, unverändert war (Abbildung 5A). Dagegen stieg der Anteil an GFP-positiven Zellen in lebenden, CFTRwt- und CFTRmut-exprimierenden Zellen (Abbildung 5B) im Vergleich zu Zellen, die mit der äquivalenten Menge des Lösungsmittels DMSO behandelt worden waren, leicht an. Ebenso stieg die MFI der CFTRwt und CFTRmut exprimierenden Zellen (Abbildung 5C), dieser Effekt wurde jedoch auch durch das Lösungsmittel DMSO alleine bewirkt, wenngleich nicht so stark. VX-809 bewirkte demnach eine geringfügige Steigerung der Expression von CFTRwt-GFP und CFTRmut-GFP in DG75-Zellen.

Ab einer Konzentration von 1 μ M zeigte der Faltungsmodulator Corr4a dagegen eine deutliche toxische Wirkung. Der Anteil lebender Zellen (siehe Abbildung 5D) war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle deutlich reduziert. Corr4a bewirkte keinen Anstieg der GFP-positiven Zellen, weder in CFTRwt- noch in CFTRmut-exprimierenden Zellen (Abbildung 5E). Lediglich die MFI stieg durch die Zugabe Corr4a in den beiden höchsten Konzentrationen in CFTRmut-exprimierenden Zellen an. Doch auch dieser Effekt wurde bereits durch DMSO mit der äquivalenten Menge der höchsten Konzentration alleine bewirkt (Abbildung 5F). Ein stabilisierender Effekt auf CFTRmut konnte durch Corr4a daher nicht festgestellt werden.

Ähnliche Ergebnisse wurden nach Transfektion geringerer Mengen an Expressionsplasmid erhalten (Daten nicht gezeigt), wodurch fehlende Effekte der Faltungshelfer durch massive Überexpression von CFTRwt und CFTRmut ausgeschlossen werden konnten.

Die Wirkung der Faltungsmodulatoren VX-809 und Corr4a auf die Proteinnengen wurde zusätzlich auch mittels Immundetektion analysiert. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit CFTRwt- oder CFTRmut-Plasmid transfiziert, für 24 Stunden mit VX-809 oder Corr4a in verschiedenen Konzentrationen behandelt und die Mengen an rekombinantem CFTR-Protein danach jeweils mittels Westernblot analysiert. Hierfür wurden der CFTR-spezifische Antikörper 596 und ein Antikörper gegen das EBNA1-Epitop verwendet, welches an die Sequenz von CFTRwt und CFTRmut angefügt worden war.

Abhängig vom Glykosylierungsgrad der CFTR-Proteine können im Westernblot drei Banden detektiert werden. Die unglykosylierte Form, Bande A, weist im PAA-Gel eine Größe von 130 kDA, die teilweise glykosylierte Form, Bande B, eine Größe von 150 kDA auf. Die vollständig glykosylierte Form von CFTRwt, Bande C, ist etwa 160 kDA groß (Cheng et al., 1990, Farinha et al., 2004). Das CFTRmut-Protein weist im Vergleich zum CFTRwt-Protein eine Reduktion der Menge der C-Bande auf

(van Meegen et al., 2013). Der zur Detektion verwendete Antikörper 596 erkennt sowohl CFTRmut als auch CFTRwt-Protein (van Meegen et al., 2013).

In Abbildung 6 sind die Ergebnisse der Immundetektion (A und C) und deren Quantifizierung (B und D) dargestellt. Mithilfe des CFTR-Antikörpers 596 wurden drei distinkte Banden in Lysaten der transfizierten, aber nicht in denen der untransfizierten Zellen detektiert, allerdings von größerer als der erwarteten Größe. Durch die Behandlung mit VX-809 und Corr4a kam es konzentrationsabhängig zu einem Anstieg der Signale.

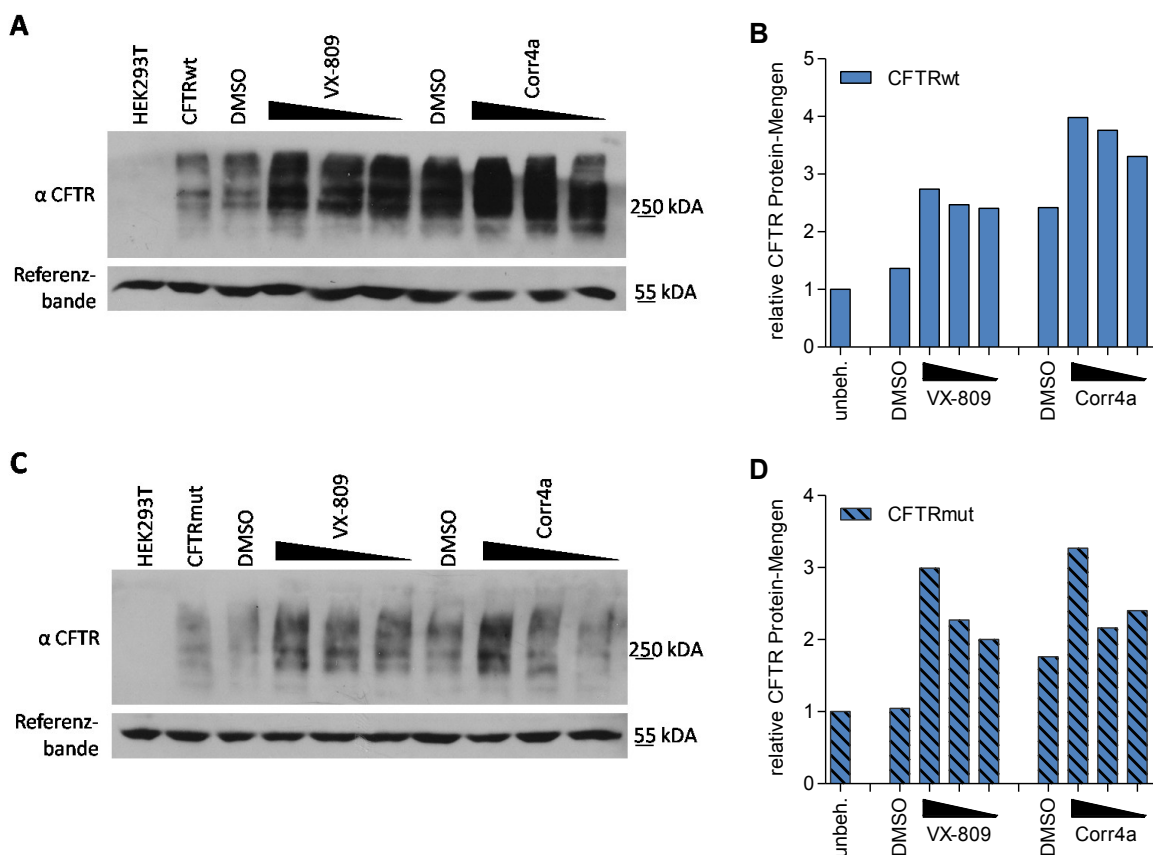


Abbildung 6: Die VX-809- und Corr4a-Behandlung transfizierter Zellen führt zu erhöhten CFTRwt- und CFTRmut-Proteinspiegeln. HEK293T-Zellen wurden jeweils mit 3 µg CFTRwt- oder CFTRmut-Plasmiden transfiziert, anschließend wurden die Zellen entweder unbehandelt weiterkultiviert (unbeh.), oder mit 10; 0,1 oder 0,01 µM VX-809 oder Corr4a, oder mit der jeweils höchsten äquivalenten Menge an DMSO behandelt. Die Zellen wurden nach 24 Stunden mit RIPA-Puffer lysiert, die Zelllysate elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und die Proteine mit Antikörpern detektiert. In (A) und (C) sind die Detektion der Proteine CFTRwt und CFTRmut durch den spezifischen CFTR-Antikörper 596 dargestellt. Die Referenzbande basiert auf einer unspezifischen Bindung des CFTR-Antikörpers 596 an ein Protein im Zellextrakt und wurde als Ladekontrolle verwendet. In (B) und (D) ist die Quantifizierung dargestellt. Die jeweiligen Signale nach Inkubation mit dem CFTR-Antikörper wurden auf die Referenzbanden bezogen und anschließend normalisiert auf die Probe der unbehandelten Zellen. Als negative Kontrolle dienten die Zelllysate der untransfizierten HEK293T-Zellen (erste Spur in A und C). Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse.

Die Quantifizierung der Signale für alle drei CFTRwt- und CFTRmut-Banden wurden zusammengefasst, relativ zur Referenzbande gesetzt und auf das Signal des Extrakts von

unbehandelten, das jeweilige CFTR-Protein exprimierenden Zellen normalisiert (Abbildung 6B). Die Faltungsmodulatoren VX-809 und Corr4a hatten einen Dosis-abhängigen positiven Effekt auf die CFTRwt-Proteinmengen, was den zuvor beschriebenen Beobachtungen entsprach und damit zu erklären ist, dass bei der Synthese von CFTRwt etwa zur Hälfte fehlgefaltetes Protein entsteht (Lukacs et al., 1994, Ward and Kopito, 1994). Die Quantifizierung der Proteinmengen von CFTRmut geschah auf die gleiche Weise (Abbildung 6D) und zeigte ebenso einen Dosis-abhängigen positiven Effekt der Faltungsmodulatoren. Da an die CFTRwt- und CFTRmut-Sequenzen jeweils ein EBNA1-Marker angefügt worden war, wurde der Nachweis mithilfe eines anti-EBNA1-Antikörpers durchgeführt. Dabei kam es zu einer schwächeren Detektion der gleichen Banden als mit dem spezifischen Antikörper 596 (Daten nicht gezeigt).

Diese Untersuchungen zeigten, dass die beiden Faltungsmodulatoren VX-809 und Corr4a Konzentrations-abhängig einen positiven Effekt auf die CFTR- und CFTRmut Proteinmengen hatten.

6.1.5 Die Faltungsmodulatoren haben keinen Einfluss auf die Präsentation der fusionierten Epitope

Im Folgenden wurde ein möglicher Effekt der Faltungsmodulatoren auf die Antigenpräsentation untersucht. Dazu wurden DG75-Zellen mit je 3 µg CFTRwt- oder CFTRmut-Plasmid transfiziert und anschließend für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen VX-809 oder Corr4a inkubiert. Als Vergleichsansätze dienten erneut unbehandelte Zellen bzw. mit 1 % oder 0,01 % DMSO behandelte Zellen. Die APC wurden anschließend mit YVL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen für 16 Stunden ko-kultiviert und danach die IFN γ -Konzentration im Kulturüberstand bestimmt (Abbildung 7A und B).

Die Behandlung der Zellen mit Faltungsmodulatoren führte zu keiner signifikanten Reduktion der T-Zell-Erkennung, sodass insgesamt kein Effekt der Faltungsmodulatoren auf die Antigenpräsentation festgestellt werden konnte. Ähnliche Ergebnisse wurden nach Transfektion von 10 µg CFTR-Plasmiden erhalten (Daten nicht gezeigt).

Um auszuschließen, dass die Faltungsmodulatoren die Antigenpräsentation unspezifisch verstärkten und dieser Effekt eine mögliche Abnahme der Präsentation des Modellantigens überdeckte, wurden DG75-Zellen mit Expressionsplasmiden für das LLW-Epitop transfiziert und vor Zugabe der LLW-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wie oben beschrieben mit den Faltungshelfern behandelt (Daten nicht gezeigt). Ähnlich wie bei CFTR-transfizierten Zellen bewirkte die Zugabe von 1 % DMSO einen leichten Anstieg in der T-Zell-Erkennung, ebenso die Behandlung mit der höchsten Konzentration an VX-809, was wahrscheinlich auf das enthaltene DMSO zurückzuführen war. Eine allgemeine

Verstärkung der Antigenpräsentation durch die Faltungsmodulatoren wurde jedoch nicht beobachtet.

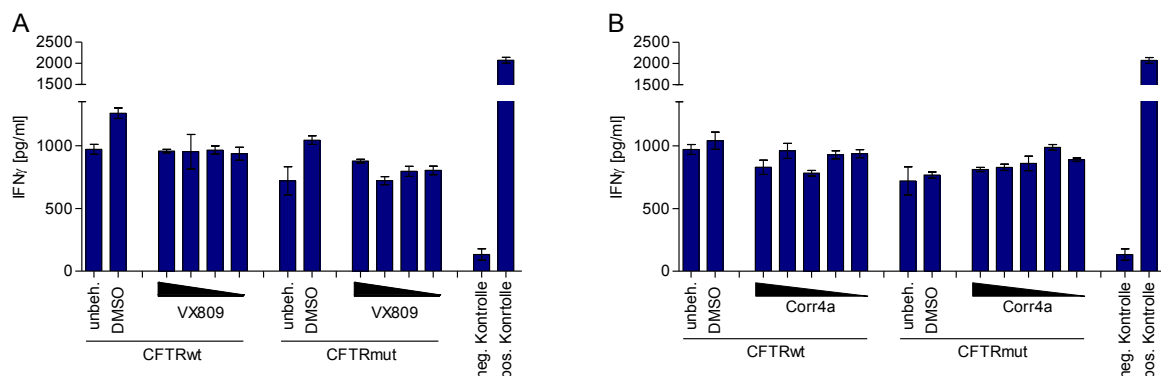


Abbildung 7: Die Faltungsmodulatoren VX-809 und Corr4a haben keinen Effekt auf die Antigenpräsentation. DG75-Zellen wurden mit je 3 μ g CFTRwt- oder CFTRmut-Plasmid transfiziert und anschließend mit steigenden Mengen (10; 1; 0,1; 0,01 und 0,001 μ M) an VX-809 (A) oder Corr4a (B) behandelt oder unbehandelt (unbeh.) belassen, oder mit der Höchstmenge an Lösungsmittel (DMSO) für 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurden die APC für 16 Stunden mit YVL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ko-kultiviert und anschließend die Mengen des T-Zell-Aktivierungsmarkers IFN γ im Überstand mithilfe eines ELISA quantifiziert. Als Negativkontrollen (neg. Kontrolle) dienten untransfizierte Zellen und als Positivkontrollen (pos. Kontrolle) untransfizierte Zellen, die mit YVL-Peptid beladen worden waren. Die Quantifizierung der T-Zell-Erkennung erfolgte durch die Messung der IFN γ -Menge im Überstand der Ko-Kultur mithilfe von ELISA. Diese Versuche wurden viermal wiederholt. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis eines Versuches, die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifach-Bestimmungen.

Diese Ergebnisse lieferten somit keine Hinweise auf eine Rolle von DRiP in der Präsentation von CFTR und sprachen gegen einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen der Stabilität neusynthetisierter Proteine und der Antigenpräsentation.

6.2 Die Bedeutung der prä-mRNA als mögliche Antigenquelle

Die Untersuchungen mit dem Modellantigen CFTR und seiner Mutante lieferten keine Hinweise auf eine Allgemeingültigkeit der DRiP-Hypothese. Daher sollte im Folgenden die Bedeutung von Translationsprodukten als Antigenquelle untersucht werden, die von prä-mRNA abstammen.

6.2.1 Expressionssystem zur Untersuchung des Einflusses von prä-mRNA

Für die Untersuchung des Einflusses von prä-mRNA auf die Antigenpräsentation wurde BZLF1, ein aus EBV-stammendes Transaktivator-Protein, als Modellantigen verwendet. BZLF1 ist ein immundominantes Antigen der Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort. Für diese Untersuchungen standen zwei BZLF1-spezifische CD8⁺ T-Zellklone zur Verfügung, die die T-Zell-Epitope VQTAAVVF in Exon 1 (im Folgenden VQT genannt) und RAKFKQLL in Exon 2 (im Folgenden RAK genannt) erkennen. Das BZLF1-Gen besteht aus 3 Exons und 2 Introns. Die genomische DNA-Sequenz von BZLF1 wurde

auf unterschiedliche Weise verändert, in Abbildung 8 sind die für BZLF1 kodierenden Sequenzen und die eingeführten Veränderungen graphisch dargestellt. In die Sequenz des ersten Introns wurde in den Mutanten 1-8 (M1-M8) das T-Zell-Epitop LLWTLVVLL (im Folgenden LLW genannt) eingefügt. Dieses Epitop stammt aus dem EBV-Protein LMP2A. LLW-spezifische CD8⁺ T-Zellen waren in der Arbeitsgruppe ebenfalls vorhanden. Die kombinatorische Analyse der Präsentation aller drei Epitope durch T-Zellen ermöglichte es, den Beitrag von prä-mRNA-Translationsprodukten zum Antigenpool zu ermitteln.

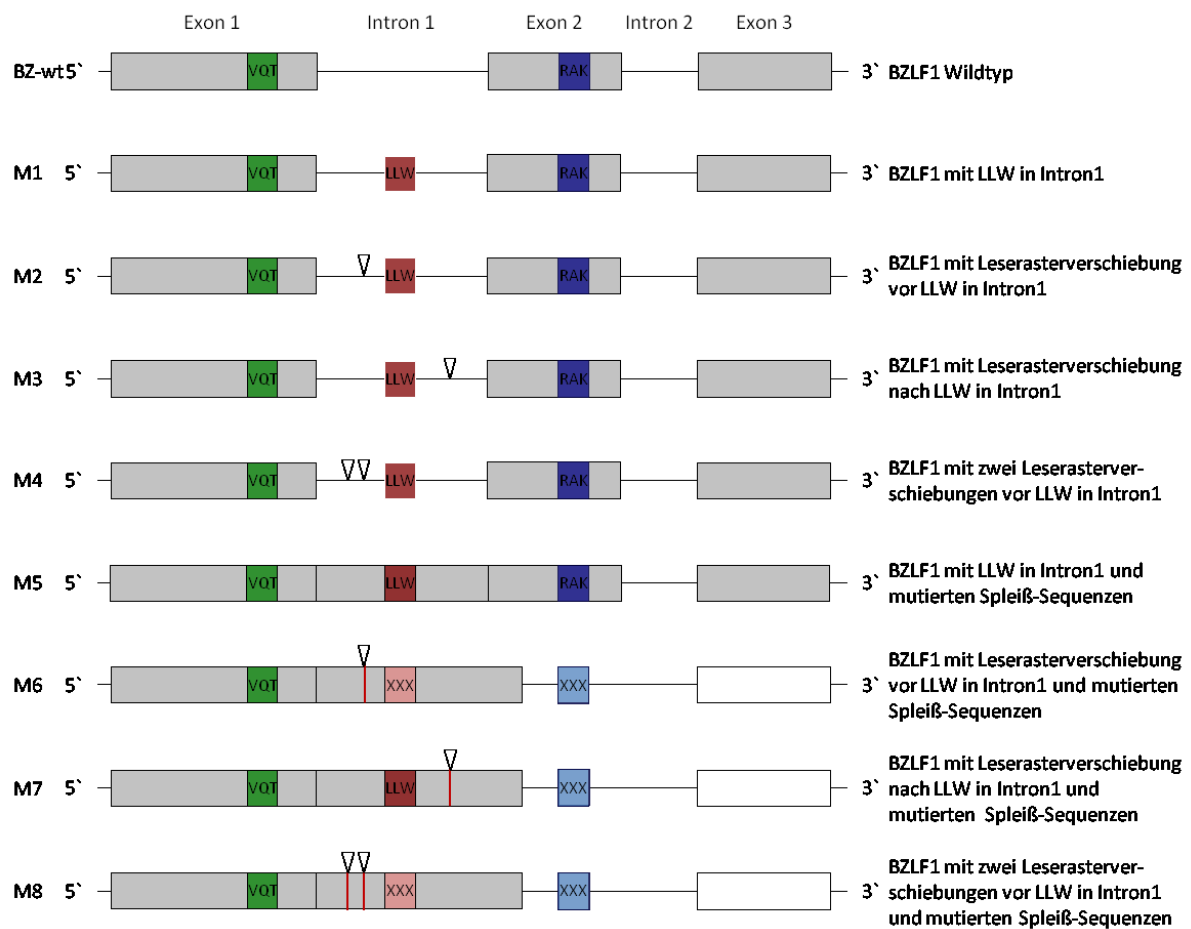


Abbildung 8: Schematische Darstellung des BZLF1 Gens und der eingeführten Veränderungen. Das BZLF1-Gen besteht aus drei Exons und zwei Introns (BZ-wt). Die T-Zellepitope VQT (grün hinterlegt) und RAK (blau hinterlegt) befinden sich in Exon 1 und Exon 2. Das aus LMP2A stammende Epitop LLW (rot hinterlegt) wurde bei den Mutanten M1-M8 in das erste Intron eingefügt. Der Pfeilkopf markiert die Deletion einzelner Basen. Dadurch entstandene Verschiebungen in den Leserastern sind zusätzlich mit einem roten Strich gekennzeichnet. Wegen der vorgeschalteten Einzelbasen-Deletionen kommt es nicht zur Translation des LLW-Epitops in M6 und M8 (mit XXX und einem rosa Hintergrund angezeigt) bzw. des RAK-Epitops in M6, M7 und M8 (mit XXX und einem hellblauen Hintergrund angezeigt). Die erwarteten Genprodukte sind grau hinterlegt.

In M1 befindet sich LLW im gleichen Leseraster wie Exon 1 und 2, in M2, M3 und M4 wurde das Leseraster durch Deletionen verschoben. In M2 wurde die Deletion vor LLW eingefügt, sodass sich LLW nicht mehr im gleichen Leseraster wie VQT befand. Durch diese Deletion konnte allerdings

LLW ausgehend von einem in Intron 1 gelegenen Startkodon translatiert werden. Deshalb wurde in M4 eine zweite Deletion vor LLW eingeführt, sodass das vor LLW liegende, interne Startkodon nicht mehr zur Translation von LLW führen konnte. In M3 lag die Deletion hinter LLW, sodass sich LLW mit VQT, aber nicht mit RAK im gleichen Leseraster befand.

Die Mutanten M5-M8 entsprachen M1-M4, jedoch wurden hier zusätzlich zu den bisher beschriebenen Veränderungen die Spleiß-Sequenzen mutiert, sodass Intron 1 nicht mehr herausgespleißt und daher Teil der mRNA wurde. Diese Veränderung erfolgte in allen vier Konstrukten auf die gleiche Weise: in Spleiß-Donor-Sequenz (GTA zu TCA) und Spleiß-Akzeptor-Sequenz (GAG zu CAA) wurden jeweils Punktmutationen eingeführt.

Durch diese Spleiß-Sequenz-Mutationen kam es bei M6, M7, M8 in Kombination mit den Leserasterverschiebungen zur Entstehung von Stoppkodons innerhalb des zweiten Exons. Durch die Verschiebung des Leserahmens in M6 befand sich die kodierende Sequenz für das LLW-Epitop in einem anderen Leserahmen als das Epitop VQT, besaß aber ein alternatives AUG-Initiationskodon. Die Sequenz M8 dagegen enthielt durch das Einfügen der zweiten Leserahmenverschiebung kein weiteres AUG-Initiationskodon und das Epitop LLW befand sich nicht im gleichen Leserahmen wie das VQT-Epitop.

6.2.2 Die Spleißmutationen reduzieren die Proteinexpression

Der Nachweis der Proteinexpression der verschiedenen BZLF1-Konstrukte erfolgte nach transienter Transfektion der Konstrukte in DG75- oder HEK293T-Zellen mittels Western-Blot (Abbildung 9). Zur Detektion der BZLF1-Proteine wurde ein N-terminal bindender Antikörper verwendet.

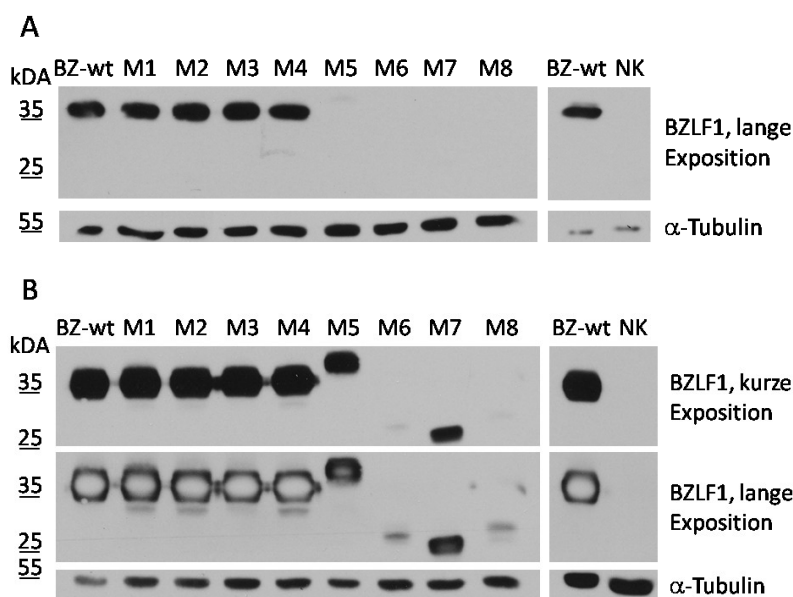


Abbildung 9: Der Nachweis der Expression der verschiedenen BZLF1-Konstrukte. (A) DG75- und (B) HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für BZLF1 (BZ-wt) oder die Mutanten M1-M8 transfiziert, als Negativkontrolle (NK) dienten untransfizierte Zellen. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und die Proteine mithilfe eines N-terminal bindenden BZLF1-spezifischen Antikörpers detektiert. Ein α -Tubulin spezifischer Antikörper diente der Ladekontrolle. Dargestellt ist je ein repräsentativer Western-Blot.

In beiden Zelllinien konnten BZLF1-Wildtyp (BZ-wt) und M1-M4 nachgewiesen werden. Die Proteine M5-M8 konnten in DG75-Zellen jedoch kaum (M5) bzw. nicht (M6, M7 und M8) detektiert werden. Allerdings gelang der Nachweis dieser Proteine in HEK293T-Zellen, vermutlich aufgrund der höheren Transfektionseffizienz. Im Falle von M5 wurde eine Proteinbande mit einem größeren Molekulargewicht als BZ-wt detektiert, da durch die Mutation der Spleiß-Sequenzen auch Intron 1 translatiert wurde. Bei M6, M7 und M8 kam es zur schwachen, jedoch nachweisbaren Expression von kleineren Proteinen, da hier Teile von Exon 2 und 3 fehlten.

6.2.3 Die Spleißmutationen beeinflussen die mRNA-Menge

Parallel zur Proteinexpression wurden auch die mRNA-Mengen von BZ-wt und den Varianten M1-M8 in transfizierten Zellen untersucht, um zu überprüfen, ob die Mutationen einen Einfluss auf die mRNA Stabilität hatten.

Hierfür wurde 24 Stunden nach Transfektion von DG75-Zellen die RNA isoliert, mithilfe von Oligo-dT-Primern die mRNA revers transkribiert und die BZLF1-Transkriptmengen relativ zu den Transkriptmengen der Referenzgene *HMBS*, *HPRT1* und *YWHAZ* mithilfe von qPCR bestimmt und auf die Mengen der mRNA von BZwt normalisiert. Die Oligonukleotide für die qPCR waren komplementär zu Sequenzen in Exon 2 und Exon 3 von BZLF1.

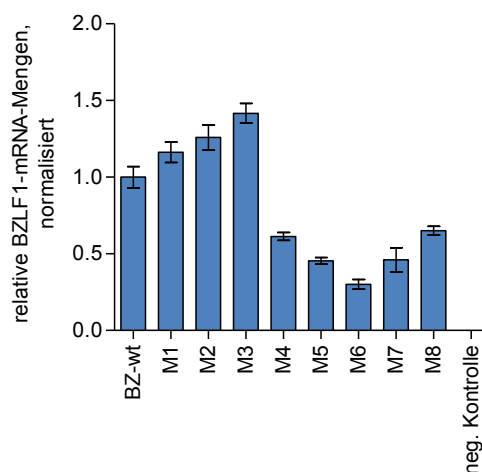


Abbildung 10: Die relativen BZLF1-Transkriptmengen werden durch die eingeführten Mutationen beeinflusst. DG75-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. Als Negativkontrollen (neg. Kontrolle) dienten untransfizierte Zellen. Nach 24 Stunden wurde die RNA extrahiert, die mRNA mithilfe von Oligo-dT-Primern revers transkribiert und anschließend mit spezifischen BZLF1-Oligonukleotiden in der quantitativen *real-time PCR* vervielfältigt. Die Mengen der BZLF1-mRNA wurden in Relation zur mRNA der Referenzgene *HMBS*, *YWHAZ* und *HPRT1* gesetzt. Zusätzlich wurden die jeweiligen mRNA-Mengen auf die Menge der BZwt-mRNA normalisiert. Diese Quantifizierung erfolgte in vier unabhängigen Versuchen, dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis.

Wie in Abbildung 10 gezeigt, wurden etwa doppelt bis dreifach so viele BZLF1-Transkripte in mit BZ-wt, M1, M2 oder M3 transfizierten Zellen detektiert, wie in Zellen, die mit den M4- bis M8-

Expressionskonstrukten transfiziert worden waren. Wieso die Transkriptmengen variierten, ist momentan noch unklar. Eine mögliche Erklärung für die geringeren mRNA Spiegel von M6-M8 könnte in der Generierung eines Stoppkodons in Exon 2 durch die eingeführte Leserasterverschiebung und den dadurch zu erwartenden *Nonsense-mediated decay* (Broгна and Wen, 2009) der mRNAs liegen.

6.2.4 Prä-mRNAs stellen keine effiziente Quelle für Antigene dar

Um festzustellen, ob prä-mRNAs als Quelle für Antigene dienen können, wurden DG75-Zellen mit den verschiedenen BZLF1-Konstrukten sowie den restringierenden HLA-Molekülen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die APC entweder mit RAK-, LLW-, oder VQT-spezifischen CD8⁺ T-Zellen für 16 Stunden ko-kultiviert und danach die IFN γ -Konzentration im Kulturüberstand bestimmt. Die Erkennung durch VQT-spezifische T-Zellen wurde zur Normalisierung der Erkennung durch RAK-spezifische und LLW-spezifische T-Zellen verwendet, da das VQT-Epitop in allen verwendeten DNA-Konstrukten vorhanden war. Somit wurden mögliche Schwankungen in der Transfektionseffizienz ausgeglichen. Die Quantifizierung der VQT-Erkennung ist in Abbildung 11A und die Ergebnisse der Normalisierung sind in Abbildung 11B dargestellt.

Die Erkennung der verschiedenen Transfektanten durch VQT-spezifische CD8⁺ T-Zellen korrelierte dabei weder mit den Protein- noch den mRNA-Mengen.

Die RAK-spezifischen T-Zellen erkannten mit BZ-wt, M1, M2, M3, M4 und M5 transfizierte, aber nicht mit M6, M7 oder M8 transfizierte Zielzellen. Eine Präsentation des RAK-Epitops erfolgte also nur, wenn die Spleiß-Sequenzen nicht mutiert waren (BZ-wt, M1-4), oder wenn nach Mutation der Spleiß-Sequenzen der Leserahmen gewahrt wurde (M5).

Dagegen erkannten die LLW-spezifischen T-Zellen nur APC, die mit M5, M6, M7 oder M8 transfiziert worden waren. Die APC präsentierten folglich nur dann das LLW-Epitop, wenn die Spleiß-Sequenzen mutiert waren. Laut der prä-mRNA-Theorie müsste ebenso eine Präsentation des LLW-Epitops in den übrigen Mutanten erfolgen, dies war aber nicht der Fall. Diese Ergebnisse deuteten daher nicht darauf hin, dass die prä-mRNA eine bedeutende Quelle für Antigene darstellt.

Im Vergleich zu M5, M6 und M7 war die Präsentation des LLW-Epitops nach Transfektion von M8 sehr gering. In M6 und M8 befindet sich das LLW-Epitop nicht im gleichen Leserahmen wie das VQT-Epitop und beide Konstrukte unterscheiden sich nur in der Deletion einer Base vor dem LLW-Epitop.

Die deutlich bessere Erkennung von M6 im Vergleich zu M8 beruht vermutlich auf dem AUG-Initiationskodon vor dem LLW-Epitop in M6. Durch die zusätzliche eingeführte Deletion in M8 kommt

es zwischen diesem Initiationskodon und dem LLW-Epitop zu einer Leserasterverschiebung. Im Falle von M8 wurde die Translation von LLW vermutlich an einem weiter 5' gelegenen und womöglich weniger effizienten Startkodon initiiert.

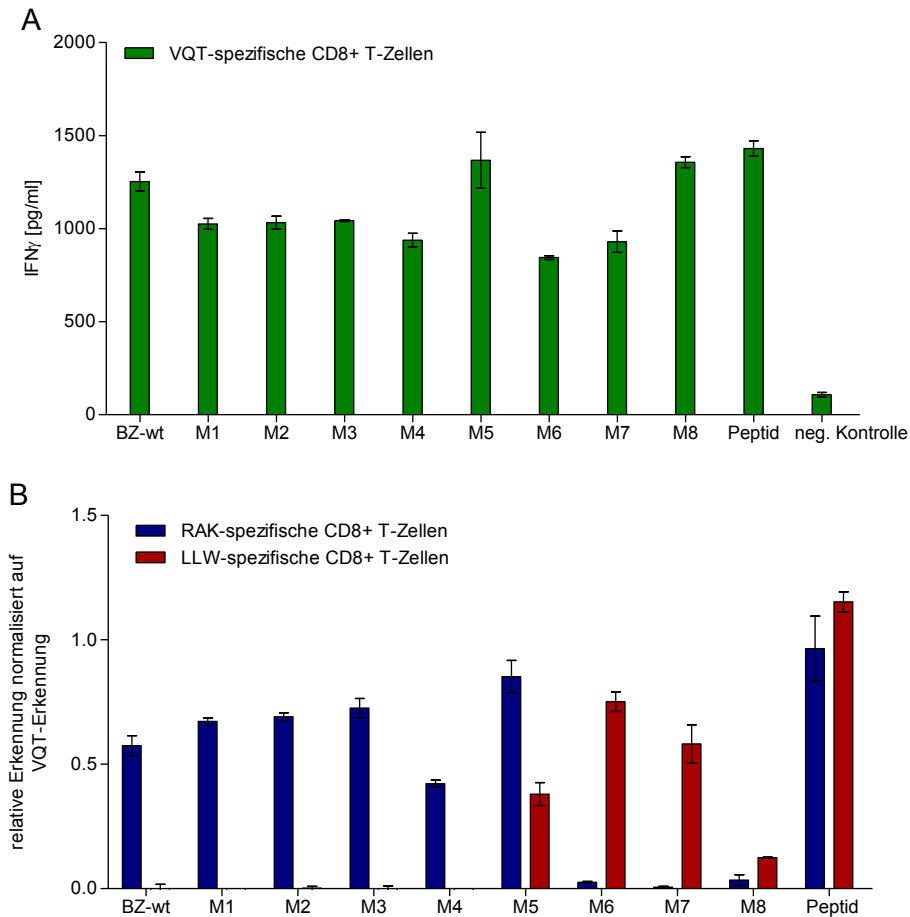


Abbildung 11: Intron-kodierte T-Zellepitope werden nicht effizient auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert. DG75-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für HLA-B0801 und HLA-B1501 sowie BZ-wt, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 oder M8 ko-transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit verschiedenen CD8⁺ T-Zellen für 16 Stunden ko-kultiviert. Die Menge an IFN γ in den Überständen der Ko-Kulturen wurden mithilfe von ELISA quantifiziert. Die Erkennung durch die VQT-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ist in (A) dargestellt. Die Signale von RAK-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und LLW-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden jeweils auf die Signale der VQT-spezifischen CD8⁺ T-Zellen relativiert (B). Als Positivkontrolle (Peptid) dienten Peptid-beladene DG75-Zellen, die nur mit den HLA-Molekülen transfiziert worden waren. Als Negativkontrolle (neg. Kontrolle) dienten mit HLA-Molekülen transfizierte DG75-Zellen, dargestellt ist diese nur in (A). Die Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse eines Einzelversuchs. Die Standardabweichungen beruhen auf Doppel-Bestimmungen.

6.3 Der Einfluss der 3' untranslatierten Regionen auf die Präsentation von Modellantigenen

Neben der fehlenden Korrelation der Antigenpräsentation mit der Proteinmenge lieferten die Versuche zur Rolle der prä-mRNA auch keine Hinweise auf eine Korrelation der Antigenpräsentation mit der Transkriptmenge.

6.3.1 Modulation der mRNA-Stabilität durch unterschiedliche 3' untranslatierte Regionen

Um den Einfluss der mRNA-Stabilität auf die Präsentation von BZLF1 zu untersuchen, ohne Modifikationen im kodierenden Bereich einzuführen, wurde an die genomische Sequenz von BZLF1 die 3' untranslatierten Regionen (3'UTR) von IFN γ und β -Globin angefügt, für die destabilisierende bzw. stabilisierende Eigenschaften auf die jeweilige mRNA beschrieben wurden (Yu and Russell, 2001, Mavropoulos et al., 2005, Jiang et al., 2006).

Die 3'UTR vieler mRNAs enthalten sogenannte AU-reiche Elemente (ARE), die sowohl die Stabilität als auch die Effizienz der mRNA Translation beeinflussen können (Anderson, 2010). Für die IFN γ 3'UTR ist beschrieben, dass das Enzym GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) durch das Binden bestimmter ARE die Translation der IFN γ mRNA negativ beeinflusst (Nagy and Rigby, 1995, Chang et al., 2013). In der IFN γ -3'UTR sind zwei ARE beschrieben (Villarino et al., 2011). Zur Untersuchung des Einflusses der Bindung von ARE in der IFN γ -3'UTR auf die Präsentation von Antigenen wurden diese mutiert (AREm).

Die Expression dieser Konstrukte erfolgte nach transienter oder stabiler Transfektion von Zielzellen. Die hierfür verwendeten Expressionsplasmide sind in Abbildung 12A und B, die verwendeten 3'UTR sind in Abbildung 12C dargestellt. Im Gegensatz zu transient transfizierten Zellen ermöglichte die konditionale Expression der BZLF1-Varianten in stabilen Transfektanten eine genaue Untersuchung der Stabilität der mRNA nach Abschaltung der Expression.

Grundlage für die Induzierbarkeit ist ein Tetracyclin-abhängiger Promotor (Tet-Promotor), der durch Zugabe von Tetracyclin oder dessen Derivat Doxycyclin eingeschaltet und durch Auswaschen wieder abgeschaltet werden kann. Der Promotor ist bidirektional und aktiviert gleichzeitig die auf beiden Seiten des Promotors liegenden Gene, zum einen BZLF1 mit den verschiedenen 3'UTR und zum anderen das Membranprotein NGFR und das Indikatorprotein GFP, die von einer bi-cistronischen RNA translatiert werden. Der plasmidale Replikationsursprung oriP sowie EBNA1 von EBV

gewährleisten den Verbleib des Plasmids in transfizierten Zellen als Episom, ein Puromycin-Resistenzgen ermöglicht die Selektion transfizierter Zellen.

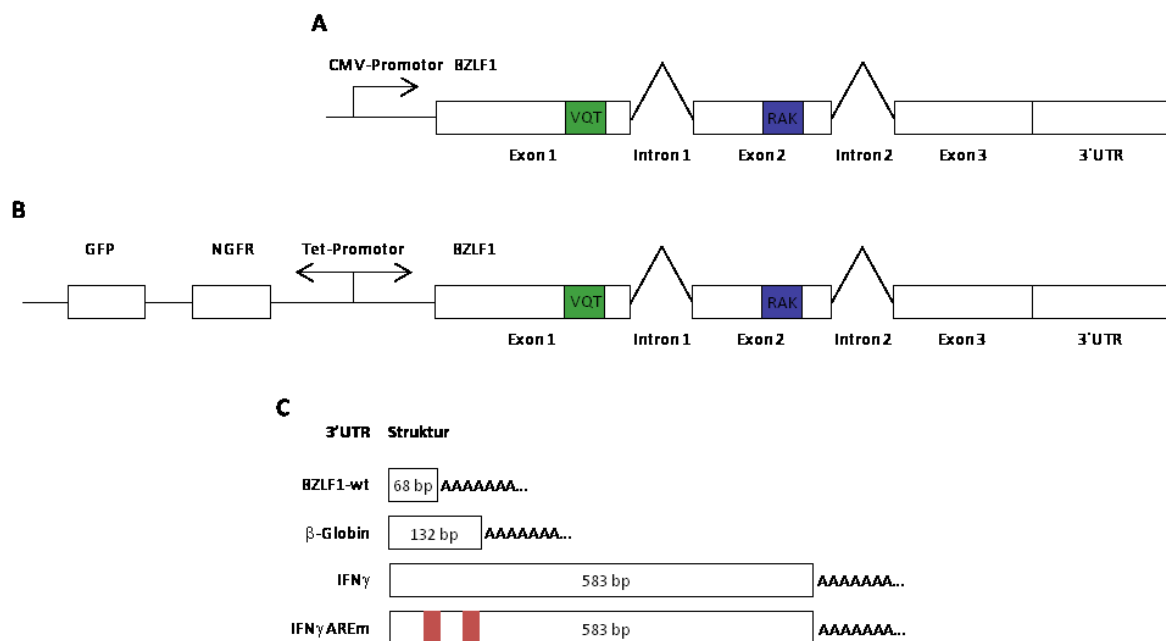


Abbildung 12: Schematische Darstellung der BZLF1-Expressionskonstrukte und der verschiedenen 3'UTRs. Das BZLF1-Gen besteht aus drei Exons und zwei Introns. Unmittelbar an das letzte Exon wurden die verschiedenen 3'UTR angefügt. In den für die transiente Transfektion verwendeten Plasmiden (A) befanden sich die verschiedenen BZLF1-Varianten unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV *immediate early* Promotors. Für die konditionale Expression der BZLF1-Varianten in stabil transfizierten Zelllinien wurden die verwendeten Konstrukte unter die Kontrolle des Tetracyclin-induzierbaren, bi-direktionalen (Tet) Promotors (B) gestellt. Die Struktur der angefügten 3'UTR BZLF1-wt, β -Globin, IFN γ und IFN γ AREm ist in (C) schematisch dargestellt. Unterhalb aller vier 3'UTR folgte eine BGH-Poly-A-Sequenz, die für die Polyadenylierung der RNA sorgte. Die in der IFN γ -3'UTR eingeführten Mutationen in den AU-reichen Elementen (AREm) sind rot gekennzeichnet.

6.3.2 Der Einfluss der unterschiedlichen 3'UTR auf die Präsentation des Modellantigens

Der Einfluss von verschiedenen 3'UTR auf die Präsentation des Modellantigens wurde zunächst nach transients Transfektion von DG75-Zellen untersucht. Neben den verschiedenen BZLF1-Konstrukten wurden zwei verschiedene Konstrukte ko-transfiziert. Eines kodierte für das Restriktionsmolekül HLA-B*0801. Ein zweites diente der Normalisierung der Transfektionseffizienz und kodierte für das aus LMP2A stammende und auf HLA-A*0201 präsentierte T-Zellepitop LLW. Die Erkennung des LLW-Epitops durch spezifische CD8⁺ T-Zellen wurde als Surrogat für die Effizienz der Transfektion verwendet.

Während die Präsentation des Kontrollepitops kaum variierte, wurde die Effizienz der Präsentation des BZLF1-RAK Epitops von der angefügten 3'UTR beeinflusst (Abbildung 13A). Die auf die

Transfektionskontrolle normalisierten Werte für die Präsentation von RAK (Abbildung 13B) zeigten eine deutliche Abnahme in der T-Zellerkennung nach der Transfektion des Konstrukts mit der IFN γ -3'UTR.

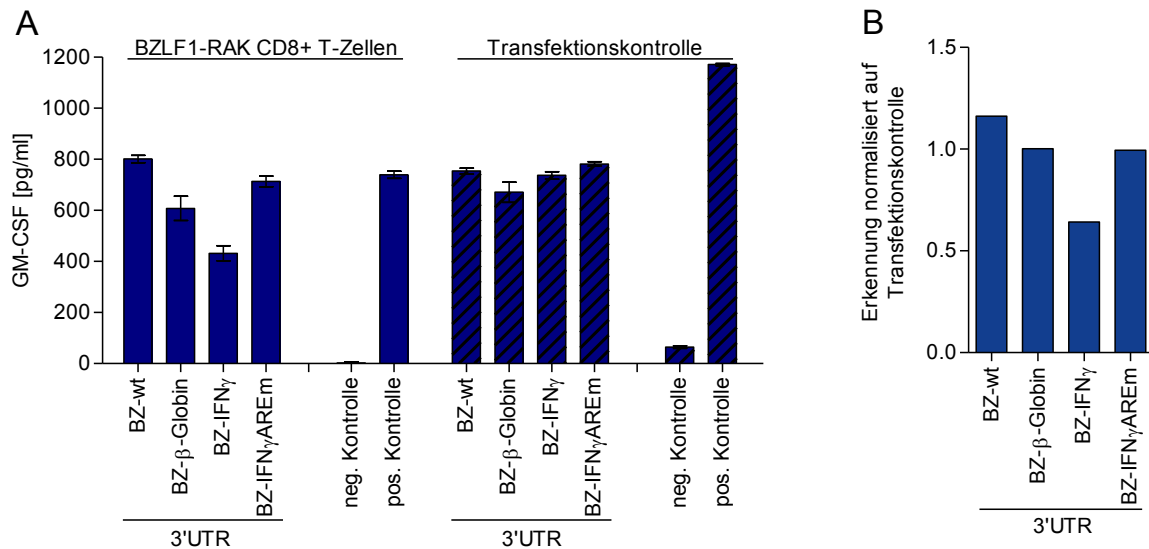


Abbildung 13: Die Präsentation des RAK-Epitops variiert in Abhängigkeit von der 3'UTR. DG75-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für HLA-B*0801, LLW-Epitop und die BZLF1-Varianten mit den unterschiedlichen 3'UTRs (BZ-wt, BZ-β-Globin, BZ-IFN γ , BZ-IFN γ AREm) ko-transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit verschiedenen T-Zellen für 16 Stunden ko-kultiviert. (A) Die Menge an GM-CSF in den Überständen der Ko-Kulturen wurden mithilfe von ELISA quantifiziert. Als Positivkontrollen (pos. Kontrolle) dienten Zellen, die nur mit dem Expressionskonstrukt für das restringierende HLA-Molekül B*0801 transfiziert und mit RAK-Peptid beladen worden waren. (B) Die Erkennung durch die RAK-spezifischen T-Zellen wurde mithilfe der Transfektionskontrolle (LLW-spezifische T-Zellen) normalisiert. Diese Versuche wurden dreimal wiederholt, gezeigt werden die repräsentativen Ergebnisse eines Einzelversuchs. Die Standardabweichungen waren das Ergebnis von Doppel-Bestimmungen.

Parallel dazu wurde die Antigenpräsentation der stabil transfizierten Zelllinien untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit verschiedenen Mengen Doxycyclin behandelt. Nach 24 Stunden wurde das Doxycyclin durch Waschen entfernt und die Zellen mit den VQT-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ko-kultiviert. Die Erkennung durch die T-Zellen ist in Abbildung 14A dargestellt. Die Erkennung und somit die Präsentation des BZLF1-Antigens korrelierte mit der für die Induktion verwendeten Menge an Doxycyclin. Die Intensität der Antigenpräsentation variierte jedoch von Zelllinie zu Zelllinie.

Da diese Zelllinien unabhängig voneinander etabliert worden waren, waren Unterschiede im proportionalen Anteil und in der Induzierbarkeit der transfizierten Zellen möglich. Deshalb wurde parallel zur Antigenpräsentation die Induzierbarkeit der Zelllinien anhand des GFP-Signals durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 14B).

Der Anteil an GFP-positiven Zellen variierte zwischen den verschiedenen Zelllinien, korrelierte aber mit der T-Zellerkennung. Da Antigenpräsentation und GFP-Expression nicht miteinander verrechnet

werden konnten, konnten in diesem stabilen Zellsystem keine Aussagen zu Unterschieden in der Antigenpräsentation gemacht werden.

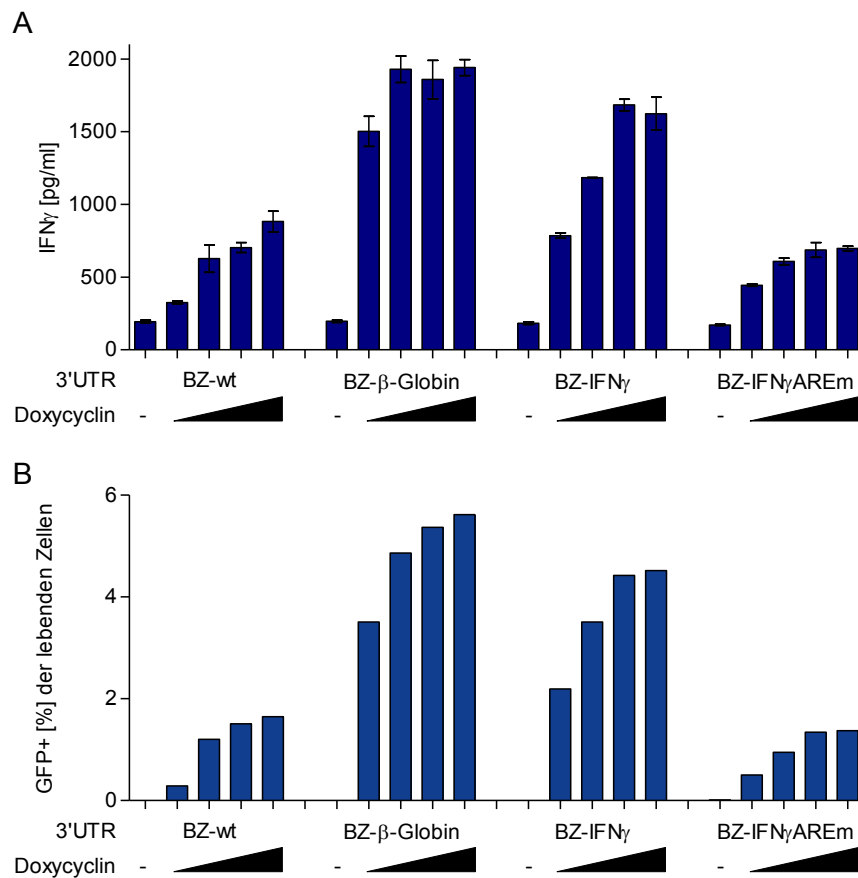


Abbildung 14: Antigenpräsentation und GFP-Signal korrelieren mit der Doxycyclin-Induktion der stabil transfizierten Zelllinien. Die mit BZ-wt-, BZ- β -Globin-, BZ-IFN γ - und BZ-IFN γ AREm-3'UTR stabil transfizierten Zelllinien wurden nicht (-) oder mit 100, 200, 300 und 400 ng/ml Doxycyclin für 24 Stunden behandelt und anschließend gewaschen. (A) Ein Teil der Zellen wurde mit VQT-spezifischen CD8⁺ T-Zellen für 16 Stunden kulturell kultiviert. Die Menge des von den T-Zellen ausgeschütteten IFN γ wurde mithilfe eines ELISA bestimmt. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifach-Bestimmungen. (B) Ein anderer Teil der induzierten Zellen wurde durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist der Anteil GFP-positiver Zellen. Die parallelen Untersuchungen beider Parameter wurden jeweils dreimal durchgeführt, dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs.

6.3.3 Der Einfluss der 3'UTR auf die Protein-Expressionslevel

Da nach transients Transfektion die Antigenpräsentation in Abhängigkeit von den angefügten 3'UTR variierte, wurde untersucht, ob auch die Proteinexpression unterschiedlich war. Wie zuvor wurden DG75-Zellen mit den verschiedenen Plasmiden transfiziert. Ebenso wurden die stabilen GBW3-Zelllinien mit Doxycyclin induziert und die Zellen jeweils nach 24 Stunden lysiert. Mittels Western-Blot-Analysen wurden die Mengen an BZLF1, α -Tubulin (Abbildung 15A) und GFP (Daten nicht gezeigt) bestimmt.

Sowohl in den transient wie auch in den stabil transfizierten Zellen bewirkte BZ- β -Globin-3'UTR eine höhere Proteinexpression als die drei anderen 3'UTR (Abbildung 15A und Daten nicht gezeigt), was besonders nach Normalisierung der Signale auf die Ladekontrolle α -Tubulin mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ sichtbar wurde (Abbildung 15B und C). BZ-IFN γ -3'UTR führte nicht zu niedrigeren BZLF1-Proteinmengen, obgleich die Präsentation des RAK-Epitops in den transient transfizierten Zellen verringert war. Die durch die 3'UTR bedingten Unterschiede in den BZLF1-Expressionsniveaus korrelierten somit nicht mit der Antigenpräsentation.

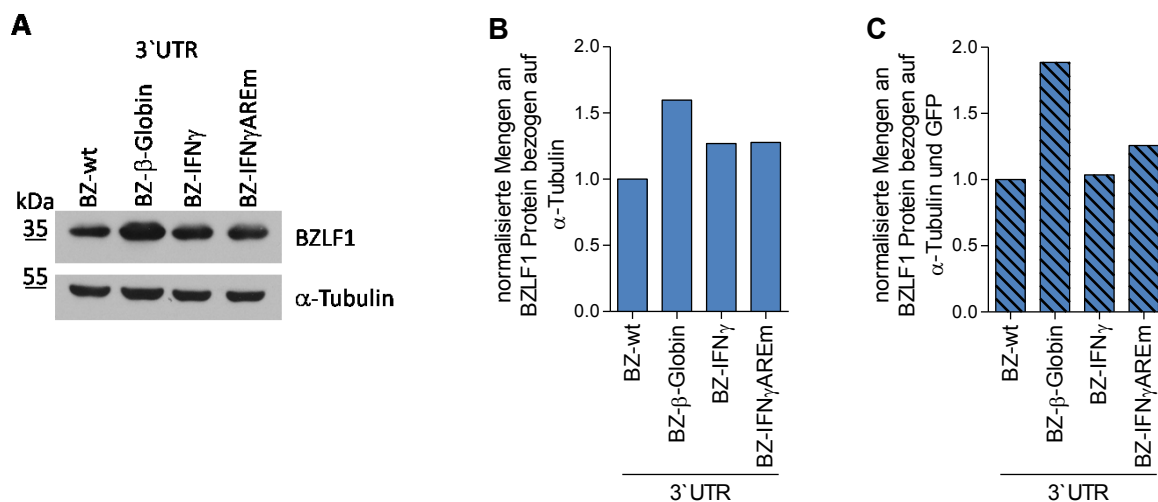


Abbildung 15: Die BZLF1 Proteinexpression in Abhängigkeit von den 3' UTRs. (A) DG75 Zellen wurden mit den vier verschiedenen BZLF1-3'UTR-Plasmiden (BZ-wt, BZ- β -Globin, BZ-IFN γ , BZ-IFN γ AREm) transfiziert und die Zellen 24 Stunden später lysiert. Die Zelllysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit BZLF1-spezifischen (BZLF1) bzw. α -Tubulin-spezifischen (α -Tubulin) Antikörpern inkubiert. (B) Die Intensität der Signale wurde mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ quantifiziert. Das BZLF1-Signal wurde auf das Signal der Ladekontrolle α -Tubulin bezogen und auf das Signal der BZLF1-Wildtyp (BZwt)-Probe normalisiert. In (C) wurden stabil transfizierte GBW3-Zellen für 24 Stunden mit jeweils 200 ng/mL Doxycyclin induziert und anschließend lysiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden BZLF1, GFP und α -Tubulin mittels spezifischer Antikörper in den Lysaten nachgewiesen. Dargestellt ist die Quantifizierung der Mengen an BZLF1-Protein bezogen auf α -Tubulin und GFP und normalisiert auf die BZwt-Probe. (A) und (B) wurden dreimal und (C) zweimal durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse.

6.3.4 Die Stabilität der mRNA ist abhängig von der 3'UTR

Schließlich wurde der Einfluss der verschiedenen 3'UTR auf die Stabilität der mRNA bestimmt, indem die mRNA-Mengen in den vier GBW3-Zelllinien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion analysiert wurden. Hierfür wurden die Zellen für 24 Stunden mit Doxycyclin induziert, anschließend gewaschen und zum Zeitpunkt 0, 8 und 24 Stunden geerntet. Nach reverser Transkription wurde die Menge an BZLF1-mRNA, GFP-mRNA, und mRNA der drei Referenzgene *HMBS*, *YWHAZ* und *HPRT1* durch qPCR bestimmt.

Abbildung 16A zeigt die Menge an BZLF1- und GFP-mRNA relativ zur mRNA-Menge der Referenzgene. Aufgrund unterschiedlicher Transfektionsraten variierte die Menge der BZLF1-mRNA und der GFP-mRNA zwischen den GBW3-Zelllinien deutlich. Deshalb wurde die Menge der BZLF1-mRNA in Relation zur Menge der GFP-mRNA gesetzt. Um die Stabilität der mRNA zu analysieren, wurde zusätzlich die mRNA-Menge jeder Zelllinie auf die Menge zum Zeitpunkt der Induktion (0 Stunden) normalisiert (siehe Abbildung 16B).

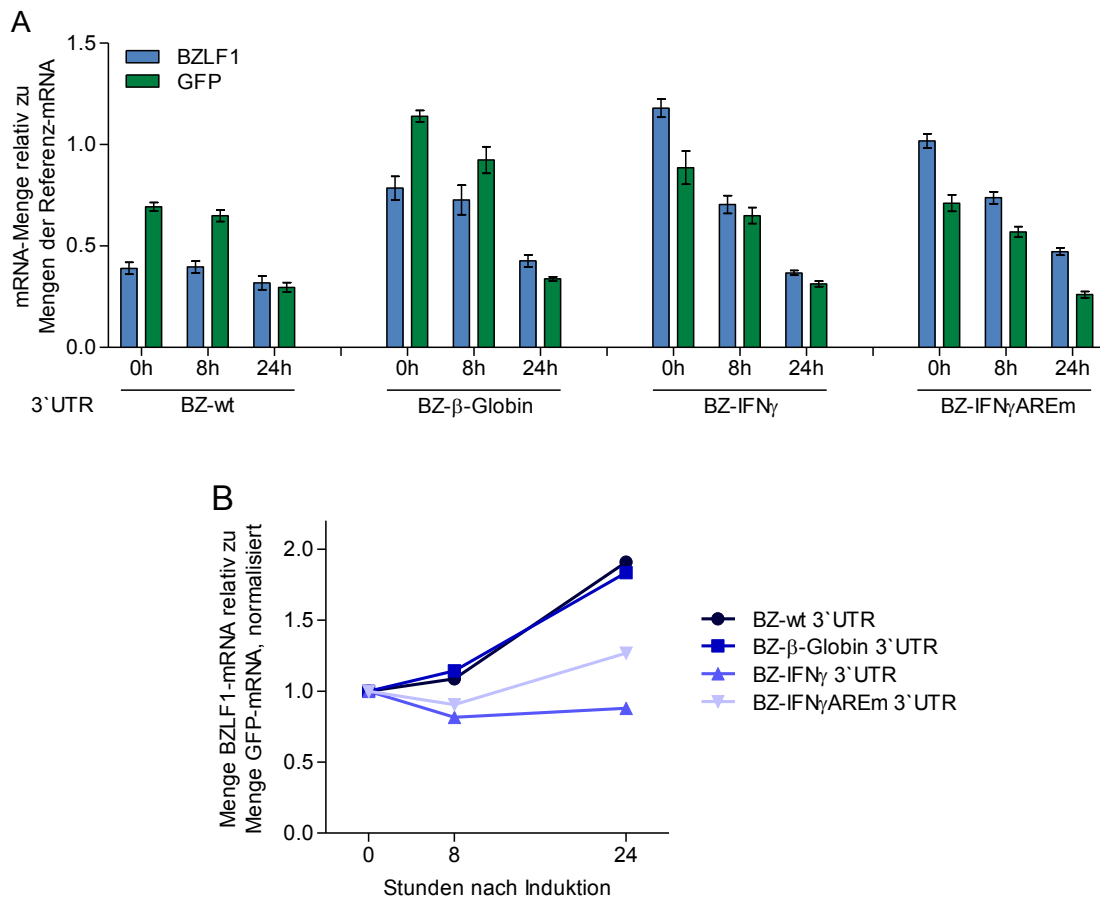


Abbildung 16: Die 3'UTRs beeinflussen die Stabilität der BZLF1 mRNAs. Die mit den verschiedenen BZLF1-Konstrukten stabil transfizierten GBW3-Zellen wurden für 24 Stunden mit je 200 ng/mL Doxycyclin induziert, dann wurde das Doxycyclin ausgewaschen und zu den Zeitpunkten 0, 8 und 24 Stunden nach Induktion Proben entnommen. Die RNA dieser Proben wurde extrahiert, mithilfe von Oligo-dT-Nukleotiden revers transkribiert und die cDNA mittels qPCR quantifiziert. (A) zeigt die Abundanz der BZLF1-mRNA und GFP-mRNA relativ zu den Referenzgenen. In (B) wurde die Menge der BZLF1-mRNA auf die Menge der GFP-mRNA bezogen und auf den Zeitpunkt 0 Stunden normalisiert. Die Bestimmung der mRNA-Mengen für die Zeitpunkte 0, 8 Stunden nach Induktion wurde insgesamt dreimal durchgeführt, einmal davon wurde zusätzlich der Zeitpunkt 24 Stunden nach Induktion bestimmt.

Die Menge der mRNA von BZ-β-Globin-3'UTR unterschied sich 8 und 24 Stunden nach der Induktion nicht von der Menge der BZ-wt-mRNA, in beiden Fällen war diese stabiler als die GFP-mRNA. Im Gegensatz dazu war die Menge der mRNA von BZ-IFN γ -3'UTR 8 und 24 Stunden nach Induktion relativ zur Menge der GFP-mRNA geringer. Bezogen darauf war die Menge der mRNA mit mutierter

BZ-IFN γ -3'UTR 24 Stunden nach Induktion deutlich erhöht. Im Vergleich zur unmutierten BZ-IFN γ -3'UTR stabilisierte folglich die Mutation der ARE in der BZ-IFN γ AREm-3'UTR die mRNA.

Diese Unterschiede in der Stabilität der mRNAs korrelierten nur scheinbar mit der unterschiedlichen Präsentation der Antigene nach transienter Transfektion der verschiedenen 3'UTR-Konstrukte. Die geringere Antigenpräsentation nach Expression von BZ-IFN γ -3'UTR korrelierte zwar mit der geringeren Stabilität der mRNA. Dagegen war die T-Zellerkennung von BZ-wt und BZ-IFN γ AREm-3'UTR transfizierter Zellen nahezu identisch, obwohl die BZ-IFN γ AREm-3'UTR mRNA eine deutlich geringere Stabilität aufwies. Die Ergebnisse zeigen daher, dass die Antigenpräsentation nicht strikt von der Abundanz der mRNA abhängig sein konnte, sondern mit der 3'UTR der mRNA im Zusammenhang stand.

6.4 Untersuchung des Einflusses von flankierenden Sequenzen auf die Antigenpräsentation eines Modellantigens auf MHC-Klasse-II-Molekülen

In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurden Parallelen in der Präsentation von intrazellulären Antigenen auf MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen festgestellt. In beiden Fällen werden hauptsächlich neusynthetisierte Antigene präsentiert und in beiden Fällen wird die Präsentation durch Polyubiquitinylierung gesteuert, wobei die Ubiquitinylierung nicht am Antigen selbst erfolgt (Pfister, 2012, Fiebiger, 2013). Deshalb wurde postuliert, dass Antigene, die endogen auf MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, von einem Adaptermolekül gebunden werden, welches die Ubiquitin-abhängige Präsentation vermittelt.

Damit Antigene von diesem hypothetischen Adapterprotein gebunden werden können, sollten sie eine gewisse Länge und bestimmte biochemische Eigenschaften aufweisen. Um die Hypothese des Adapterproteins zu testen, wurde im Folgenden untersucht, ob Antigene eine bestimmte Länge oder Aminosäure-Sequenz besitzen müssen, um effizient auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert zu werden.

6.4.1 Endogene Expression von modifizierten und verkürzten NeoR-Proteinen und deren Auswirkungen auf die MHC-Klasse-II Präsentation

Für diese Untersuchungen wurde das aus Bakterien stammende Protein Neomycin-Phosphotransferase II (NeoR) als Modellantigen verwendet. Nach Expression von NeoR in APC wird

das Epitop mit der Sequenz DRYQDIALATRDIA (DRY) auf HLA-DPB1*0301 präsentiert, was mit Hilfe von DRY-spezifische CD4⁺ T-Zellen überprüft werden konnte.

Um zu untersuchen, ob die Präsentation des Antigens durch Veränderungen am Protein beeinflusst werden, wurden APC mit verschiedenen NeoR-Varianten transfiziert und nach 24 Stunden mit den DRY-spezifischen CD4⁺ T-Zellen ko-kultiviert.

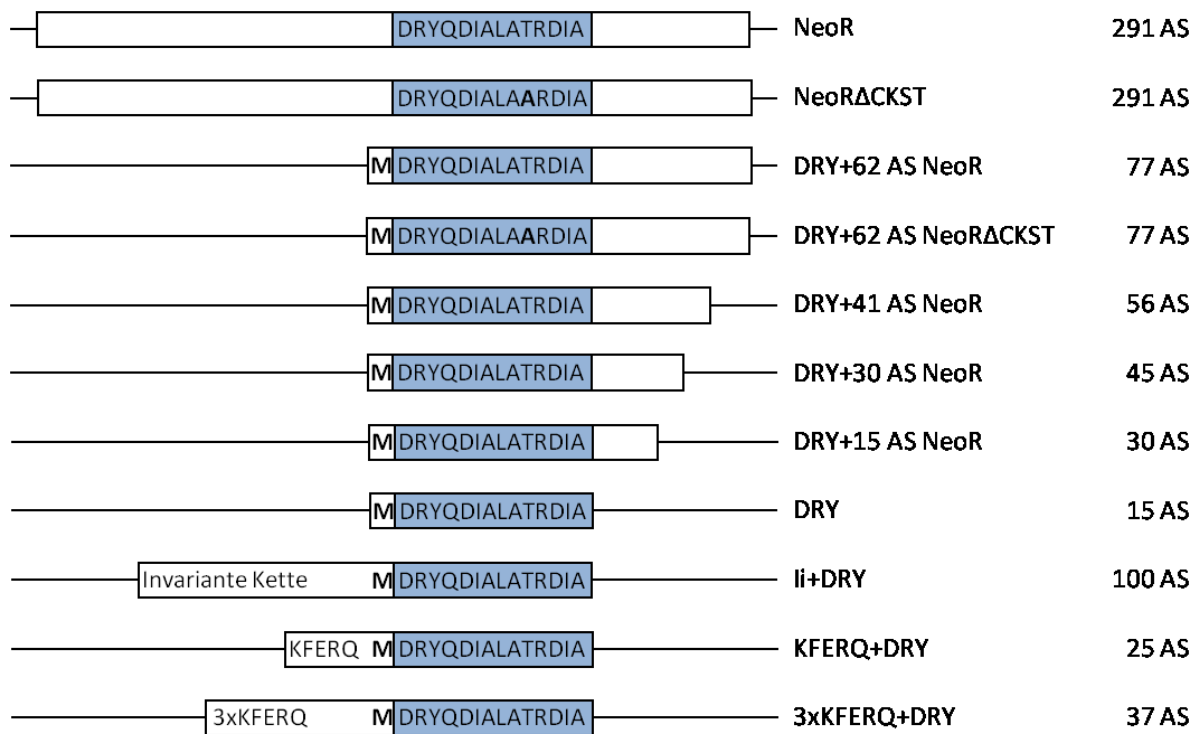


Abbildung 17: Schematische Darstellung der verschiedenen NeoR-Konstrukte. Die Sequenzen sind mit dem Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren beschriftet. Das DRYQDIALATRDIA-Epitop (DRY), das auf HLA-DPB1*0301 präsentiert wird, ist blau hinterlegt. Die Länge der Sequenz in Aminosäuren (AS) ist jeweils rechts neben dem Konstrukt angegeben. Δ CKST beschreibt die Mutation der gesamten Sequenz, bei der alle ubiquitinylisierbaren Aminosäuren (C = Cystein, K = Lysin, S = Serin und T = Threonin) zu Argininen oder Alaninen mutiert waren. Alle Leserahmen beginnen mit dem Initiationskodon Methionin (M). Der Name der Konstrukte beschreibt, wie viele Aminosäuren an welche Position der NeoR-Sequenz angefügt wurden. Mit li ist die Invariante Kette annotiert. KFERQ ist die Erkennungssequenz für die Chaperon-assistierte Autophagie, 3x KFERQ ist die dreifache Wiederholung dieser Sequenz.

Die verwendeten NeoR-Varianten sind in Abbildung 17 und die Quantifizierung der Aktivierung der T-Zellen in Abbildung 18 dargestellt. NeoR besteht aus 291 Aminosäuren. Die endogene Expression des Volllängenproteins führte zu einer Präsentation des DRY-Epitops auf den APC. In der Mutante NeoR Δ CKST waren die ubiquitinylisierbaren Aminosäuren Cystein (C), Lysin (K), Serin (S) und Threonin (T) gegen Alanine oder Arginine ausgetauscht, dies betraf auch eine Aminosäure innerhalb des DRY-Epitops. Dieser Aminosäureaustausch führte zu einer verstärkten Erkennung des Epitops durch die T-Zellen (Daten nicht gezeigt) und deshalb auch zu einer deutlich besseren Erkennung NeoR Δ CKST transfizierter Zielzellen.

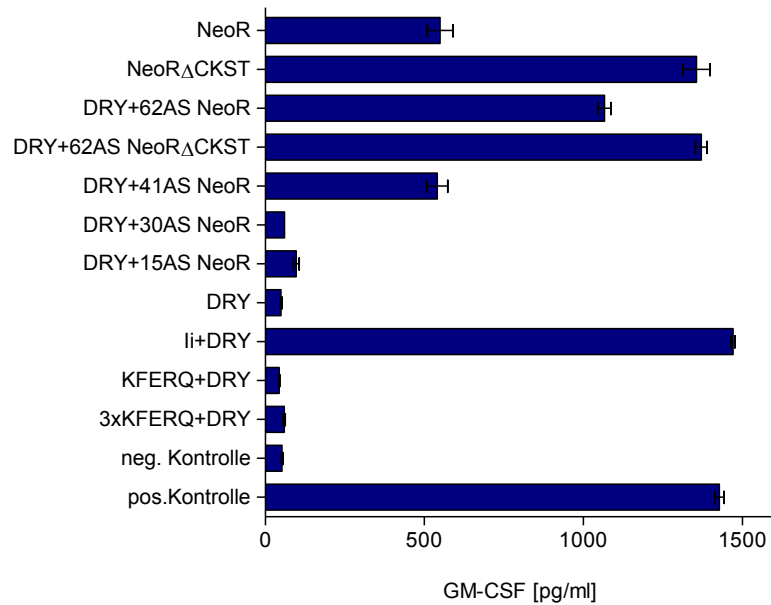


Abbildung 18: Die Länge der kodierenden Sequenzen hat einen Einfluss auf die Präsentation des DRY-Epitops. DG75 wurden mit jeweils 10 μ g des für das HLA-Molekül DPB1*0301 kodierenden Plasmids und 10 μ g eines für die NeoR-Varianten kodierenden Plasmids transfiziert und nach 24 Stunden mit DRY-spezifischen CD4⁺ T-Zellen für 16 Stunden ko-kultiviert. Die Menge an ausgeschüttetem GM-CSF wurde anschließend mithilfe eines ELISA gemessen. Als Negativkontrolle (neg. Kontrolle) dienten mit Leervektor transfizierte Zellen, als Positivkontrolle (pos. Kontrolle) dienten mit HLA-DPB1*0301 transfizierte Zellen, die mit dem DRY-Peptid beladen worden waren. Diese Untersuchungen wurden für jedes Konstrukt mindestens fünfmal durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis. Die Standardabweichung ergab sich aus Doppelbestimmungen.

Das Konstrukt DRY+62AS NeoR war eine verkürzte Version von NeoR und bestand aus dem DRY-Epitop und der 62 Aminosäuren langen, C-terminalen NeoR-Sequenz. Auch von diesem Konstrukt gab es eine entsprechende Δ CKST-Mutante. Die Expression der verkürzten Variante von NeoR steigerte die Präsentation von DRY deutlich im Vergleich zum Vollängenprotein und darüber hinaus wurde die Δ CKST-Mutante nochmals deutlich besser von den T-Zellen erkannt. Eine weitere Verkürzung der NeoR-Sequenz auf 41, 30, oder 15 zusätzliche Aminosäuren führte jedoch zu einer kontinuierlichen Verringerung der T-Zellerkennung.

Zellen, die mit dem DRY-Epitop ohne jegliche flankierenden Sequenzen transfiziert worden waren, wurden von den T-Zellen nicht erkannt. Wurde das DRY-Epitop jedoch durch Fusion an die Invariante Kette (Ii) ins vesikuläre Kompartiment dirigiert, so kam es zu einer sehr starken Erkennung durch die T-Zellen.

Laut einer Beschreibung von Zhou *et al.* werden intrazelluläre Peptide über LAMP2a in Lysosomen transportiert und effizient auf MHC-Klasse-II-Moleküle beladen (Zhou et al., 2005). Um eine Beteiligung dieses Präsentationswegs näher zu untersuchen, wurde das die Chaperon-assistierte Autophagie vermittelnde Erkennungsmotiv KFERQ einmal oder dreimal N-terminal an das DRY-Epitop angefügt. Diese Modifikationen führten jedoch auch nicht zu einer Erkennung der

transfizierten Zellen durch die T-Zellen. Die Chaperon-assistierte Autophagie schien somit für die Präsentation des DRY Epitops unbedeutend zu sein.

6.4.2 Repetitive flankierende Regionen beeinflussen die Präsentation des DRY-Epitops auf MHC-Klasse-II-Molekülen bei endogener Expression

Die Ergebnisse der Transfektion von verschiedenen NeoR-Konstrukten implizierten einen Einfluss der Länge der flankierenden Sequenzen auf die Präsentation des Antigens. Deshalb wurde eine Reihe von verschiedenen Konstrukten hergestellt, wie in Abbildung 19 schematisch dargestellt.

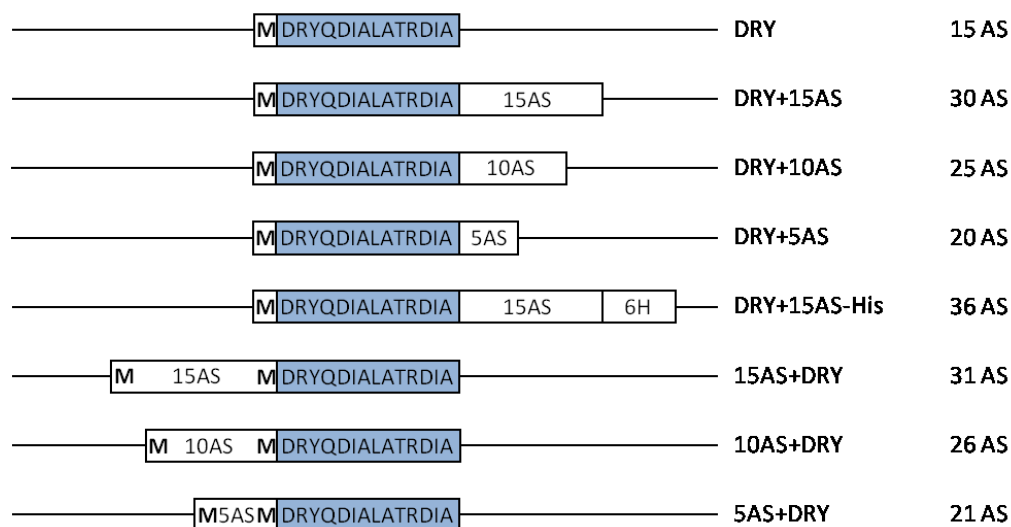


Abbildung 19: Schematische Darstellung der an das DRY-Epitop angefügten flankierenden Sequenzen. Die Sequenzen sind mit dem Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren beschriftet. Blau hinterlegt ist die Sequenz des DRYQDIALATRDIA-Epitops (DRY), das auf HLA-DPB1*0301 präsentiert wird. Die Länge der Sequenz in Aminosäuren (AS) ist jeweils rechts neben dem Konstrukt angegeben. Alle Leserahmen beginnen mit dem Initiationskodon Methionin (M). Der Name der Konstrukte beschreibt, wie viele Aminosäuren (AS) vor oder nach dem DRY-Epitop angefügt wurden.

Jeweils beginnend mit dem Initiationskodon Methionin wurden vor oder nach dem DRY-Epitop 5, 10, oder 15 Aminosäuren lange flankierende Sequenzen angefügt. Die Aminosäuren Alanin (A), Arginin (R), Glutamin (Q), Glutaminsäure (E), Glycin (G), Histidin (H), Leucin (L), Phenylalanin (F), Serin (S) und Valin (V) wurden einzeln untersucht. Bei einigen der Aminosäuren wurde zudem eine Kombination von 3 gleichen Aminosäuren mit je 12 Glycinen (G) untersucht. Um eine gezielte Proteinaufreinigung durchführen zu können, wurde an ausgewählte DRY+15AS-Konstrukte eine Markierung, bestehend aus 6 Histidinen (DRY+15AS-His), angefügt.

Jeweils 10 µg der entsprechenden Konstrukte wurden mit 10 µg des für das HLA-Molekül DPB1*0301 kodierenden Plasmids in DG75 und LCL (Daten nicht gezeigt) transfiziert und nach 24

Stunden die Antigenpräsentation mithilfe der DRY-spezifischen CD4⁺ T-Zellen untersucht (Abbildung 20).

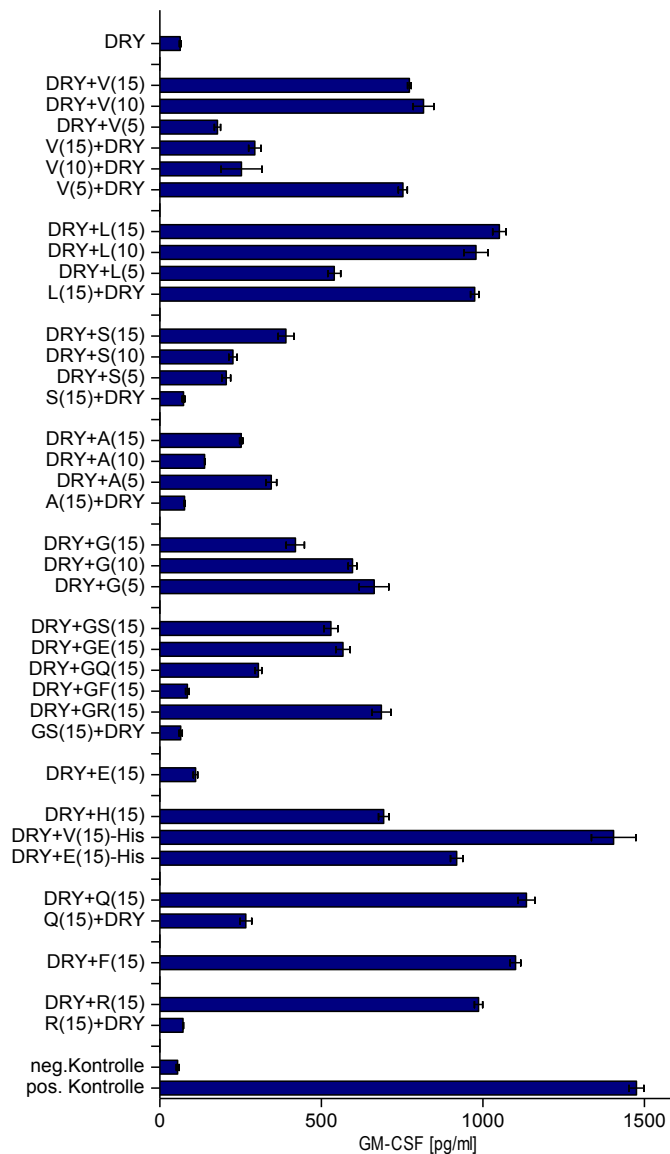


Abbildung 20: Kurze flankierende Regionen können die Präsentation des DRY-Epitops modulieren. DG75 wurden mit jeweils 10 µg des für das HLA-Molekül DPB1*0301 kodierenden Plasmids und 10 µg eines für die DRY-Varianten kodierenden Plasmids transfiziert und nach 24 Stunden mit DRY-spezifischen CD4⁺ T-Zellen für 16 Stunden ko-kultiviert. Anschließend wurde die GM-CSF-Konzentration im Überstand bestimmt. Als Negativkontrolle (neg. Kontrolle) dienten mit Leervektor transfizierte Zellen, als Positivkontrolle (pos. Kontrolle) dienten mit HLA-DPB1*0301 transfizierte Zellen, die mit dem DRY-Peptid beladen worden waren. Diese Untersuchungen wurden für jedes Konstrukt mindestens fünfmal durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis. Die Standardabweichung ergab sich aus Dreifach-Bestimmungen.

Durch das C-terminale Anfügen einer 15 Aminosäuren langen Abfolge an Valin, Leucin, Histidin, Glutamin, Phenylalanin und Arginin kam es im Vergleich zum DRY-Epitop alleine zu einer sehr starken und durch Glycin, Serin und Alanin zu einer deutlichen Erhöhung der T-Zellerkennung. Das Anfügen von 15 Glutaminsäure-Resten hinter das Epitop steigerte die Antigenpräsentation nicht. Durch die Verkürzung der angefügten Kette auf 5 Aminosäuren nahm der verstärkende Effekt auf die Antigenpräsentation bei Valin, Leucin und Serin wieder ab, bei Alanin und Glycin hingegen zu. Die übrigen Aminosäuren wurden nicht entsprechend getestet.

Das Anfügen von flankierenden Sequenzen am N-Terminus des DRY-Epitops führte zu ähnlichen Ergebnissen, allerdings waren die Effekte auf die Antigenpräsentation in der Regel weniger

ausgeprägt, und eine Verkürzung auf 5 Aminosäuren führte im Falle von Valin zu einer Zunahme in der T-Zellerkennung. Ob dieser Effekt auch bei anderen Aminosäuren auftritt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Die C-terminale Kombination verschiedener Aminosäuren mit Glycin wirkte sich auf die T-Zellerkennung in ähnlicher Weise aus, wie die Addition der einzelnen Komponenten vermuten ließ. Lediglich im Fall von Phenylalanin führte die Kombination mit Glycin zu einer unverhältnismäßig starken Abnahme der T-Zellerkennung.

Das zusätzliche Anfügen von sechs C-terminalen Histidinen bewirkte eine Verstärkung der Antigenpräsentation in beiden untersuchten Konstrukten (Valin und Glutaminsäure).

Um mögliche Unterschiede im Einfluss der verschiedenen Aminosäuren auf die Antigenpräsentation besser zu erfassen, wurden ausgesuchte Plasmid-Konstrukte in steigender Konzentration zusammen mit dem für das passende HLA-Molekül kodierenden Plasmid transfiziert und nach 24 Stunden mit den DRY-spezifischen CD4⁺ T-Zellen für 16 Stunden ko-kultiviert (Abbildung 21).

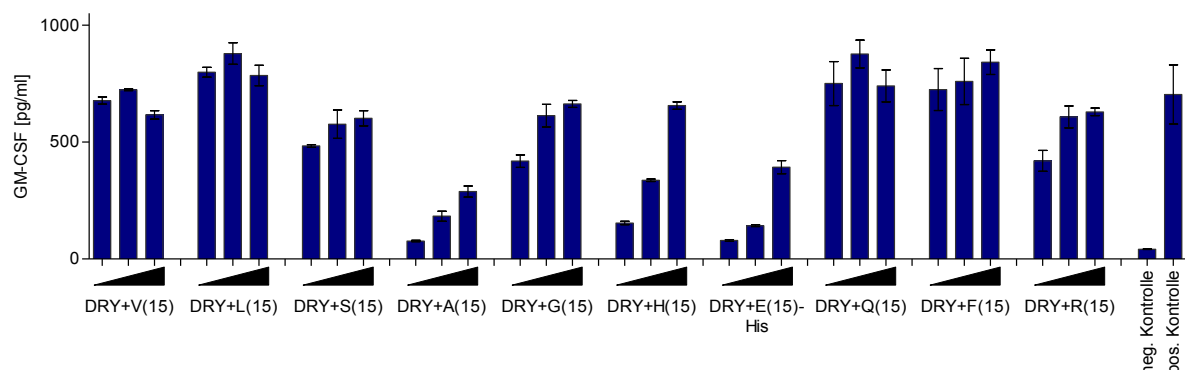


Abbildung 21: Die Präsentation der DRY-Konstrukte korreliert mit der transfizierten DNA-Menge. DG75-Zellen wurden mit jeweils 10 µg des für das HLA-Molekül DPB1*0301 kodierenden Plasmids und steigenden Mengen (1, 3 oder 10 µg) eines für die DRY-Varianten kodierenden Plasmids transfiziert und nach 24 Stunden mit DRY-spezifischen CD4⁺ T-Zellen für 16 Stunden ko-kultiviert. Anschließend wurde die GM-CSF Konzentration im Kulturüberstand bestimmt. Als Negativkontrolle (neg. Kontrolle) dienten mit Leervektor transfizierte Zellen, als Positivkontrolle (pos. Kontrolle) dienten Zellen, die nur mit dem für das HLA-Molekül kodierenden Plasmid transfiziert und danach mit dem DRY-Peptid beladen worden waren. Diese Untersuchung wurde unter meiner Planung und Anleitung von der Forschungspraktikantin Frau Fabienne Gräbnitz einmal durchgeführt. Die Standardabweichung ergab sich aus Dreifach-Bestimmungen.

Während bei den Konstrukten DRY+A(15), DRY+H(15) und DRY+E(15)-His eine von der transfizierten Plasmidmenge abhängige Erhöhung des T-Zellsignals beobachtet wurde, konnte bei den DRY+V(15), DRY+L(15), DRY+Q(15) und DRY+F(15) Konstrukten mit steigenden Plasmidmengen keine weitere Erhöhung der T-Zellerkennung erzielt werden. Vermutlich wurde in diesen Fällen bereits mit der niedrigsten Plasmidmenge eine maximale Zytokinausschüttung der T-Zellen erreicht. Demnach unterschieden sich verschiedene Aminosäuren in ihrer Antigenpräsentation-fördernden Wirkung

mindestens 10-fach. Ob auch funktionelle Unterschiede zwischen den Aminosäuren Valin, Leucin, Glutamin und Phenylalanin bestanden, konnte in diesen Versuchen nicht beantwortet werden. Kürzlich durchgeführte Experimente weisen jedoch auch auf graduelle Unterschiede in der Stimulation der Antigenpräsentation durch diese Aminosäuren hin (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend wiesen diese Ergebnisse darauf hin, dass für die Präsentation endogen exprimierter Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen eine Mindestlänge notwendig ist, und, dass die Effizienz der Präsentation durch die Aminosäuresequenz in den flankierenden Regionen beeinflusst wird.

Um die Expression der verschiedenen Konstrukte zu überprüfen, wurden die Plasmide NeoR-His, NeoRΔCKST-His, DRY+V(15)-His, DRY+E(15)-His und DRY+H(15) in HEK293T-Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Harnstoff-Puffer lysiert und die Proteine aus den Zelllysaten mithilfe der Histidin-Markierung isoliert. Die aufgereinigten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen und mithilfe eines His₆-spezifischen Antikörpers detektiert (Abbildung 22).

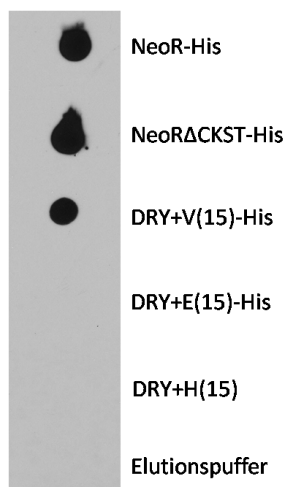


Abbildung 22: Nachweis der Expression von NeoR Konstrukten mittels Dot-Blot. HEK293T-Zellen wurden mit jeweils 10 µg NeoR-His, NeoRΔCKST-His, DRY+V(15)-His, DRY+E(15)-His und DRY+H(15) Plasmiden transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Harnstoff-Puffer lysiert, die Proteine über Nickel-Agarose-Kügelchen aufgereinigt und jeweils 10 µl des Eluats auf eine Membran aufgetragen. Als Negativkontrolle diente der Elutionspuffer. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit His₆-spezifischem Antikörper. Dieser Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Dadurch konnten NeoR-His, NeoRΔCKST-His und DRY+V(15)-His nachgewiesen werden, für DRY+E(15)-His und DRY+H(15) konnte jedoch kein Signal detektiert werden. Dies war bemerkenswert, da die Expression dieser Konstrukte in APC zu einer T-Zellerkennung geführt hatte.

6.4.3 Die flankierenden Sequenzen beeinflussen die Präsentation von DRY-Epitopen auch bei exogener Beladung von APC

Die Menge der exprimierten Proteine war offensichtlich für die Immundetektion im Dot-Blot nicht in jedem Fall ausreichend. Daher wurden im Folgenden die Konstrukte in HEK293T-Zellen exprimiert,

die Zellen nach 24 Stunden lysiert, LCL1.11 mit steigenden Mengen dieses Lysats beladen und anschließend mit DRY-spezifischen CD4⁺ T-Zellen für 16 Stunden ko-kultiviert.

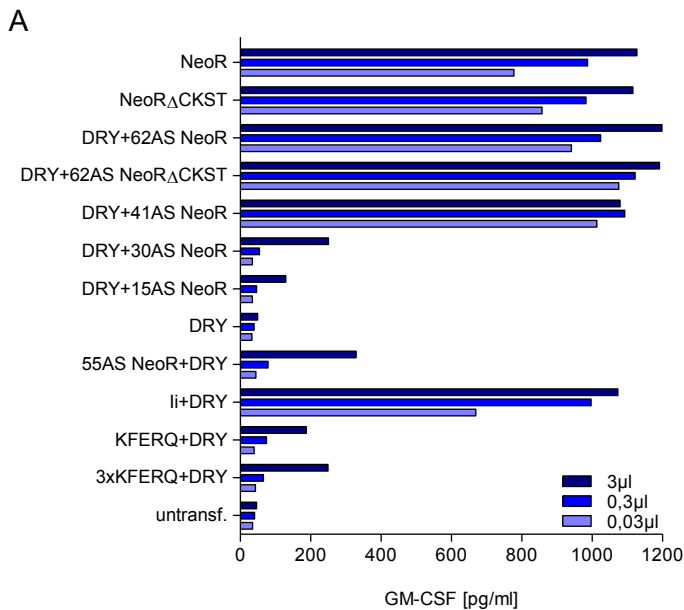
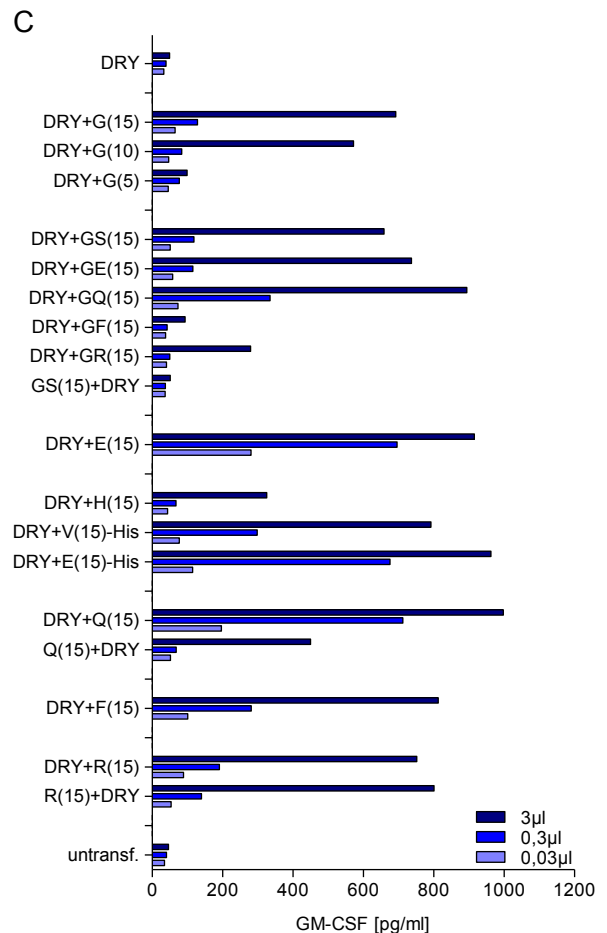
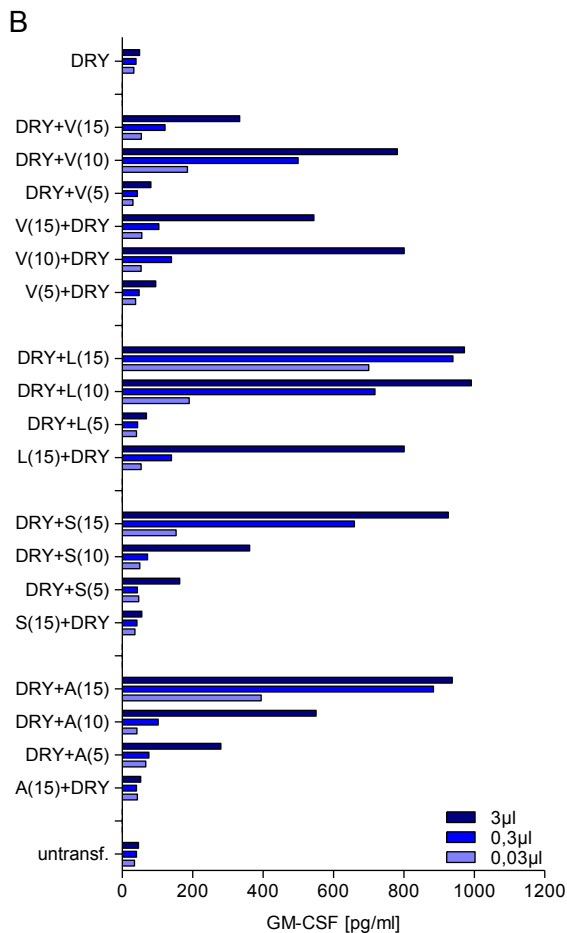


Abbildung 23: Erkennung exogen beladener NeoR-Konstrukte durch DRY-spezifische T-Zellen. HEK293T-Zellen wurden mit jeweils 10 μ g eines für die DRY-Varianten kodierenden Plasmids transfiziert und nach 24 Stunden mit Harnstoff-Puffer lysiert. Steigende Mengen (0,03; 0,3 und 3 μ l) des Lysats wurden auf LCL1.11 geladen, diese mit DRY-spezifischen CD4⁺ T-Zellen für 16 Stunden ko-kultiviert und anschließend die Menge des von den T-Zellen ausgeschütteten GM-CSF bestimmt. LCL1.11, die mit dem Lysat untransfizierter HEK293T-Zellen beladen worden waren, dienten als Negativkontrolle (untransf.). (A) zeigt die Erkennung der APC, die mit Lysat von modifizierten und verkürzten NeoR-Konstrukten exprimierenden Zellen beladen worden waren. (B) und (C) zeigt die Erkennung von APC, die mit Lysat von Zellen beladen worden waren, die Konstrukte mit repetitiven flankierenden Regionen vor oder hinter dem DRY-Epitop exprimierten. Diese Untersuchung wurde für jedes Expressionsplasmid mindestens dreimal durchgeführt. Gezeigt ist das repräsentative Ergebnis eines Versuches.



In Abbildung 23 sind die Ergebnisse dargestellt. Die exogene Beladung mit Lysat von Zellen, die mit den Konstrukten NeoR, NeoR Δ CKST, DRY+62AS-NeoR, DRY+62AS-NeoR Δ CKST, DRY+41AS-NeoR und li+DRY (Abbildung 23A) transfiziert worden waren, führte -ähnlich wie nach endogener Expression- zu einer starken Erkennung durch die DRY-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Aber auch Lysat von HEK293T-Zellen, die mit DRY+15AS NeoR, DRY+30AS NeoR, 55AS NeoR+DRY, KFERQ+DRY oder 3xKFERQ+DRY transfiziert worden waren, wurde von den T-Zellen erkannt. Dies war nach endogener Expression nur teilweise oder gar nicht der Fall. Somit wurden diese Konstrukte zwar exprimiert, aber nicht endogen präsentiert. Im Gegensatz dazu wurden DRY+G(5), DRY+V(5), V(5)+DRY und DRY+L(5) nach endogener Expression, aber nicht nach exogener Beladung auf APC von den T-Zellen erkannt (Abbildung 23B und C).

Bei den Konstrukten DRY, DRY+GF(15), GS(15)+DRY, A(15)+DRY und S(15)+DRY konnte die Präsentation des Epitops weder nach endogener Expression, noch nach exogener Beladung der APC nachgewiesen werden. Somit konnte bei diesen Konstrukten nicht festgestellt werden, ob lediglich die Präsentation nicht stattfand oder insgesamt kein Protein vorhanden war. Zusammenfassend zeigten diese Versuche zur T-Zellerkennung verschiedener NeoR-Konstrukte, dass die Effizienz der endogenen Präsentation nicht mit der Expression/Stabilität der Polypeptide korrelierte, sondern vermutlich auf einer unterschiedlich effizienten Aufnahme in den endogenen Präsentationsweg beruhte.

6.5 Einfluss des autophagosomalen Abbaus auf die Präsentation eines Modellantigens auf MHC-Klasse-II-Molekülen

Die endogene Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-II-Molekülen erfolgt über Autophagie (Stern and Santambrogio, 2016). Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe lieferten Hinweise darauf, dass neusynthetisierte Antigene in diesen Präsentationsweg einmünden, während mature Proteine, die über Autophagie abgebaut werden, nicht zum Antigenpool beitragen (Riedel, 2007). Diese Ergebnisse implizieren, dass Autophagie-vermittelte zelluläre Homöostase und Antigenpräsentation unterschiedlich reguliert sind.

Um nähere Erkenntnisse über die Autophagie-vermittelte Antigenpräsentation und die daran beteiligten Komponenten zu erhalten, wurden mittels chemischen Inhibitoren verschiedene Autophagie-assoziierte Moleküle gehemmt und deren Wirkung auf die Präsentation des Modellantigens NeoR untersucht.

Die wichtigsten Bestandteile des autophagosomalen Abbaus (blau) und eines Teils des mTOR-Signalwegs (grün) sind in Abbildung 24 schematisch dargestellt. Für die Inhibition der einzelnen Bestandteile standen verschiedene Wirkstoffe zur Verfügung. Die Wirkweise der Inhibitoren ist im Abschnitt 4.10 beschrieben.

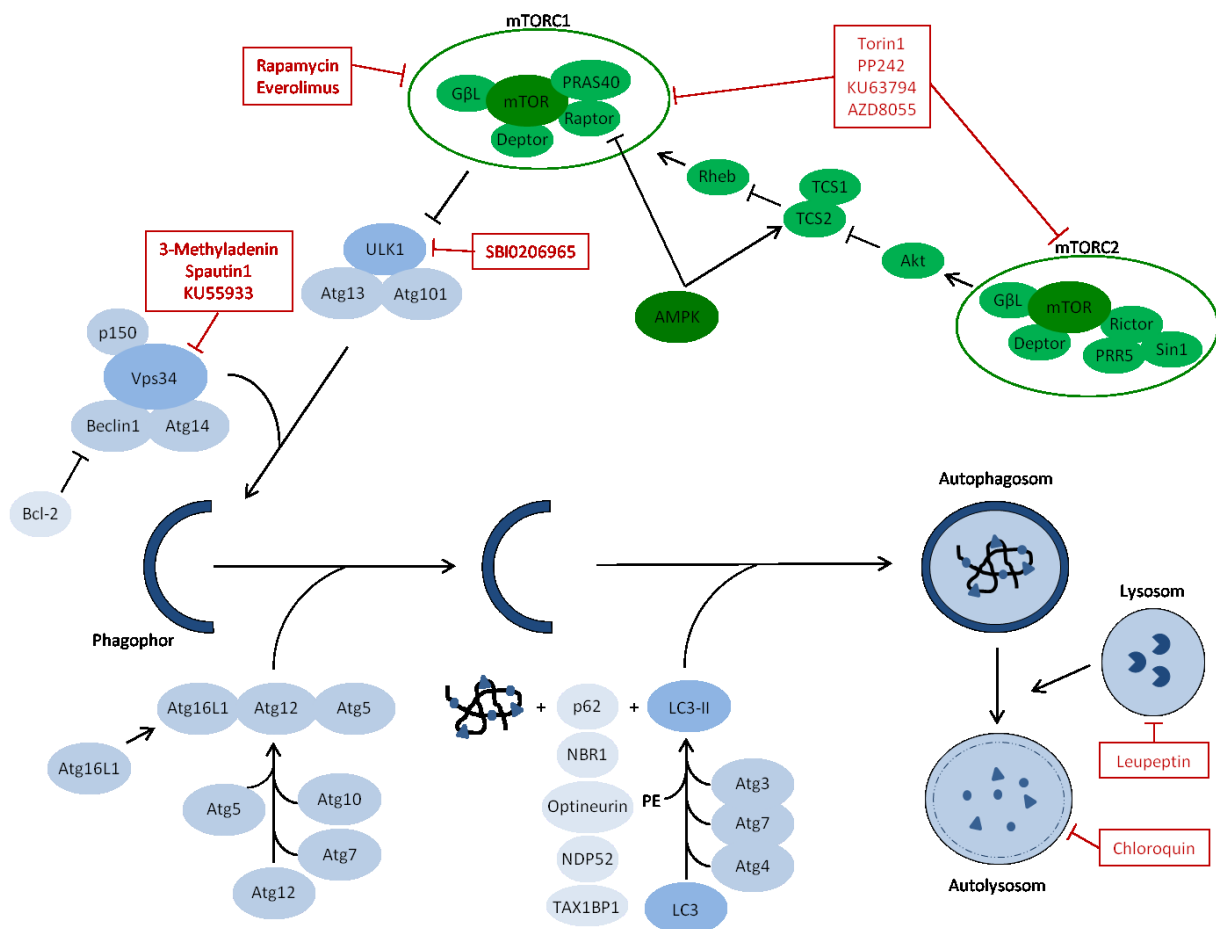


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Makroautophagie (blau) und Teilen des mTOR-Signalwegs (grün). Der ULK-Komplex reguliert gemeinsam mit dem Vps34-Kinase-Komplex die Initiation der Autophagie, der Bildung des Phagophors. Atg-Moleküle bedingen das weitere Fortschreiten der Membranbildung und den Einschluss von ubiquitylierten Proteinen mithilfe von Adaptermolekülen in das Autophagosom. Durch die Fusion mit Lysosomen kommt es zur Spaltung der enthaltenen Proteine im Autolysosom. Der Abbau von Proteinen kann in verschiedenen Stadien der Autophagie mithilfe von Autophagie-Inhibitoren SBI0206965, 3MA, Spautin1, KU55933, Leupeptin und Chloroquin gehemmt werden. Der Komplex mTORC1, welcher Nährstoff-abhängig durch AMPK reguliert wird, ist ein negativer Regulator des ULK-Komplexes. Die Inhibitoren Rapamycin und Everolimus wirken nur auf mTORC1, die Inhibitoren Torin1, PP242, KU63794 und AZD8055 wirken auf mTORC1 und mTORC2. Verändert nach (Cell Signalling Technology, 2014, Yang et al., 2011, Dowling et al., 2010b)

6.5.1 Autophagie-Inhibitoren führen zu einer Akkumulation des Modellantigens NeoR-GFP

Für diese Untersuchungen wurde die stabile Zelllinie LCL1.11-NeoR-GFP etabliert, die nach Induktion mit Doxycyclin ein NeoR-GFP Fusionsprotein exprimiert. Das NeoR-GFP Fusionsprotein wird über Autophagie abgebaut (Nimmerjahn et al., 2003) und ist allgemein anerkanntes Indikatorprotein für die Untersuchung von Autophagie (Klionsky et al., 2008). Drei Stunden nach Anschalten der NeoR-GFP-Expression wurde die Zelllinie für 24 Stunden mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert und anschließend untersucht.

Zunächst wurde der Einfluss der Inhibitoren KU55933, Spautin1, Chloroquin, 3MA, Leupeptin und SBI0206965 auf den autophagosomalen Abbau von NeoR-GFP durchflusszytometrisch untersucht. Eine wirksame Inhibition des autophagosomalen Abbaus sollte zu einer Zunahme der GFP-positiven Zellen und/oder des Fluoreszenzsignals führen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt.

Der Anteil lebender Zellen (Abbildung 25A und D) schwankte in beiden Experimenten um den Wert von 60 %. Mit Ausnahme hoher Konzentrationen an SBI0206965 wies keiner der Inhibitoren toxische Effekte auf.

Durch die Inkubation mit KU55933 und Spautin1 kam es zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der GFP-positiven Zellen (Abbildung 25B) und auch durch 3MA war die Menge GFP-positiver Zellen insgesamt reduziert (Abbildung 25E). Gleichzeitig stieg die mittlere Intensität der Fluoreszenz (MFI) dieser Zellen durch die Behandlung mit 3MA stark an (Abbildung 25F). Dies bedeutete, dass sich durch die Behandlung mit 3MA in den GFP-positiven Zellen eine größere Menge NeoR-GFP Fusionsprotein ansammelte. Den gleichen Effekt bewirkten KU55933, Chloroquin und SBI0206965 in den jeweils höchsten Konzentrationen (Abbildung 25C und F).

Durch die Zugabe von Leupeptin konnte keine Veränderung des Anteils GFP-positiver Zellen oder deren MFI festgestellt werden. Der Inhibitor Spautin1 bewirkte neben der Reduktion der GFP-positiven Zellen eine Reduktion der MFI GFP-positiver Zellen, sodass nicht von einer inhibitorischen Kapazität auf den autophagosomalen Abbau von NeoR-GFP ausgegangen werden kann.

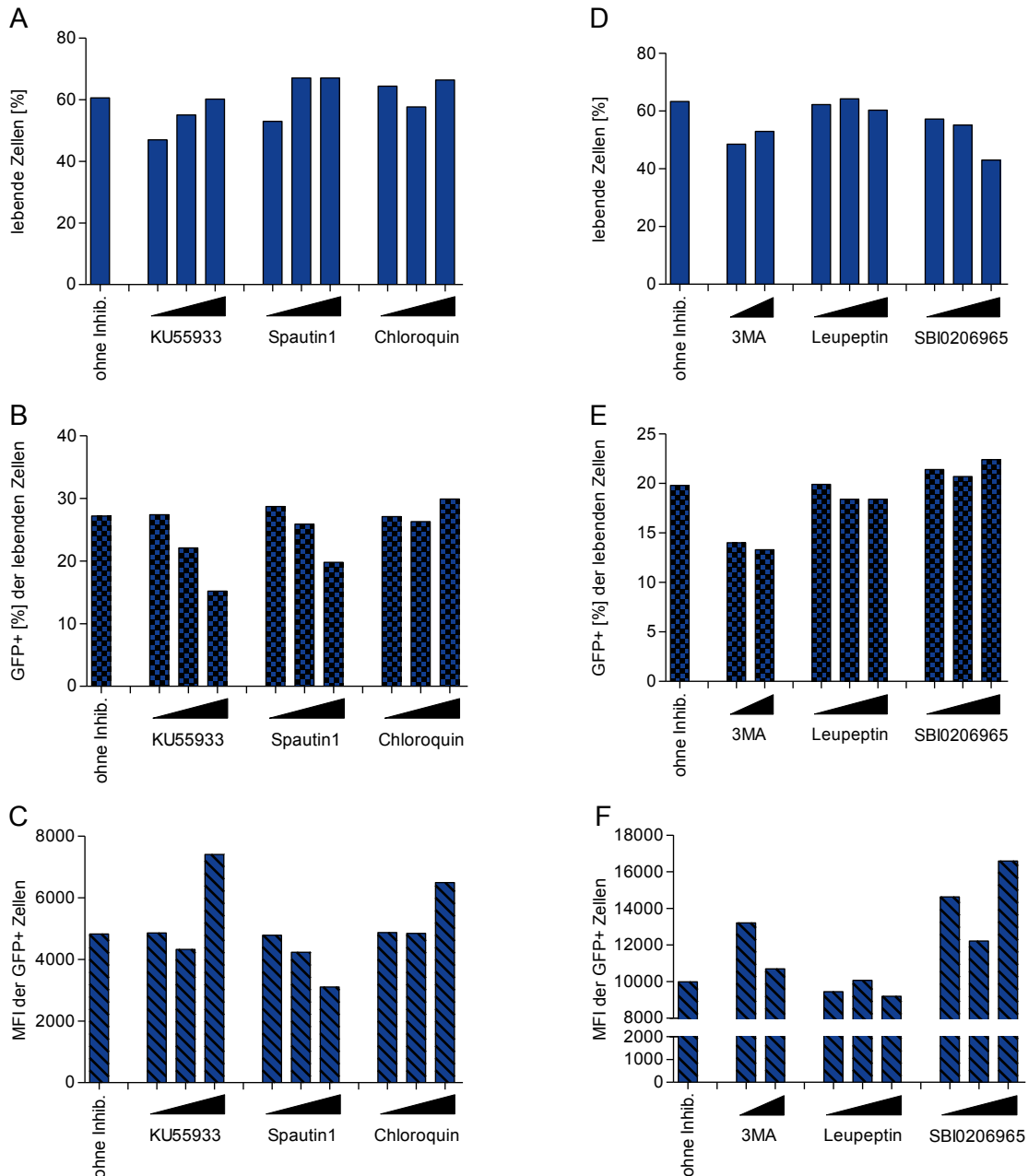


Abbildung 25: Einige Inhibitoren der Autophagie steigern den Anteil oder die Fluoreszenzintensität NeoR-GFP-positiver Zellen. LCL1.11-NeoR-GFP Zellen wurden mit 200 ng/mL Doxycyclin für 3 Stunden behandelt, anschließend die angegebenen Inhibitoren für 24 Stunden hinzugegeben und die Zellen danach durchflusszytometrisch analysiert. Induzierte, nicht mit Inhibitor-behandelte Zellen (ohne Inhib.) dienen als Referenz. Die verwendeten Inhibitoren waren KU55933 (0,1; 1 und 10 μ M), Spautin1 (10; 100; 1000 nM), Chloroquin (1; 10; 100 μ M), 3MA (7,5 und 10 mM), Leupeptin (1; 10; 100 μ M) und SBI0206965 (10; 100; 1000 nM). (A) und (D) zeigen die Anzahl lebender Zellen nach 24 stündiger Behandlung, (B) und (E) den prozentualen Anteil GFP-positiver Zellen der lebenden Zellen. (C) und (F) zeigen die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der GFP-positiven Zellen. Diese Untersuchungen wurden für jeden Inhibitor mindestens dreimal durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis.

Um zu überprüfen, ob die Behandlung mit 3MA, KU55933, SBI0206965 und Chloroquin auch zu niedrigeren NeoR-GFP-Proteinspiegeln führte, wurden Zelllysate erstellt und mittels Western-Blot untersucht (Abbildung 26). Entgegen der durchflusszytometrischen Resultate kam es durch die

Behandlung mit 3MA, KU55933 und SBI0206965 konzentrationsabhängig zu einer Abnahme des GFP-Signals. Chloroquin dagegen bewirkte auch in diesen Experimenten einen konzentrationsabhängigen Anstieg der NeoR-GFP-Proteinmenge.

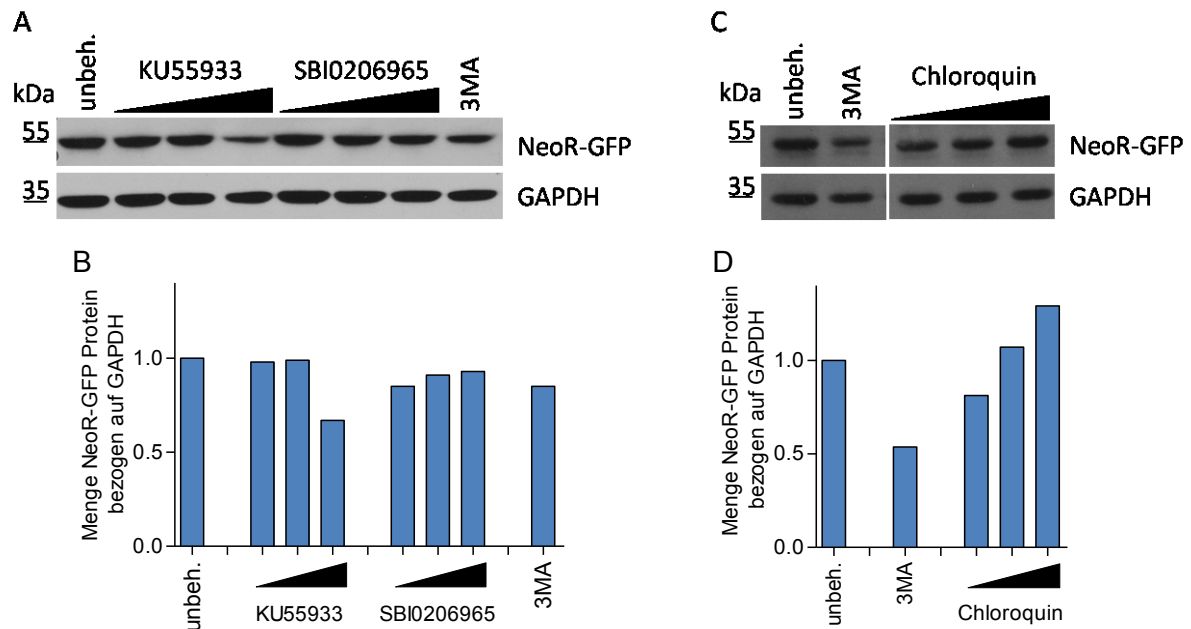


Abbildung 26: Einfluss der Autophagie-Inhibitoren auf die NeoR-GFP-Proteinspiegel. LCL1.11-NeoR-GFP-Zellen wurden für 3 Stunden mit 200 ng/mL Doxycyclin behandelt. Ein Teil der Zellen wurde anschließend ohne Inhibitorzugabe weiterkultiviert (unbeh.), die restlichen Zellen wurden mit den Inhibitoren KU55933 (0,1; 1 und 10 μ M), SBI0206965 (10; 100; 1000 nM), 3MA (7,5 mM) oder Chloroquin (1; 10; 100 μ M) inkubiert und nach 24 Stunden in RIPA-Puffer lysiert. Die Zellextrakte wurden in einem 10,5 %-igem PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. In (A) und (C) wurde NeoR-GFP mithilfe eines GFP-spezifischen Antikörpers detektiert. Ein anti-GAPDH Antikörper diente der Ladekontrolle. In (B) und (D) sind die Quantifizierungen der NeoR-GFP-Proteinmengen, bezogen auf die Ladekontrolle GAPDH und normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle, mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ dargestellt. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von jeweils zwei Experimenten.

6.5.2 Autophagie-Inhibitoren reduzieren die Präsentation des Modellantigens NeoR-GFP

Um den Einfluss der Autophagie-Inhibitoren auf die Präsentation des NeoR-Epitops auf MHC-Klasse-II-Molekülen zu untersuchen, wurden LCL1.11-NeoR-GFP Zellen mit Doxycyclin inkubiert und für 24 Stunden mit den Inhibitoren behandelt. Nach Auswaschen der Inhibitoren wurden die Zellen mit NeoR-Epitop-spezifischen CD4⁺ T-Zellen ko-kultiviert und nach 16 Stunden die Menge an GM-CSF im Kultur-Überstand bestimmt (Abbildung 27).

Diese Untersuchungen wurden nach 200 ng/ml (Abbildung 27A) und 100 ng/ml Doxycyclin-Behandlung (Abbildung 27B) durchgeführt, um auch schwache Effekte der Inhibitoren detektieren zu können, die bei zu hoher Expression des Antigens womöglich unerkannt geblieben wären.

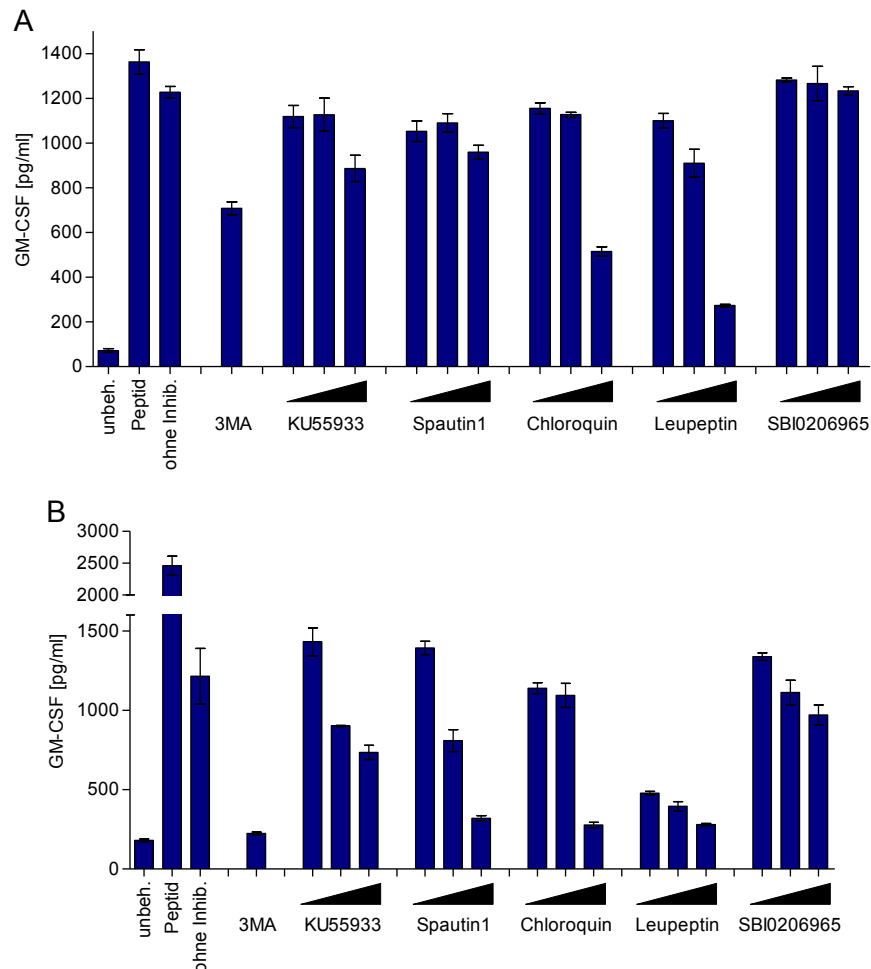


Abbildung 27: Autophagie-Inhibitoren verringern die Präsentation von NeoR-GFP auf MHC-Klasse-II-Molekülen. LCL1.11-NeoR-GFP Zellen wurden für insgesamt 27 Stunden mit 200 ng/mL (A) oder 100 ng/mL (B) Doxycyclin inkubiert. Drei Stunden nach Doxycyclin-Zugabe wurden die Zellen zusätzlich mit den Inhibitoren KU55933 (0,1; 1 und 10 µM), Spautin1 (10; 100; 1000 nM), Chloroquin (1; 10; 100 µM), 3MA (7,5 mM), Leupeptin (1; 10; 100 µM) und SBI0206965 (10; 100; 1000 nM) für 24 Stunden inkubiert, oder blieben unbehandelt (ohne Inhib.). Anschließend wurden die Zellen gewaschen, für 16 Stunden mit NeoR-spezifischen CD4⁺ T-Zellen ko-kultiviert und danach die Menge an GM-CSF im Überstand bestimmt. Als Negativkontrolle dienten LCL1.11-NeoR-GFP ohne Doxycyclin-Zugabe (unbeh.), als Positivkontrolle unbehandelte APC, die mit dem DRY-Peptid (Peptid) beladen worden waren. Die Untersuchungen mit 200 ng/ml Doxycyclin wurden mindestens dreimal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt, die Ergebnisse der Induktion mit 100 ng/ml basieren auf einem einzelnen Versuch. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifach-Bestimmungen.

Während Spautin1 und SBI0206965 keinen Effekt auf die Antigenpräsentation hatten, kam es nach Behandlung mit 3MA, KU55933, Chloroquin und Leupeptin jeweils in der höchsten verwendeten Konzentration zu einer deutlichen Reduktion der T-Zellerkennung. Diese Effekte waren bei niedrigerer Doxycyclin-Konzentration noch deutlicher ausgeprägt.

6.5.3 Einfluss von mTOR-Inhibitoren auf die Expression des Modellantigens NeoR-GFP

Da die Präsentation von NeoR-GFP auf MHC-Klasse-II-Molekülen Autophagie-abhängig erfolgte und Autophagie durch mTOR negativ reguliert wird, sollte eine Inhibition von mTOR zu einem gesteigerten autophagosomalen Abbau von NeoR-GFP führen, sofern der Abbau mTOR-bedingt ist.

Um dies zu untersuchen, wurden LCL1.11-NeoR-GFP Zellen erneut mit Doxycyclin und verschiedenen mTOR-Inhibitoren für 24 Stunden behandelt und danach durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 28).

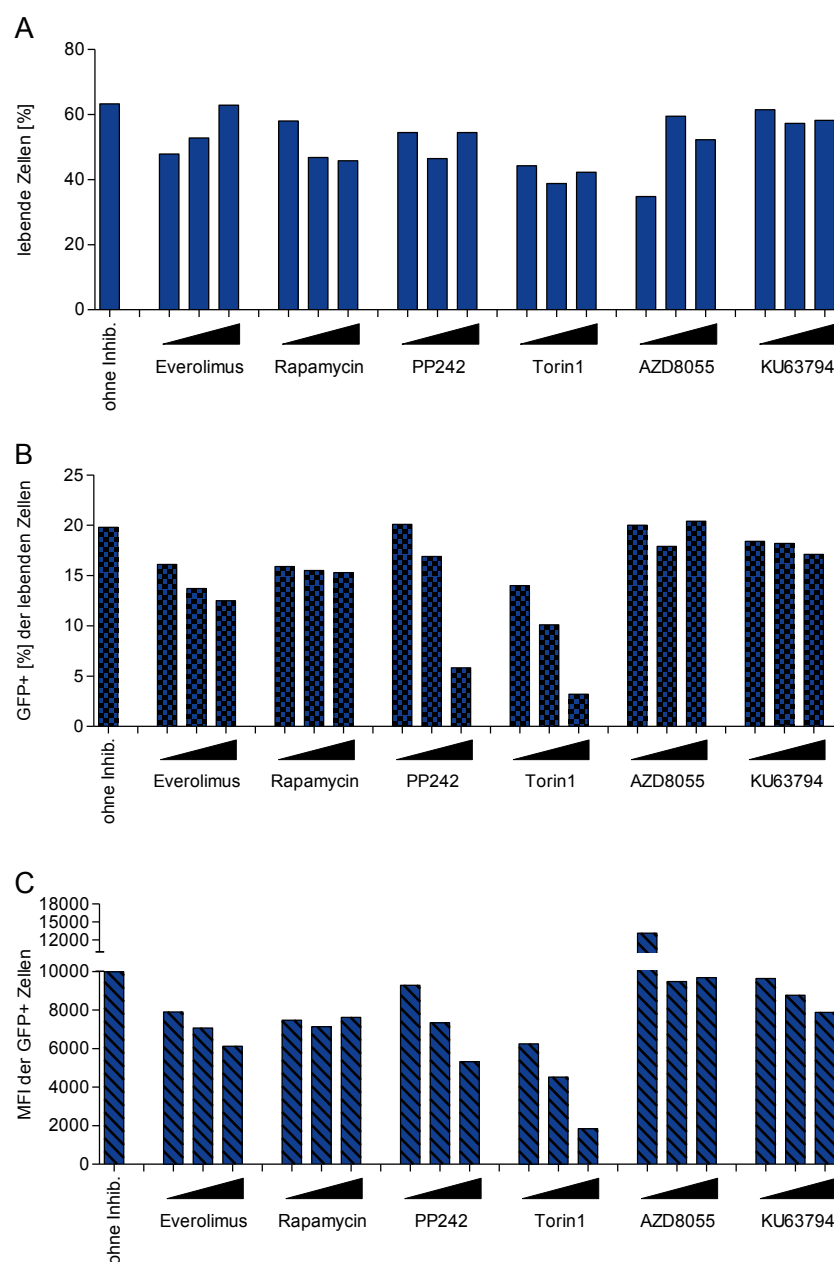


Abbildung 28: Einige mTOR-Inhibitoren verringern den Anteil oder die Fluoreszenzintensität NeoR-GFP-positiver Zellen. LCL1.11-NeoR-GFP Zellen wurden entweder unbehandelt belassen (ohne Ind.) oder mit 200 ng/mL Doxycyclin für 27 Stunden und mit steigenden Mengen der angegebenen Inhibitoren für die letzten 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Induzierte, nicht mit Inhibitor-behandelte Zellen (ohne Inhib.) dienten als Referenz. Die verwendeten Inhibitoren waren Everolimus (0,1; 1; 10 nM), Rapamycin (0,1; 1; 10 nM), PP242 (10; 100; 1000 nM), Torin1 (10; 100; 1000 nM), AZD8055 (10; 100; 1000 pM) und KU63794 (1; 10; 100 nM). (A) zeigt die Anzahl lebender Zellen nach 27-stündiger Doxycyclin-Induktion und (B) zeigt den prozentualen Anteil GFP-positiver Zellen an den lebenden Zellen. In (C) ist die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der GFP-positiven Zellen dargestellt. Diese Untersuchungen wurden für jeden Inhibitor mindestens dreimal durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis.

Der Anteil lebender Zellen (Abbildung 28A) lag bei etwa 60 %. Der Anteil der GFP-positiven Zellen (Abbildung 28B) und somit der Effekt auf den autophagosomalen Abbau des Fusionsproteins NeoR-GFP war durch die Zugabe von Torin1 und PP242 konzentrationsabhängig deutlich reduziert. Nach Everolimus-Behandlung kam es zu einer leichten Abnahme des GFP-Signals. Die Behandlung mit Rapamycin, AZD8055 und KU63794 führte zu keiner Veränderung des Anteils GFP-positiver Zellen.

In Übereinstimmung mit der deutlichen Reduktion des Anteils GFP-positiver Zellen durch Torin1 und PP242 war auch die MFI deutlich reduziert (Abbildung 28C). Somit war neben dem Anteil NeoR-GFP-positiver Zellen auch das Expressionsniveau in den NeoR-GFP-positiven Zellen geringer. Everolimus, Rapamycin, KU63794 und AZD8055 hatten keinen oder nur einen geringfügigen Effekt auf die MFI.

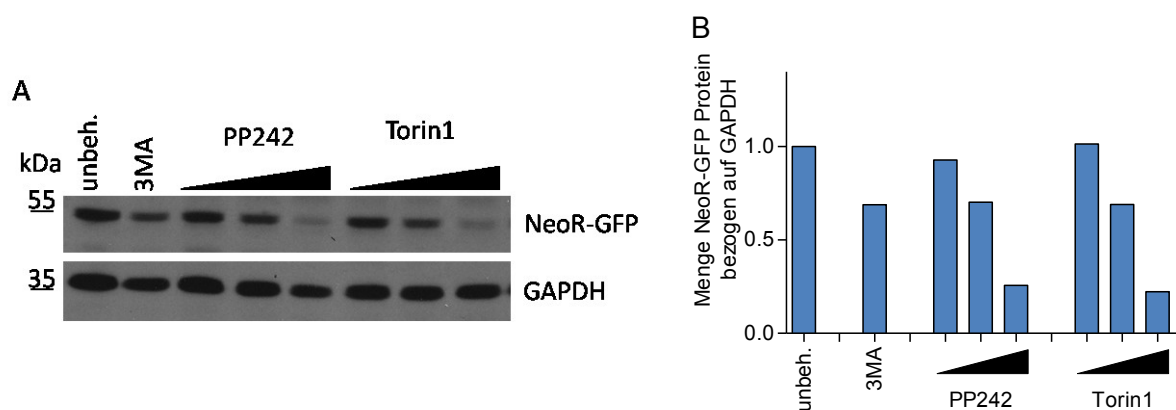


Abbildung 29: NeoR-GFP-Proteinspiegel sind nach Behandlung mit mTOR-Inhibitoren erniedrigt. LCL1.11-NeoR-GFP-Zellen wurden für insgesamt 27 h Stunden mit 200 ng/mL Doxycyclin behandelt. Für die letzten 24 h wurden die Zellen zusätzlich mit den Inhibitoren PP242 (10; 100; 1000 nM), Torin1 (10; 100; 1000 nM) und 3MA (7,5 mM) behandelt oder blieben unbehandelt (unbeh.). Anschließend wurden die Zellen lysiert, und mittels Western-Blot analysiert. In (A) wurde NeoR-GFP mithilfe eines GFP-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. GAPDH diente als Ladekontrolle. (B) zeigt die Quantifizierung der Ergebnisse mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Die Signale für NeoR-GFP wurden auf die jeweiligen Signale der Ladekontrolle GAPDH bezogen und auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei durchgeführten Experimenten.

Die deutlich reduzierenden Effekte von Torin1 und PP242 auf die NeoR-GFP Proteinmengen wurden mittels Western-Bot überprüft (Abbildung 29). Auch hier war die konzentrationsabhängige Reduktion des NeoR-GFP-Signals durch PP242 und Torin1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle deutlich sichtbar (Abbildung 29A). Dieser Effekt war auch nach Quantifizierung der Signale (Abbildung 29B) mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ erkennbar.

Demnach wurde der autophagosomale Abbau des NeoR-GFP-Fusionsproteins durch mTOR reguliert.

6.5.4 Die Inhibition von mTOR führt zu keiner gesteigerten Präsentation des Modellantigens NeoR-GFP auf MHC-Klasse-II-Molekülen

Im Folgenden wurde untersucht, ob der gesteigerte Abbau von NeoR-GFP nach mTOR-Inhibition einen Einfluss auf die Autophagie-abhängige Präsentation des NeoR-Epitops auf MHC-Klasse-II-Molekülen hatte. Analog zu den vorherigen Untersuchungen wurden dazu Doxycyclin und Inhibitor-behandelte LCL1.11-NeoR-GFP-Zellen mit NeoR-spezifischen CD4⁺ T-Zellen für 16 Stunden kulturell behandelt und deren Aktivierung quantifiziert (Abbildung 30).

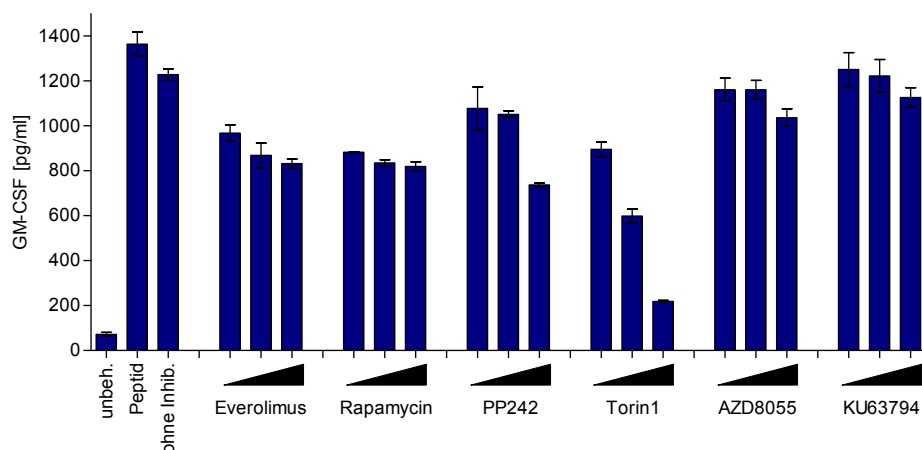


Abbildung 30: Die Präsentation von NeoR-GFP auf MHC-Klasse-II-Molekülen wird durch Inhibition von mTOR nicht verstärkt. LCL1.11-NeoR-GFP-Zellen wurden für 27 Stunden mit 200 ng/mL (A) Doxycyclin behandelt. Während der letzten 24 h Inkubation wurden Everolimus (0,1; 1; 10 nM), Rapamycin (0,1; 1; 10 nM), PP242 (10; 100; 1000 nM), Torin1 (10; 100; 1000 nM), AZD8055 (10; 100; 1000 pM) und KU63794 (1; 10; 100 nM) zugesetzt, oder die Zellen mit keinem Inhibitor unbehandelt (unbeh.). Anschließend wurden NeoR-spezifische CD4⁺ T-Zellen für 16 Stunden zugesetzt und danach die Menge an GM-CSF im Kulturüberstand bestimmt. Als Negativkontrolle dienten LCL1.11-NeoR-GFP Zellen ohne Doxycyclin-Behandlung (ohne Ind.) und als Positivkontrolle unbehandelte APC, die mit dem Peptid des NeoR-Epitops (Peptid) beladen worden waren. Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifach-Bestimmungen.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war die Präsentation des NeoR-Epitops durch Torin1 und PP242 deutlich und durch Everolimus und Rapamycin geringfügiger reduziert. Bis auf den Inhibitor Rapamycin war dieser Effekt konzentrationsabhängig. Weder AZD8055 noch KU63794 schienen einen Effekt auf die Antigenpräsentation zu haben. Dieser Versuch wurde ebenso nach einer Behandlung mit 100 ng/mL Doxycyclin durchgeführt und kam zu ähnlichen Ergebnissen.

Die Reduktion in der Antigenpräsentation nach Behandlung mit einigen mTOR-Inhibitoren steht im Widerspruch zu dem zuvor beobachteten gesteigerten autophagosomalen Abbau des Modellantigens. Dem durch mTOR gesteuerten autophagosomalen Abbau von NeoR-GFP und der Autophagie-vermittelten Präsentation des NeoR-Epitops auf MHC-Klasse-II-Molekülen könnten demnach zwei unterschiedliche Prozesse zugrunde liegen.

7. Diskussion

Voraussetzung für die Entstehung von adaptiven Immunantworten ist die Präsentation von Antigenen auf MHC-Molekülen. Ein genauere Charakterisierung der daran beteiligten Komponenten und der zugrundeliegenden Mechanismen führt zu einem verbesserten Verständnis immunologischer Zusammenhänge und eröffnet neue therapeutische Ansatzpunkte, etwa in der T-Zelltherapie oder der Impfstoffentwicklung.

7.1 Woher stammen Antigene, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden?

Antigene, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, stammen hauptsächlich von neusynthetisierten Proteinen ab (Reits et al., 2000, Schubert, 2000, Khan et al., 2001, Cardinaud et al., 2010). Wie der vergleichsweise kleine Prozentsatz aller neu hergestellten Proteine in den Antigenpräsentationsweg eingeschleust wird und wie die Abbauprodukte ausgedienter, maturer Proteine davon ausgeschlossen werden, ist noch unklar. In den letzten Jahren wurden diverse Modelle entwickelt, die Erklärungsversuche für diesen Sachverhalt anbieten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Beiträge von DRiP und von prä-mRNA-Translationsprodukten zum Antigenpool und der Einfluss der Antigen-mRNA Stabilität auf die Präsentation von Modellantigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen untersucht.

7.1.1 CFTR und die DRiP-Hypothese

7.1.1.1 Die Präsentation von CFTR folgt nicht den Vorhersagen der DRiP-Hypothese

In T-Zellerkennungsversuchen wurden APC, die CFTRwt oder die instabile Mutante CFTRmut exprimierten, ähnlich gut erkannt. Und obwohl die Faltungshelfer zu höheren Proteinspiegeln führten, hatten sie keinen Einfluss auf die Antigenpräsentation. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zur DRiP-Hypothese, wonach die übermäßige Fehlfaltung der Mutante zu mehr DRiP und damit zu einer erhöhten Antigenpräsentation führen müsste, was durch die Faltungsmodulatoren zumindest teilweise wieder rückgängig gemacht werden sollte.

Da auch nur etwa 50% der neusynthetisierten Wildtyp CFTR-Moleküle eine funktionale Konformation erreichen (Lukacs et al., 1994, Ward and Kopito, 1994), war ein Anstieg der Proteinmenge nach Behandlung mit Faltungsmodulatoren nicht überraschend. Eine Erklärung für die gleich starke Erkennung von mit CFTRwt und CFTRmut transfizierten Zellen liefert die hohe Rate an sofort nach Synthese wieder abgebauten CFTR-Molekülen jedoch nicht. Sollte es in beiden Fällen zu

einer Art Sättigung des DRiP-Pools und somit der Antigenpräsentation gekommen sein, so dürfte die Reduktion der transfizierten Plasmid-Menge nicht mit dem beobachteten Rückgang an T-Zellerkennung einhergehen. Dies war aber genauso der Fall, wie die fehlende Reduktion der Präsentation nach Behandlung mit den Faltungsmodulatoren.

Die DRiP-Hypothese wurde als theoretische Überlegung zur Erklärung der Diskrepanz zwischen Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen und der Menge oder Halbwertszeit von antigenen Proteinen etabliert (Yewdell et al., 1996). Anschließend wurde versucht, diese Überlegung mit Beweisen zu untermauern. Obwohl es Hinweise für die DRiP-Hypothese gibt, gestaltet sich der Nachweis von DRiP als Quelle für Antigene als schwierig. Zum einen, weil unklar ist, wie zwischen maturem Protein und DRiP unterschieden wird, und zum anderen, weil eine Definition von DRiP, die auf bestimmte Eigenschaften der Polypeptide eingeht, fehlt (Yewdell, 2005, Dolan et al., 2011).

Um die DRiP-Hypothese zu unterstützen, quantifizierten Qian *et al.* den Proteinabbau und fanden heraus, dass etwa ein Drittel der Proteine kurz nach Ihrer Synthese abgebaut wurden (Qian et al., 2006a). Diese Proteine werden *rapidly degraded proteins* (RDP; schnell abgebaute Proteine) genannt und besitzen eine Halbwertszeit von etwa 10 Minuten (Qian et al., 2006a). In einem weiteren Experiment zeigten Qian *et al.*, dass DRiP aus dem Pool von RDP entstehen (Qian et al., 2006b): mithilfe von Proteasom- und Translationsinhibitoren zeigten sie, dass es nur dann zur Generierung von Antigenen bei Translationsinhibition kommen konnte, wenn zuvor der Pool der RDP durch Proteasom-Inhibition angereichert worden war. Durch die kurze Zeitspanne zwischen Inhibition und Antigenpräsentation und dem konstanten Proteinlevel folgerten sie, dass die Antigene aus RDP stammen müssten. Kritiker dieser Publikationen halten die Untersuchungen für wenig beweiskräftig, da ihrer Meinung nach Inhibitoren weitreichende Effekte auf viele verschiedene Abläufe in Zellen haben können (Rock et al., 2014).

Neben dem Fehlen eines eindeutigen Beweises sprechen auch andere Arbeiten gegen DRiP als alleinige Quelle von Antigenen. Das Auftreten von Epitopen, die posttranslationale Modifikationen tragen (Haurum et al., 1999, Yagüe et al., 2000, Zarling et al., 2000, Hanada et al., 2004), widerspricht der DRiP-Hypothese, da diese Epitope aus maturen Proteinen stammen. Und Dolan *et al.* zeigten, dass die Präsentation eines Modellantigens auf MHC-Klasse-I-Molekülen unabhängig davon erfolgte, ob das Protein durch Zugabe eines chemischen Liganden während der Synthese stabilisiert wurde oder nicht (Dolan et al., 2012).

Dass die gezeigten Experimente zum CFTR die DRiP-Hypothese nicht bestätigten, könnte zum einen bedeuten, dass fehlgefaltete und umgehend abgebaute CFTR-Proteine keine DRiP darstellen, oder,

dass nur eine Untergruppe an Antigenen den Regeln der DRiP-Hypothese unterliegt. CFTR ist ein Membranprotein, das ins Lumen des ER synthetisiert wird. Womöglich gelten für ER-translatierte Proteine andere Gesetzmäßigkeiten als für zytoplasmatische Proteine. Ohne eine genauere Charakterisierung von DRiP kann diese Hypothese weder bestätigt noch widerlegt werden.

7.1.1.2 Die Auswahl von DRiP für die Antigenpräsentation

Sollten DRiP die wichtigste Antigenquelle darstellen, so stellt sich die Frage, wie in der Zelle selektiv zwischen Abbauprodukten von DRiP und nicht-DRiP unterschieden wird. Eine Lösung könnte eine direkte, physische Verbindung von Ribosomen zu Proteasom oder Proteasom zu TAP sein. In der Weiterentwicklung dieses Gedankens postulierten Yewdell und Nichitta, dass spezielle Immunribosomen die Translation von mRNA zu DRiP bedingen könnten (Yewdell and Nichitta, 2006). Während bisher keine Anhaltspunkte für das Vorhandensein von Immunribosomen gefunden wurden (Neefjes et al., 2011), gibt es Hinweise auf einen Chaperonkomplex, der eine Verbindung zwischen Ribosomen und proteasomalen Abbau herstellt (Minami et al., 2010, Kawahara et al., 2013, Antón and Yewdell, 2014).

So weisen mehrere Publikationen auf die Bindung neusynthetisierter Proteine durch einen Chaperonkomplex um das Protein Bag6 hin. Minami *et al.* konnten im Zuge der Untersuchung des sofortigen Abbau des hydrophoben Peptids CL1 nach seiner Synthese mithilfe von Massenspektrometrie zeigen, dass das Chaperon Bag6 an CL1 bindet (Minami et al., 2010). Darüber hinaus bedingte der *knockdown* von Bag6 eine Akkumulierung von CL1 (Minami et al., 2010). Mithilfe von Ko-Immunpräzipitationen stellten sie fest, dass Bag6 die Ubiquitynylierung und den sofortigen proteasomalen Abbau dieses instabilen Proteins vermittelt und auch andere neusynthetisierte, polyubiquitynylierte Proteine bindet (Minami et al., 2010). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Bag6 sowohl mit dem Proteasom und Immunproteasom (Minami et al., 2010) als auch mit Ribosomen (Hessa et al., 2011) assoziiert zu sein scheint.

Passend zu dieser Hypothese stellten Huang et al. einen Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität eines Proteins und der Präsentation von Antigenen fest. Sie stellten mithilfe von zytosolischen Modellproteinen mit und ohne Transmembran-Domäne fest, dass Proteine mit hydrophoben Bereichen schneller abgebaut und enthaltene Epitope vermehrt auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden (Huang et al., 2011).

Falls Bag6 tatsächlich an Auswahl und Abbau von Antigenen beteiligt ist, könnte es das entscheidende oder eines der postulierten Adaptermoleküle darstellen, die die indirekte Ubiquitynylierung von Antigenen ermöglichen (Fiebiger, 2013).

Minami *et al.* stellten zudem eine Verbindung zur Antigenpräsentation her, indem sie zeigten, dass ein Bag6 *knockdown* zu einer Reduktion der MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche führte (Minami *et al.*, 2010). Eine kürzlich veröffentlichte Studie dagegen zeigte in einem ähnlichen Experiment, dass der Bag6 *knockdown* keinen Einfluss auf die MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche hatte (Bitzer *et al.*, 2016). Zudem schien der *knockdown* bei einer LCMV-Infektion keinen Einfluss auf die Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen zu haben (Bitzer *et al.*, 2016).

Scheinbar steht die Chaperon-Funktion von Bag6 bei der Degradierung von neu-synthetisierten Proteinen mit hydrophoben Domänen in Verbindung. Allerdings ist durch die gegensätzlichen Feststellungen unklar, welche Rolle Bag6 in der Antigenpräsentation spielt. Zudem ist fraglich, ob dies ein universeller Mechanismus zur Auswahl von Antigenen ist. Weitere Untersuchungen des Einflusses des Chaperonkomplexes um Bag6 auf den Abbau von Proteinen und der Präsentation von Antigenen sind daher notwendig.

7.1.2 Nukleäre Translation von prä-mRNA

Die Hypothese der prä-mRNA als Quelle von Antigenen, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, basiert auf der Beobachtung von nukleärer Translation durch mehrerer Arbeitsgruppen (Iborra *et al.*, 2001, Iborra *et al.*, 2004a, Iborra *et al.*, 2004b, Gunasekera *et al.*, 2004, Dolan *et al.*, 2010, David *et al.*, 2012). Kritiker dieser Veröffentlichungen bemängeln die ungenügende Eindeutigkeit der Ergebnisse wegen fehlender Kontrollen und fehlendem Ausschluss von Kontaminationen (Dahlberg *et al.*, 2003, Nathanson *et al.*, 2003, Dahlberg and Lund, 2012). Daher gelten diese Ergebnisse nach wie vor als umstritten.

In ihrer Veröffentlichung schließen Apcher *et al.* indirekt auf das Auftreten von nukleärer Translation, indem sie Intron-Sequenzen mithilfe von RNA-FISH (RNA-Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung) im Nukleus detektierten und die Menge der mRNA in Nukleus und Zytoplasma mithilfe von RT-PCR (reverser Transkriptions-PCR) verglichen (Apcher *et al.*, 2013). Gemeinsam mit dem Nachweis darüber, dass T-Zellen Antigene erkannten, die durch intronische Sequenzen kodiert wurden, schlossen sie daraus, dass es zur nukleären Translation der prä-mRNA kam. Diese Schlussfolgerung untermauerten sie durch RNA-FISH-Analysen, bei denen keine Signale für Intronsequenzen im Zytosol erhalten wurden, und durch einen Vergleich der Proteingrößen, allerdings nicht für alle verwendeten Konstrukte.

Der Vorgang des Spleißens ist neben den Donor- und Akzeptor-Sequenzen ebenso abhängig von der Verzweigungsstelle und einer Pyrimidin-reichen Sequenz vor der Akzeptor-Sequenz (Black, 2003) und kann durch das Einfügen von Sequenzen beeinflusst werden. Ob dies in der Veröffentlichung

von Apcher *et al.* der Fall war, kann zumindest nicht ausgeschlossen werden. Da zwischen Proteinmenge und Antigenpräsentation kein unmittelbarer Zusammenhang besteht, erscheint der Beweis des Auftretens von Spleißen durch Proteinnachweis mittels Western-Blot nicht ausreichend. Der weitere Nachweis durch RNA-FISH ist ebenfalls kein eindeutiger Beweis, da diese Methode eine geringe Sensitivität aufweist (Raj et al., 2008). Ein Nachweis des Spleißens mithilfe von qPCR wurde leider nicht durchgeführt. Somit kann ein unvollständiges Spleißen und die Translation dieser mRNA im Zytoplasma nicht ausgeschlossen werden.

7.1.2.1 Die prä-mRNA des Modellantigens BZLF1 ist keine Quelle von Epitopen, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden

In der hier vorgelegten Arbeit wurde das Spleißen zusätzlich zur Proteinanalyse durch die gleichzeitige Untersuchung der T-Zellerkennung von Epitopen nachgewiesen, die sich vor, in oder hinter der zu spleißenden Sequenz befanden.

Die Präsentation des RAK-Epitops war trotz Mutation der Intron-Sequenz unverändert, was darauf hindeutete, dass intronische Sequenzen vor der Herstellung antigenischer Peptide entfernt wurden. Denn sonst hätten die eingefügten Mutationen eine Leserasterverschiebung von RAK, bezogen auf das Initiationskodon, bedingt und somit eine Herstellung und Präsentation des Epitops verhindert. Das Einführen von Mutationen und die dadurch bedingte Verschiebung des offenen Leserasters verhinderte jedoch nur dann die Präsentation von RAK, wenn die Spleiß-Sequenzen verändert waren. Dagegen wurde das LLW-Epitop nur dann präsentiert, wenn die Spleiß-Sequenzen des Introns mutiert und somit Teil der kodierenden Sequenz wurden. Translationsprodukte von prä-mRNA stellen im Falle des Modellantigens BZLF1 somit keine signifikante Quelle für Antigene dar.

7.1.2.2 Verwendung von internen und alternativen Initiationskodons

Das Entfernen eines Nukleotids vor dem LLW-Epitop in der intronischen Sequenz mit mutierten Spleiß-Sequenzen führte zu einer einfachen Leserasterverschiebung in Konstrukt M6. Diese Verschiebung allein jedoch führte nicht zur Elimination der Antigenpräsentation des LLW-Epitops. Da sich stromaufwärts unweit vor dem LLW-Epitop ein weiteres AUG-Kodon befand, ist zu vermuten, dass die Präsentation des LLW-Epitops auf eine interne Translationsinitiation, sogenannte *leaky* Initiation, zurückzuführen war. Aktuelle Analysen ergaben, dass etwa 20-30 % der Translationsinitiations-Ereignisse durch *leaky* Translationsinitiation entstehen (Lee et al., 2012, Wan and Qian, 2014). Zudem gibt es auch sogenannte kryptische Antigene, die durch die Translation endogener und viraler mRNA (Starck and Shastri, 2016) außerhalb des Leserahmens entstehen und etwa 10 % der präsentierten Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen ausmachen (Laumont et al.,

2016). Beschrieben sind neben den alternativen Initiationskodons die Präsentation von kryptischen Transkripten aus UTR (Uenaka et al., 1994) und aus Intronsequenzen (Coulie et al., 1995, Guilloux et al., 1996, Robbins et al., 1997).

Das Einfügen einer zweiten Leserasterverschiebung in Konstrukt M8 und das dadurch bedingte Entfernen des AUG-Initiationskodons sollte das Auftreten einer internen Translation verhindern. Trotzdem kam es zu einer geringfügigen Präsentation des Antigens LLW. Die Überprüfung der kodierenden Sequenz ergab, dass zum einen die erste Aminosäure des LLW-Epitops durch das alternative Initiationskodon CUG kodiert wurde und zum anderen 37 Aminosäuren vor dem LLW-Epitop ebenfalls ein CUG Kodon lag. Neben dem klassischen Initiationskodon AUG kann die Translation einer Sequenz auch durch alternative Initiationskodons wie CUG, GUG, ACG eingeleitet werden (Mehdi et al., 1990). Das CUG-Kodon ist dabei, nach dem AUG-Kodon, das zweithäufigste Initiationskodon (Lee et al., 2012). Verschiedene Veröffentlichungen beschrieben, dass die Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen auf einer Nutzung des alternativen CUG Translations-Initiationskodons beruht (Malarkannan et al., 1999, Starck et al., 2008, Apcher et al., 2011).

Die Translationsinitiation am CUG-Kodon unterscheidet sich von der kanonischen Translationsinitiation dadurch, dass diese anstelle von eIF2 vom Ko-Faktor eIF2A abhängig ist (Starck et al., 2012). Schwab *et al.* zeigten, dass durch die Phosphorylierung von eIF2 eine verstärkte CUG-initiierte und verringerte AUG-initiierte Translation stattfindet (Schwab et al., 2004). Da unter Stressbedingungen, wie z.B. Virusinfektionen, der Faktor eIF2 inaktiv ist (Kim et al., 2011), scheint die Nutzung des alternativen Faktors eIF2A ein Mechanismus zur Umgehung dieser Einschränkung der Translation zu sein.

Die Präsentation des LLW-Epitops nach Expression der Konstrukte M6 und M8 schienen auf alternativen Translationsinitiations-Ereignissen zu basieren. Ob dieser alternative Mechanismus der Translationsinitiation womöglich durch die von Yewdell *et al.* postulierten Immunoribosomen erfolgt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

7.1.3 Der Einfluss der mRNA-Menge auf die Antigenpräsentation

Die Untersuchungen zur Antigenpräsentation von BZLF1-Konstrukten mit Mutationen in der Intron-Sequenz zeigten, dass die Präsentation der natürlichen BZLF1-Epitope VQT, RAK und des ins Intron eingefügten Epitops LLW weder mit der mRNA-Menge noch mit der Protein-Menge korrelierte. Bereits Apcher *et al.* hatten gezeigt, dass die Reduktion der Antigen-mRNA-Menge durch das Einfügen eines frühzeitigen Stoppkodons, das den Abbau der mRNA über NMD bewirkte, nicht mit

einer verringerten Antigenpräsentation einhergeht (Apcher et al., 2011). Auf Basis dieser Ergebnisse postulierten sie, dass PTP die Quelle von präsentierten Antigenen seien (Apcher et al., 2011). Allerdings untersuchten Apcher *et al.* nicht direkt die Stabilität der mRNA, sondern lediglich die Proteinmengen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch die Stabilität der mRNA keinen signifikanten Einfluss auf die Antigenpräsentation hat.

Dieses Ergebnis wurde in einem zweiten experimentellen Ansatz bestätigt. Dazu wurde die Präsentation des VQT-Epitops und parallel dazu die Abundanz einer mRNA mit verschiedenen 3'UTR untersucht. Zwar war die Präsentation durch das Konstrukt mit der BZ-IFN γ -3'UTR vermindert und die mRNA Stabilität deutlich geringer als bei den anderen getesteten Konstrukten. Dagegen war die Stabilität der BZ-IFN γ AREm-3'UTR mRNA ebenfalls geringer, jedoch entsprach die Antigenpräsentation dieses Konstrukts gleichzeitig der Präsentation des BZ-wt-Konstrukts. Das machte deutlich, dass die mRNA-Menge nicht ursächlich für die reduzierte Antigenpräsentation sein konnte. Da beschrieben ist, dass zelluläre Proteine mit der 3'UTR der BZ-IFN γ -mRNA interagieren (Nagy and Rigby, 1995, Chang et al., 2013), kann davon ausgegangen werden, dass die Translationseffizienz der mRNA negativ beeinflusst wurde. Zumal die Antigenpräsentation mit der Translation korreliert (Schubert, 2000, Reits et al., 2000, Khan et al., 2001, Cardinaud et al., 2010), erklärt eine Verringerung der Translationseffizienz durch die BZ-IFN γ -3'UTR eine geringere Antigenpräsentation trotz ähnlicher mRNA-Mengen wie beim IFN γ AREm-Konstrukt.

Die Ergebnisse deuten zusammenfassend darauf hin, dass nicht die Menge oder Stabilität der mRNA, sondern die Verfügbarkeit der mRNA für die Translation entscheidend für die Antigenpräsentation ist. Ob dabei PTP maßgeblich für die Antigenpräsentation verantwortlich sind, wie von Apcher *et al.* postuliert, kann nicht abschließend bewertet werden (Apcher et al., 2011). Hierfür sind weitere Untersuchungen notwendig, etwa unter Einsatz eines RNA-Biosensors (Halstead et al., 2015). Damit können untranslatierte und translatierte mRNA farblich unterschiedlich markiert werden. Bei zusätzlicher Verwendung einer weiteren Farbstoffmarkierung ließen sich womöglich Lokalisation und gegebenenfalls NMD-Abbau parallel zur Antigenpräsentation untersuchen.

7.2 Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen

Im Gegensatz zum MHC-Klasse-I-Präsentationsweg sind Ablauf und Bestandteile der Prozessierung von Antigenen, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, nicht vollständig verstanden und Gegenstand aktueller Forschung. Dass die Präsentation von intrazellulären Antigenen auf MHC-Klasse-II-Molekülen über Autophagie erfolgt, gilt mittlerweile als gesichert (Münz, 2009). Wie die Aufnahme der Antigene in Autophagosomen erfolgt und ob es sich hierbei um die gleiche Form von

Autophagie handelt, die für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase verantwortlich ist, oder um eine speziell regulierte Subform, ist bisher unklar. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, Charakteristika von Antigenen zu definieren, die die Aufnahme in Autophagosomen fördern, und die Bedeutung verschiedener Autophagie-Komponenten, einschließlich mTOR, in der Antigenpräsentation zu untersuchen.

7.2.1 Die Präsentation eines endogen exprimierten Epitops auf MHC-Klasse-II-Molekülen wird durch die flankierende Sequenzen beeinflusst

Die endogene Expression des DRY-Epitops, wie auch weiterer untersuchter CD4⁺ T-Zellepitope (Daten nicht gezeigt), führte nicht zu einer detektierbaren Präsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen. Dies wies darauf hin, dass endogen exprimierte Antigene eine Mindestlänge aufweisen müssen, um effizient präsentiert zu werden. Durch das Anfügen unterschiedlich langer, repetitiver Aminosäureketten konnte in Abhängigkeit von Länge und Art der Aminosäure eine effiziente Präsentation erreicht werden.

Für diese modulierenden Effekte der flankierenden Sequenzen gibt es mindestens drei mögliche Erklärungen. Erstens könnten die flankierenden Sequenzen die Bindung des Peptids an MHC-Klasse-II-Moleküle (Nelson et al., 1993, Nelson et al., 1994, Lovitch et al., 2006) oder des T-Zellrezeptors an den MHC-Klasse-II/Peptid-Komplex (Carson et al., 1997, Arnold et al., 2002, Conant and Swanborg, 2003, Cole et al., 2012) verstärken. Zweitens könnten sie die Aufnahme der Polypeptide in Autophagosomen befördern. Und drittens könnten die flankierenden Sequenzen die Halbwertszeit der Epitope verlängern, indem sie sie vor Abbau schützen.

Verschiedene Veröffentlichungen zeigen, dass flankierende Sequenzen von T-Zellepitopen die Bindung an MHC-Klasse-II-Moleküle stabilisieren und die Erkennung durch T-Zellen beeinflussen können (Carson et al., 1997, Arnold et al., 2002, Conant and Swanborg, 2003, Cole et al., 2012).

Die Präsentation des DRY-Epitops wurde durch das Anfügen von basischen Aminosäuren (Histidin und Arginin) verstärkt. Dieser Effekt könnte darauf beruhen, dass basische, C-terminal flankierende Sequenzen die Erkennung von Antigenen durch CD4⁺ T-Zellen erhöhen (Cole et al., 2012). Dagegen spricht jedoch, dass auch nicht-basische Aminosäuren, wie z.B. Valin, Leucin und Glutamin die Präsentation verstärkten. Diese Ergebnisse stehen nicht in Einklang mit der Beobachtung von Cole et al., ebenso wie die Tatsache, dass diese Effekte auch nach N-terminaler Verlängerung beobachtet wurden und mit der Länge der C-terminalen Sequenzen weiter zunahmen. Somit beruhen diese präsentationsverstärkenden Effekte der verschiedenen Aminosäuren entweder auf mehreren unterschiedlichen oder einem anderen gemeinsamen Mechanismus.

Ob das Anfügen der verschiedenen flankierenden Sequenzen direkt zu einer besseren T-Zellerkennung führt, ließe sich durch exogene Beladung von Zielzellen durch entsprechende Peptide überprüfen. Diese Versuche sollten auch zur Klärung der Frage dienen, ob eine Prozessierung der Polypeptide für eine T-Zellerkennung notwendig ist. Da Peptide, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, unterschiedliche Längen aufweisen können, ist noch unklar, ob die Präsentation der Polypeptide von deren Prozessierung abhängt. Untersuchungen mit exogen Peptid-beladenen, fixierten APC sollte diese Frage beantworten.

Wahrscheinlicher als ein direkter Einfluss der flankierenden Sequenzen auf die T-Zellerkennung erscheint deshalb, dass die angefügten Aminosäuren einen Einfluss auf die Stabilität und/oder die Aufnahme der Polypeptide in Autophagosomen haben. Unter allen getesteten förderten besonders die hydrophoben Aminosäuren Valin, Leucin und Phenylalanin die Präsentation des DRY-Epitops. Grundsätzlich könnten hydrophobe Aminosäuren das Inserieren eines Peptids in eine Membran bedingen und somit zu einer verstärkten Aufnahme ins Autophagosom beitragen. Andererseits führt die Exposition hydrophober Domänen an neusynthetisierten Proteinen zur Erkennung durch Chaperone, die bei der korrekten Faltung des Proteins assistieren. Solch hydrophobe Abschnitte könnten auch als Andockstelle für Proteine dienen, die eine aktive Aufnahme der Antigene in Autophagosomen vermitteln. Der Einfluss von Hydrophobizität auf die Präsentation des DRY-Epitops sollte durch die Untersuchung weiterer hydrophober Aminosäuren wie Isoleucin, Tryptophan, Methionin und Prolin getestet werden.

Im Vergleich zu Konstrukten, bei denen an das DRY-Epitop die gleichlange Wildtyp-Sequenz angefügt worden war, zeigten Konstrukte deren flankierende Sequenzen aus Wiederholungen einer einzelnen Aminosäure bestanden, eine verstärkte Antigenpräsentation. Diese Erkenntnis könnte für die Herstellung von Vakzinen von Bedeutung sein.

Ein Einfluss der flankierenden Sequenzen auf die Stabilität der Polypeptide und damit auf eine längere Verfügbarkeit für die Präsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen kann nicht ausgeschlossen werden. Dies erscheint aber als eher unwahrscheinlich, da die Präsentation nach exogener Beladung von APC mit Zelllysate, welches Polypeptide enthielt, die nicht effizient endogen präsentiert wurden, möglich war. Und, weil es zu einer effizienten Präsentation von Polypeptiden kam, die nicht im Dot-Blot nachgewiesen werden konnten.

7.2.2 NeoR wird nicht durch Chaperon-assoziierte Autophagie in den Antigenpräsentationsweg eingeschleust

Obwohl synthetisch hergestelltes DRY-Peptid nach exogener Beladung auf APC sehr gut von den T-Zellen erkannt wurde, wurde nach endogener Expression keine Präsentation beobachtet. Dies steht im klaren Widerspruch zu Experimenten von Zhou *et al.*, die eine Präsentation von transfizierten Peptiden über CMA beschrieben hatten (Zhou et al., 2005). Demnach werden Peptide von einem Hsc70-Komplex gebunden und über LAMP2a in Lysosomen transportiert und dort auf MHC-Klasse-II-Moleküle geladen. Hierfür ist ein dem Pentapeptid KFERQ biochemisch analoges Erkennungsmotiv notwendig, das in etwa 30% aller zytoplasmatischen Proteine vorkommt (Dice, 1990). Um zu untersuchen, ob intrazelluläre Peptide in diesen Präsentationsweg dirigiert werden können und wie effizient die Präsentation der Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen im Vergleich zur Makroautophagie-vermittelten Präsentation erfolgt, wurde die KFERQ-Signalsequenz an das DRY-Epitop angefügt und in Zellen exprimiert.

Nach endogener Expression kam es durch diese Konstrukte zu keiner Präsentation des Antigens, auch nicht nach Anfügen der trimerisierten Signalsequenz KFERQ. Eine Expression der Peptide wurde durch die T-Zellerkennung von APC nachgewiesen, die exogen mit Extrakten transfizierter Zellen beladen worden waren.

Diese Ergebnisse sprechen gegen eine CMA-vermittelte Präsentation des DRY-Epitops. Bisher wurde lediglich für wenige Antigene eine Abhängigkeit der Präsentation von CMA gezeigt. Daher ist fraglich, welchen Stellenwert CMA in der Generierung von Antigenen für die Präsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen einnimmt.

7.2.3 Der Einfluss von Autophagie und mTOR auf die Antigenpräsentation

Neuere Ergebnisse der Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass, ähnlich wie bei der Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen, auch bei der endogenen Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-II-Molekülen vorrangig neusynthetisierte Proteine die Antigenquelle darstellen. Ebenfalls analog zur MHC-Klasse-I-Präsentation stellt sich somit die Frage, wie diese gezielt in der Autophagie-abhängigen Präsentationsweg eingeschleust, bzw. die über Autophagie abgebauten muren Proteine davon ausgeschlossen werden. Eine Möglichkeit der Erklärung bestünde darin, dass eine separat regulierte, spezialisierte Subform der Autophagie für die Antigenpräsentation verantwortlich ist. Deshalb wurde mithilfe chemischer Inhibitoren eine Beteiligung verschiedener Komponenten der Autophagie am Abbau des Modellantigens untersucht. Allgemein können bei der

Verwendung von Inhibitoren unspezifische Wirkungen nicht ausgeschlossen werden. Um diese zu minimieren, wurden in dieser Arbeit mehrere verschiedene Inhibitoren untersucht.

Die beiden Komplexe ULK-FIP200-Atg101-Atg13 und Vps34-p150-Beclin1-Atg14L aktivieren die Initiation der Autophagie. Der Einfluss von ULK wurde mithilfe des Inhibitors SBI0206965 und der Einfluss des Vps34-Komplexes auf die Generierung von Antigenen wurde mithilfe der Inhibitoren 3MA, KU55933 und Spautin1 untersucht. Der Effekt des Lysosoms auf die Herstellung von Antigenen wurde durch die Inhibition mit Chloroquin und Leupeptin analysiert. Schließlich wurde der Einfluss von mTOR auf den Abbau des Modellantigens NeoR untersucht, hierfür wurden die Inhibitoren Rapamycin, Everolimus, PP242, Torin1, AZD8055 und KU63794 verwendet.

7.2.3.1 Der Einfluss des ULK-Komplexes auf die Antigenpräsentation

SBI0206965 bedingte eine Akkumulation des NeoR-GFP-Fusionsproteins, aber nur eine leichte Reduktion der Antigenpräsentation. Da SBI0206965 ULK1, jedoch nur in geringem Maße ULK2 inhibiert (Egan et al., 2015), und beide Proteine redundante Funktionen in der Regulation der Autophagie haben (Kundu et al., 2008, Cheong et al., 2011), war die Inhibition von ULK1 womöglich nicht ausreichend, den autophagosomalen Abbau für die Generierung von Antigenen zu unterbinden. Auf der anderen Seite wies die Akkumulation von NeoR-GFP unter Inhibitorbehandlung auf eine wirksame Inhibition der Autophagie hin. Die gleichzeitig fehlende Auswirkung auf die Antigenpräsentation impliziert, dass entweder das Nachweisverfahren nicht sensitiv genug war oder der autophagosomale Abbau von grün fluoreszierendem und demnach maturem Protein von der Antigenpräsentation entkoppelt ist.

Für letzteres sprechen Daten, die zeigen, dass ULK1 und -2 die Initiation der Autophagie nicht alleine regulieren. Obwohl ULK1 und ULK2 Doppel-*knockout*-Mäuse kurz nach der Geburt sterben (Cheong et al., 2011), was auf eine essentielle Funktion dieser Proteasen hinweist, gibt es widersprüchliche Ergebnisse zu einer zur Rolle von ULK1 in der Initiation der Autophagie (Wong et al., 2013). Eine Ammoniak-induzierte Form der Autophagie wurde in verschiedenen Publikationen als ULK1- und ULK2-unabhängig (Cheong et al., 2011) oder aber als ULK1-abhängig beschrieben (Eng et al., 2010).

7.2.3.2 Der Einfluss des Vps34-Komplexes auf die Antigenpräsentation

Entscheidend für die Assemblierung des Vps34-Komplexes ist die Phosphorylierung von Beclin1. Die Regulation des aus mehreren Komponenten bestehenden Vps34-Komplexes erfolgt durch eine Vielzahl verschiedener Ubiquitylierungen oder Phosphorylierungen. Zudem können verschiedene Proteine an den Komplex binden und seine Aktivität regulieren: Die Bindung von Atg14L an den

Vps34-Komplex induziert Autophagie, während die Bindung von Rubicon via UVRAG Autophagie reduziert (Matsunaga et al., 2009, Zhong et al., 2009). Daneben wurden noch einige weitere Interaktionspartner beschrieben (Liang et al., 2006, Wirth et al., 2013), auf die hier nicht näher eingegangen werden soll. Kürzlich wurde das Beclin1-Homolog Beclin2 identifiziert, welches ebenso Autophagie zu regulieren scheint (He et al., 2013). Ob Beclin2 für die Funktion von Beclin1 kompensieren kann, ist jedoch unklar.

Der relativ neue Inhibitor Spautin1 soll zwei Ubiquitin-spezifische Peptidasen negativ regulieren, die normalerweise durch das Entfernen der Ubiquitin-Markierung den proteasomalen Abbau von Beclin1 verhindern (Liu et al., 2011). Durch den Inhibitor sollte es daher zum gesteigerten Abbau von Beclin1 kommen, was zu einer reduzierten Autophagie-Induktion führen sollte. Eine Publikation legt nahe, dass für die Wirkung des Inhibitors Nährstoff-Mangelbedingungen herrschen müssen (Liu et al., 2011).

Unter den Bedingungen dieser Arbeit hatte Spautin1 keine Wirkung auf den Abbau des Modellproteins und nur bei geringer Induktionsstärke war eine konzentrationsabhängige Reduktion der Antigenpräsentation sichtbar. Da unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen kein Nährstoffmangel vorherrschte, waren auch keine dramatischen Effekte auf die Antigenpräsentation zu erwarten. Andererseits führen Nährstoffmangelbedingungen zu keiner verstärkten endogenen Antigenpräsentation (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen sich wiederum in zwei Richtungen interpretieren: Entweder ist Spautin1 kein sonderlich effizienter Inhibitor der Autophagie, oder die Spautin1 inhibierbare Autophagie spielt keine Rolle in der Antigenpräsentation.

Die Verwendung von 3MA führte zur Reduktion des prozentualen Anteils an GFP-positiven Zellen. Gleichzeitig kam es jedoch zu einer Akkumulierung des NeoR-GFP-Fusionsproteins in den GFP-positiven Zellen. Zudem zeigten Western-Blot Analysen, dass die Menge des Fusionsproteins im Vergleich zur Kontrolle reduziert war.

3MA ist ein Inhibitor, der konzentrationsabhängig auf alle Klassen der PI3-Kinasen wirkt (Miller et al., 2010, Wu et al., 2010) und eine Zytotoxizität aufweist, die unabhängig von der Autophagie-inhibierenden Wirkung ist (Hou et al., 2012). Wu *et al.* stellten bei der Untersuchung der Wirkungsweise von 3MA fest, dass dieser Inhibitor eine duale Wirkung hat: Zum einen inhibiert 3MA durch Nährstoffmangel induzierte Autophagie und zum anderen führt eine langfristige Behandlung von Zellen zu einer verstärkten Nährstoff-unabhängigen Autophagie-Rate (Wu et al., 2010).

Ob der verringerte Anteil GFP-positiver Zellen und die verringerte Menge Fusionsprotein auf den dualen Effekt von 3MA oder auf die Toxizität zurückzuführen war, wie der reduzierte Anteil lebender

Zellen suggeriert, war nicht eindeutig festzustellen. Passend zur Akkumulierung des GFP-Fusionsproteins durch die 24-stündige Behandlung mit 3MA war die Antigenpräsentation reduziert, was darauf hinwies, dass der Abbau des Modellantigens für die Antigenpräsentation vom Vps34-Komplex abhängig war.

Der Autophagie-Inhibitor KU55933 inhibiert spezifisch Klasse III-, jedoch nicht Klasse I-PI3-Kinasen (Farkas et al., 2011). Ähnlich wie nach Behandlung der Zielzellen mit 3MA war die T-Zellerkennung nach Behandlung mit KU55933 reduziert, ebenso war der Gesamtanteil an GFP-positiven Zellen verringert und die Grünfluoreszenz GFP-positiver Zellen erhöht. Zudem war die NeoR-GFP-Menge nach Behandlung mit der höchsten Konzentration an KU55933 reduziert. Die Wirkung von KU55933 und 3MA auf die Zellen war somit identisch.

Die Tatsache, dass zwei von drei Inhibitoren der Vps34-Kinase einen negativen Einfluss auf die Antigenpräsentation hatten, weist darauf hin, dass dieser Komplex an der autophagosomalen Generierung von Antigenen beteiligt ist.

7.2.3.3 Der Einfluss des Lysosoms auf die Antigenpräsentation

Die Bedeutung lysosomaler Proteasen für die Autophagie-assoziierte Antigenpräsentation ist hinlänglich dokumentiert (Honey and Rudensky, 2003, Delamarre et al., 2005, van Kasteren and Overkleeft, 2014). Die Inhibition der lysosomalen Funktion durch Chloroquin und Leupeptin diente in diesen Experimenten als Positivkontrolle und zeigte die erwartete reduzierende Wirkung auf die Antigenpräsentation. Die Behandlung führte jedoch zu keinem deutlichen Anstieg GFP-positiver Zellen und nur Chloroquin bedingte eine Akkumulation des GFP-Signals in diesen Zellen. In der Proteinanalyse zeigte sich, dass Chloroquin zu einer leichten Akkumulierung der Proteinmengen führte. Diese Ergebnisse könnten darauf begründet sein, dass die Inhibitoren auf verschiedene Weise nur teilweise den lysosomalen Abbau verhindern. Chloroquin verhindert die Ansäuerung der Lysosomen, während Leupeptin Serin- und Cystein-Proteasen inhibiert. Nicht alle Proteasen benötigen die Ansäuerung des Lysosoms für ihre Funktion (Kaminsky and Zhivotovsky, 2012, Turk et al., 2012), und Asparagin-Proteasen in Lysosomen könnten für den teilweise Abbau des Fusionsproteins nach Leupeptin-Behandlung verantwortlich sein. Da die Fluoreszenzintensität von GFP pH-abhängig ist, könnte nach Verwendung von Leupeptin der niedrige pH dafür verantwortlich sein, dass das GFP-Signal nicht mehr detektiert wurde, obgleich es zu einer Protein-Akkumulation kam (Kneen et al., 1998).

Die Ergebnisse zeigen also, dass Lysosomen sowohl für die Generierung von Antigenen als auch für den Abbau von murenen Proteinen zur Erhaltung der Zellhomöostase essentiell sind.

7.2.3.4 Der Einfluss von mTOR auf die Antigenpräsentation

Autophagie kann unter Mangelbedingungen durch mTOR reguliert werden. Die Regulation von mTORC1 selbst erfolgt zum einen über die Phosphorylierung durch den Aminosäuren-Sensor AMPK, wodurch mTORC1 gehemmt wird. Zum anderen wird mTOR durch einen Komplex in der lysosomalen Membran reguliert, welcher unter Mangelbedingungen mTOR nicht aktiviert. Dieser Rückkopplungsmechanismus sorgt dafür, dass der ULK-Komplex nicht durch mTOR inhibiert und Autophagie verstärkt induziert wird.

In dieser Arbeit gelang eine negative Regulation von mTOR durch die verschiedenen Inhibitoren auf unterschiedlich effiziente Weise. Es wurden Inhibitoren verwendet, die lediglich mTORC1 inhibieren, und auch Inhibitoren, die auf mTORC1 und mTORC2 wirken. Da mTORC2 ein positiver Regulator von mTORC1 ist, sollte die Inhibition beider Komplexe zu einer Wirkungsverstärkung führen.

Die beiden Inhibitoren KU63794 und AZD8055, die auf beide mTORC-Komplexe wirken sollen, zeigten eine geringe bzw. keine Wirkung auf den NeoR-GFP-Abbau oder auf die Antigenpräsentation.

Torin1 und PP242, die ebenfalls beide mTORC-Komplexe inhibieren, bewirkten eine deutliche Abnahme der NeoR-GFP-Proteinmengen. Rapamycin und Everolimus dagegen, die lediglich mTORC1 inhibieren, wiesen keine oder nur eine gering verstärkende Wirkung auf den Proteinabbau auf. Diese Beobachtungen sind deckungsgleich mit Veröffentlichungen zur Wirkung von Rapamycin, Torin1 und PP242, die besagen, dass mTOR nur teilweise durch Rapamycin (Shor et al., 2009) und sehr viel umfangreicher durch Torin1 oder PP242 inhibiert wird (Thoreen et al., 2009, Feldman et al., 2009).

Analog zum *Inside-Out*-Mechanismus des Proteinkomplexes in der lysosomalen Membran aktivieren Torin1 und PP242, im Gegensatz zu Rapamycin, auch die Aktivität von Lysosomen (Zhou et al., 2013) und tragen, neben der De-Repression des ULK-Komplexes, dadurch zusätzlich zu einer erhöhten Autophagierate bei. Die Beobachtung, dass Torin1 und PP242 den autophagosomalen Abbau bei weitem am stärksten induzierten, war somit im Einklang mit dieser Publikation.

Torin1, PP242 und Rapamycin wird zudem ein mTOR-abhängiger, negativer Einfluss auf die Proteinsynthese zugeschrieben (Shor et al., 2009, Thoreen et al., 2009, Dowling et al., 2010a). Dieser Einfluss scheint jedoch ebenfalls stärker durch Torin1 und PP242 auszufallen als durch Rapamycin (Thoreen et al., 2009, Feldman et al., 2009). Inwiefern dieser Nebeneffekt einen Einfluss auf die Untersuchung der Antigenpräsentation gehabt haben könnte, ist noch unklar.

7.2.3.5 Die Regulation der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen erfolgt mTOR unabhängig

Wenn mTOR durch die Negativregulation der Autophagie einen Einfluss auf die Generierung von Antigenen hätte, so wäre eine gesteigerte Antigenpräsentation durch die Inhibition von mTOR zu erwarten gewesen. Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten zeigen, dass die mTOR-bedingte Induktion der Autophagie durch Torin1, PP242 und Everolimus zwar den Abbau des Modellproteins beschleunigt, es jedoch zu keiner gleichzeitigen Verstärkung der Antigenpräsentation kommt.

Diese Ergebnisse passen zu der Feststellung von Schmidt *et al.*, dass in APC ein konstanter Fluss von Autophagie herrscht, der nicht durch Nährstoffmangel induziert wird (Schmid *et al.*, 2007). Zudem gibt es eine Vielzahl an Veröffentlichungen, die eine Induktion von Autophagie durch verschiedene Komponenten unabhängig von mTOR beschreiben (Sarkar *et al.*, 2005, Yamamoto *et al.*, 2006, Grotemeier *et al.*, 2010, Tan *et al.*, 2012).

Im Gegensatz zur Inhibition von mTOR hatte eine Inhibition der Autophagie sehr wohl eine reduzierende Wirkung auf die Antigenpräsentation. Das zeigt zum einen, dass Autophagie an der Antigenpräsentation beteiligt ist, und zum anderen, dass mTOR lediglich einer von mehreren Regulatoren der Autophagie ist. Durch die Feststellung, dass Autophagie essentiell für die Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen ist, mTOR jedoch nicht, stellt sich die Frage, wie die Autophagie-assoziierte Antigenpräsentation reguliert wird.

8. Ausblick

Da weder prä-mRNA-Translationsprodukte zum Antigenpool beitragen, noch die Antigenmenge oder die Stabilität der neusynthetisierten Proteine und der Antigen-mRNA Einfluss auf die Effizienz der Antigenpräsentation hatten, könnten Untersuchungen zu den biochemischen Eigenschaften der Antigene neue Einblicke in die Antigenauswahl liefern.

Die endogen auf MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen präsentierten Antigene weisen mehrere Gemeinsamkeiten auf, z.B. die Kopplung an Translation oder die Abhängigkeit von indirekten Ubiquitin-Signalen. Darüber hinaus könnten weitere Übereinstimmungen bestehen, z.B. hinsichtlich der Mindestlänge der Antigene. So werden zwar endogen exprimierte T-Zellepitope sehr effizient auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert, C-terminal verlängerte Epitope jedoch nur, wenn sie eine Mindestlänge überschreiten. Diese Beobachtungen sprechen für ein gezieltes Erkennen und Einschleusen der Antigene in den Präsentationsweg. Über den massenspektrometrischen Nachweis von Proteinen, die an Polypeptide binden, die diese Längenforderung unter- bzw. überschreiten, könnten neue Hinweise zur Antigenauswahl erhalten werden.

Um den Einfluss flankierender Sequenzen auf die endogene Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-II-Molekülen genauer zu charakterisieren, sollten diese Analysen mit weiteren Aminosäuren durchgeführt und um andere Aminosäurekombinationen ergänzt werden. Letztere sollten Aufschluss darüber geben, ob diese Effekte auf einem oder verschiedenen Wirkmechanismen beruhen. Mit Hilfe entsprechender synthetischer Peptide könnte unterschieden werden, ob die flankierenden Sequenzen die Bindung an MHC-Moleküle bzw. TCR, das Einbringen der Antigene in den autophagosomalen Präsentationsweg und/oder deren Prozessierung fördern. Aufgrund möglicher unspezifischer Effekte chemischer Inhibitoren sollten die Untersuchungen zur Beteiligung verschiedener Komponenten und Signalwege an der Autophagie-vermittelten Antigenpräsentation durch genetische Ansätze ergänzt werden. Mittels *knockout* einzelner oder mehrerer Gene, z.B. mit Hilfe der CRISPR/Cas9- Technologie, kann die Rolle einzelner Autophagie Gene in der Antigenpräsentation verifiziert und damit zu einem besseren Verständnis dieses Präsentationsweges beigetragen werden.

9. Literatur

- AFRIDI, S., HOESSLI, D. C. & HAMEED, M. W. 2016. Mechanistic understanding and significance of small peptides interaction with MHC class II molecules for therapeutic applications. *Immunological Reviews*, 272, 151-168.
- AKI, M., SHIMBARA, N., TAKASHINA, M., AKIYAMA, K., KAGAWA, S., TAMURA, T., TANAHASHI, N., YOSHIMURA, T., TANAKA, K. & ICHIHARA, A. 1994. Interferon- γ Induces Different Subunit Organizations and Functional Diversity of Proteasomes. *Journal of Biochemistry*, 115, 257-269.
- ALBIGER, B., DAHLBERG, S., HENRIQUES-NORMARK, B. & NORMARK, S. 2007. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *Journal of Internal Medicine*, 261, 511-528.
- ANDERSON, P. 2010. Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 10, 24-35.
- ANDROLEWICZ, M. J., ANDERSON, K. S. & CRESSWELL, P. 1993. Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 9130-9134.
- ANTÓN, L. C. & YEWEDELL, J. W. 2014. Translating DRiPs: MHC class I immunosurveillance of pathogens and tumors. *Journal of Leukocyte Biology*, 95, 551-562.
- AOYAGI, T., TAKEUCHI, T., MATSUZAKI, A., KAWAMURA, K., KONDO, S., HAMADA, M., MAEDA, K. & UMEZAWA, H. 1969. Leupeptins, new protease inhibitors from actinomycetes. *Journal of Antibiotics*, 22, 283-286.
- APCHER, S., DASKALOGIANNI, C., LEJEUNE, F., MANOURY, B., IMHOOS, G., HESLOP, L. & FÅHRAEUS, R. 2011. Major source of antigenic peptides for the MHC class I pathway is produced during the pioneer round of mRNA translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 11572-11577.
- APCHER, S., MILLOT, G., DASKALOGIANNI, C., SCHERL, A., MANOURY, B. & FÅHRAEUS, R. 2013. Translation of pre-spliced RNAs in the nuclear compartment generates peptides for the MHC class I pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 17951-17956.
- ARNOLD, P. Y., LA GRUTA, N. L., MILLER, T., VIGNALI, K. M., ADAMS, P. S., WOODLAND, D. L. & VIGNALI, D. A. A. 2002. The Majority of Immunogenic Epitopes Generate CD4+ T Cells That Are Dependent on MHC Class II-Bound Peptide-Flanking Residues. *The Journal of Immunology*, 169, 739-749.
- BATISTA, F. D. & HARWOOD, N. E. 2009. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature Reviews Immunology*, 9, 15-27.
- BEDOUI, S., HEATH, W. R. & MUELLER, S. N. 2016. CD4+ T-cell help amplifies innate signals for primary CD8+ T-cell immunity. *Immunological Reviews*, 272, 52-64.
- BEISNER, D. R., LANGERAK, P., PARKER, A. E., DAHLBERG, C., OTERO, F. J., SUTTON, S. E., POIROT, L., BARNES, W., YOUNG, M. A., NIESSEN, S., WILTSHIRE, T., BODENDORF, U., MARTOGLIO, B., CRAVATT, B. & COOKE, M. P. 2013. The intramembrane protease Sppl2a is required for B cell and DC development and survival via cleavage of the invariant chain. *The Journal of Experimental Medicine*, 210, 23-30.
- BITZER, A., BASLER, M. & GROETTRUP, M. 2016. Chaperone BAG6 is dispensable for MHC class I antigen processing and presentation. *Molecular Immunology*, 69, 99-105.
- BJØRKØY, G., LAMARK, T., BRECH, A., OUTZEN, H., PERANDER, M., ØVERVATN, A., STENMARK, H. & JOHANSEN, T. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of Cell Biology*, 171, 603-614.
- BLACK, D. L. 2003. Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 291-336.

- BLUM, J. S., WEARSCH, P. A. & CRESSWELL, P. 2013. Pathways of Antigen Processing. *Annual Review of Immunology*, 31, 443-473.
- BOYLE, K. B. & RANDOW, F. 2013. The role of 'eat-me' signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Current Opinion in Microbiology*, 16, 339-348.
- BRAZIL, M. I., WEIß, S. & STOCKINGER, B. 1997. Excessive degradation of intracellular protein in macrophages prevents presentation in the context of major histocompatibility complex class II molecules. *European Journal of Immunology*, 27, 1506-1514.
- BROGNA, S. & WEN, J. 2009. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16, 107-113.
- CARDINAUD, S., STARCK, S. R., CHANDRA, P. & SHASTRI, N. 2010. The Synthesis of Truncated Polypeptides for Immune Surveillance and Viral Evasion. *PLoS ONE*, 5, e8692.
- CAROLL, M. C. & PRODEUS, A. P. 1998. Linkages of innate and adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10, 36-40.
- CARSON, R. T., VIGNALI, K. M., WOODLAND, D. L. & VIGNALI, D. A. A. 1997. T Cell Receptor Recognition of MHC Class II-bound Peptide Flanking Residues Enhances Immunogenicity and Results in Altered TCR V Region Usage. *Immunity*, 7, 387-399.
- CASCIO, P., HILTON, C., KISSELEV, A. F., ROCK, K. L. & GOLDBERG, A. L. 2001. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *The EMBO Journal*, 20, 2357-2366.
- CELL SIGNALLING TECHNOLOGY. 2014. *Autophagy Signaling Pathway* [Online]. www.cellsignal.com: Cellsignal. Available: <https://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research-autophagy/autophagy-signaling-pathway/pathways-autophagy> [Accessed 31.05.2016].
- CHANG, C.-H., CURTIS, JONATHAN D., MAGGI, LEONARD B., JR., FAUBERT, B., VILLARINO, ALEJANDRO V., O'SULLIVAN, D., HUANG, STANLEY C.-C., VAN DER WINDT, GERRITJE J. W., BLAGIH, J., QIU, J., WEBER, JASON D., PEARCE, EDWARD J., JONES, RUSSELL G. & PEARCE, ERIKA L. 2013. Posttranscriptional Control of T Cell Effector Function by Aerobic Glycolysis. *Cell*, 153, 1239-1251.
- CHEN, L. & FLIES, D. B. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 13, 227-242.
- CHENG, S. H., GREGORY, R. J., MARSHALL, J., PAUL, S., SOUZA, D. W., WHITE, G. A., O'RIORDAN, C. R. & SMITH, A. E. 1990. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*, 63, 827-834.
- CHEONG, H., LINDSTEN, T., WU, J., LU, C. & THOMPSON, C. B. 2011. Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 11121-11126.
- CHOI, A. M. K., RYTER, S. W. & LEVINE, B. 2013. Autophagy in Human Health and Disease. *New England Journal of Medicine*, 368, 651-662.
- CHRESTA, C. M., DAVIES, B. R., HICKSON, I., HARDING, T., COSULICH, S., CRITCHLOW, S. E., VINCENT, J. P., ELLSTON, R., JONES, D., SINI, P., JAMES, D., HOWARD, Z., DUDLEY, P., HUGHES, G., SMITH, L., MAGUIRE, S., HUMMERSONE, M., MALAGU, K., MENEAR, K., JENKINS, R., JACOBSEN, M., SMITH, G. C. M., GUICHARD, S. & PASS, M. 2010. AZD8055 Is a Potent, Selective, and Orally Bioavailable ATP-Competitive Mammalian Target of Rapamycin Kinase Inhibitor with In vitro and In vivo Antitumor Activity. *Cancer Research*, 70, 288-298.
- CLEMENT, C. C., BECERRA, A., YIN, L., ZOLLA, V., HUANG, L., MERLIN, S., FOLLENZI, A., SHAFFER, S. A., STERN, L. J. & SANTAMBROGIO, L. 2016. The Dendritic Cell MHC II Peptidome Derives from a Variety of Processing Pathways and Includes Peptides with a Broad Spectrum of HLA-DM Sensitivity. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 5576-5595.
- COLE, D. K., GALLAGHER, K., LEMERCIER, B., HOLLAND, C. J., JUNAID, S., HINDLEY, J. P., WYNN, K. K., GOSTICK, E., SEWELL, A. K., GALLIMORE, A. M., LADELL, K., PRICE, D. A., GOUGEON, M.-L. & GODKIN, A. 2012. Modification of the carboxy-terminal flanking region of a universal influenza epitope alters CD4+ T-cell repertoire selection. *Nature Communications*, 3, 665.

- CONANT, S. B. & SWANBORG, R. H. 2003. MHC class II peptide flanking residues of exogenous antigens influence recognition by autoreactive T cells. *Autoimmunity Reviews*, 2, 8-12.
- COULIE, P. G., LEHMANN, F., LETHÉ, B., HERMAN, J., LURQUIN, C., ANDRAWISS, M. & BOON, T. 1995. A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 7976-7980.
- CUERVO, A. M. & WONG, E. 2014. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Research*, 24, 92-104.
- CURTSSINGER, J. M. & MESCHER, M. F. 2010. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Current Opinion in Immunology*, 22, 333-340.
- DAHLBERG, J. & LUND, E. 2012. Nuclear translation or nuclear peptidyl transferase? *Nucleus*, 3, 320-321.
- DAHLBERG, J. E., LUND, E. & GODDWIN, E. W. 2003. Nuclear translation: What is the evidence? *RNA*, 9, 1-8.
- DAVID, A., DOLAN, B. P., HICKMAN, H. D., KNOWLTON, J. J., CLAVARINO, G., PIERRE, P., BENNINK, J. R. & YEWDELL, J. W. 2012. Nuclear translation visualized by ribosome-bound nascent chain puromycylation. *The Journal of Cell Biology*, 197, 45-57.
- DELAMARRE, L., PACK, M., CHANG, H., MELLMAN, I. & TROMBETTA, E. S. 2005. Differential Lysosomal Proteolysis in Antigen-Presenting Cells Determines Antigen Fate. *Science*, 307, 1630-1634.
- DENGJEL, J., SCHOOR, O., FISCHER, R., REICH, M., KRAUS, M., MÜLLER, M., KREYMBORG, K., ALTENBEREND, F., BRANDENBURG, J., KALBACHER, H., BROCK, R., DRIESSEN, C., RAMMENSEE, H.-G. & STEVANOVIĆ, S. 2005. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 7922-7927.
- DERETIC, V., SAITOH, T. & AKIRA, S. 2013. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13, 722-737.
- DICE, F. J. 1990. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 15, 305-309.
- DOLAN, B. P., BENNINK, J. R. & YEWDELL, J. W. 2011. Translating DRiPs: progress in understanding viral and cellular sources of MHC class I peptide ligands. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 1481-1489.
- DOLAN, B. P., KNOWLTON, J. J., DAVID, A., BENNINK, J. R. & YEWDELL, J. W. 2010. RNA Polymerase II Inhibitors Dissociate Antigenic Peptide Generation from Normal Viral Protein Synthesis: A Role for Nuclear Translation in Defective Ribosomal Product Synthesis? *The Journal of Immunology*, 185, 6728-6733.
- DOLAN, B. P., SHARMA, A. A., GIBBS, J. S., CUNNINGHAM, T. J., BENNINK, J. R. & YEWDELL, J. W. 2012. MHC class I antigen processing distinguishes endogenous antigens based on their translation from cellular vs. viral mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 7025-7030.
- DOWLING, R. J. O., TOPISIROVIC, I., ALAIN, T., BIDINOSTI, M., FONSECA, B. D., PETROULAKIS, E., WANG, X., LARSSON, O., SELVARAJ, A., LIU, Y., KOZMA, S. C., THOMAS, G. & SONENBERG, N. 2010a. mTORC1-Mediated Cell Proliferation, But Not Cell Growth, Controlled by the 4E-BPs. *Science*, 328, 1172-1176.
- DOWLING, R. J. O., TOPISIROVIC, I., FONSECA, B. D. & SONENBERG, N. 2010b. Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804, 433-439.
- EDWARDS, S. R. & WANDLESS, T. J. 2007. The Rapamycin-binding Domain of the Protein Kinase Mammalian Target of Rapamycin Is a Destabilizing Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 13395-13401.

- EGAN, DANIEL F., CHUN, MATTHEW G. H., VAMOS, M., ZOU, H., RONG, J., MILLER, CHAD J., LOU, HUA J., RAVEENDRA-PANICKAR, D., YANG, C.-C., SHEFFLER, DOUGLAS J., TERIETE, P., ASARA, JOHN M., TURK, BENJAMIN E., COSFORD, NICHOLAS D. P. & SHAW, REUBEN J. 2015. Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates. *Molecular Cell*, 59, 285-297.
- ELBORN, J. S. 2016. Cystic fibrosis. *The Lancet*, 388, 2519 - 2531.
- ENG, C. H., YU, K., LUCAS, J., WHITE, E. & ABRAHAM, R. T. 2010. Ammonia Derived from Glutaminolysis Is a Diffusible Regulator of Autophagy. *Science Signaling*, 3, ra31-ra31.
- ESKELINEN, E.-L. 2005. Maturation of Autophagic Vacuoles in Mammalian Cells. *Autophagy*, 1, 1-10.
- FALK, K., RÖTZSCHKE, O., STEVANOVÍČ, S., JUNG, G. & RAMMENSEE, H.-G. 1994. Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules. *Immunogenetics*, 39, 230-242.
- FARINHA, C. M., MENDES, F., ROXO-ROSA, M., PENQUE, D. & AMARAL, M. D. 2004. A comparison of 14 antibodies for the biochemical detection of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Molecular and Cellular Probes*, 18, 235-242.
- FARKAS, T., DAUGAARD, M. & JÄÄTTELÄ, M. 2011. Identification of Small Molecule Inhibitors of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 38904-38912.
- FELDMAN, M. E., APSEL, B., UOTILA, A., LOEWITH, R., KNIGHT, Z. A., RUGGERO, D. & SHOKAT, K. M. 2009. Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLOS Biology*, 7, e1000038.
- FIEBIGER, B. M. 2013. *Charakterisierung von Mechanismen der Antigenprozessierung für die Präsentation auf MHC-Klasse-I*. Dissertation, Ludwig Maximilians Universität München.
- FORSYTH, K. S. & EISENLOHR, L. C. 2016. Giving CD4+ T cells the slip: viral interference with MHC class II-restricted antigen processing and presentation. *Current Opinion in Immunology*, 40, 123-129.
- GACZYNSKA, M., ROCK, K. L. & GOLDBERG, A. L. 1993. [gamma]-Interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature*, 365, 264-267.
- GALLAGHER, L., WILLIAMSON, L. & CHAN, E. 2016. Advances in Autophagy Regulatory Mechanisms. *Cells*, 5, 24.
- GANLEY, I. G., LAM, D. H., WANG, J., DING, X., CHEN, S. & JIANG, X. 2009. ULK1-ATG13-FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 12297-12305.
- GARCÍA-MARTÍNEZ, JUAN M., MORAN, J., CLARKE, ROSEMARY G., GRAY, A., COSULICH, SABINA C., CHRESTA, CHRISTINE M. & ALESSI, DARIO R. 2009. Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochemical Journal*, 421, 29-42.
- GLICK, D., BARTH, S. & MACLEOD, K. F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221, 3-12.
- GROTEMEIER, A., ALERS, S., PFISTERER, S. G., PAASCH, F., DAUBRAWA, M., DIETERLE, A., VIOLLET, B., WESSELBORG, S., PROIKAS-CEZANNE, T. & STORK, B. 2010. AMPK-independent induction of autophagy by cytosolic Ca²⁺ increase. *Cellular Signalling*, 22, 914-925.
- GUERTIN, D. A. & SABATINI, D. M. 2007. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell*, 12, 9-22.
- GUILLOUX, Y., LUCAS, S., BRICHARD, V., VAN PEL, A., VIRET, C., DE PLAEN, E., BRASSEUR, F., LETHÉ, B., JOTEREAU, F. & BOON, T. 1996. A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *The Journal of Experimental Medicine*, 183, 1173-1183.
- GUNASEKERA, N., LEE, S. W., KIM, S., MUSIER-FORSYTH, K. & ARRIAGA, E. 2004. Nuclear Localization of Aminoacyl-tRNA Synthetases Using Single-Cell Capillary Electrophoresis Laser-Induced Fluorescence Analysis. *Analytical Chemistry*, 76, 4741-4746.

- HALSTEAD, J. M., LIONNET, T., WILBERTZ, J. H., WIPPICH, F., EPHRUSSI, A., SINGER, R. H. & CHAO, J. A. 2015. An RNA biosensor for imaging the first round of translation from single cells to living animals. *Science*, 347, 1367-1671.
- HANADA, K.-I., YEWEDELL, J. W. & YANG, J. C. 2004. Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature*, 427, 252-256.
- HAURUM, J. S., HØIER, I. B., ARSEQUELL, G., NEISIG, A., VALENCIA, G., ZEUTHEN, J., NEEFJES, J. & ELLIOTT, T. 1999. Presentation of Cytosolic Glycosylated Peptides by Human Class I Major Histocompatibility Complex Molecules in Vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 190, 145-150.
- HE, C. & KLIONSKY, D. J. 2009. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual Review of Genetics*, 43, 67-93.
- HE, C., WEI, Y., SUN, K., LI, B., DONG, X., ZOU, Z., LIU, Y., KINCH, LISA N., KHAN, S., SINHA, S., XAVIER, RAMNIK J., GRISHIN, NICK V., XIAO, G., ESKELINEN, E.-L., SCHERER, PHILIPP E., WHISTLER, JENNIFER L. & LEVINE, B. 2013. Beclin 2 Functions in Autophagy, Degradation of G Protein-Coupled Receptors, and Metabolism. *Cell*, 154, 1085-1099.
- HESSA, T., SHARMA, A., MARIAPPAN, M., ESHLEMAN, H. D., GUTIERREZ, E. & HEGDE, R. S. 2011. Protein targeting and degradation are coupled for elimination of mislocalized proteins. *Nature*, 475, 394-397.
- HICKSON, I., ZHAO, Y., RICHARDSON, C. J., GREEN, S. J., MARTIN, N. M. B., ORR, A. I., REAPER, P. M., JACKSON, S. P., CURTIN, N. J. & SMITH, G. C. M. 2004. Identification and Characterization of a Novel and Specific Inhibitor of the Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase ATM. *Cancer Research*, 64, 9152-9159.
- HONEY, K. & RUDENSKY, A. Y. 2003. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, 3, 472-482.
- HORST, D., VAN LEEUWEN, D., CROFT, N. P., GARSTKA, M. A., HISLOP, A. D., KREMMER, E., RICKINSON, A. B., WIERTZ, E. J. H. J. & RESSING, M. E. 2009. Specific Targeting of the EBV Lytic Phase Protein BNLF2a to the Transporter Associated with Antigen Processing Results in Impairment of HLA Class I-Restricted Antigen Presentation. *The Journal of Immunology*, 182, 2313-2324.
- HOSOKAWA, N., HARA, T., KAIZUKA, T., KISHI, C., TAKAMURA, A., MIURA, Y., IEMURA, S.-I., NATSUME, T., TAKEHANA, K., YAMADA, N., GUAN, J.-L., OSHIRO, N. & MIZUSHIMA, N. 2009. Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1-Atg13-FIP200 Complex Required for Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 1981-1991.
- HOU, H., ZHANG, Y., HUANG, Y., YI, Q., LV, L., ZHANG, T., CHEN, D., HAO, Q. & SHI, Q. 2012. Inhibitors of Phosphatidylinositol 3'-Kinases Promote Mitotic Cell Death in HeLa Cells. *PLoS ONE*, 7, e35665.
- HUANG, L., KUHL, M. C. & EISENLOHR, L. C. 2011. Hydrophobicity as a driver of MHC class I antigen processing. *The EMBO Journal*, 30, 1634-1644.
- IBORRA, F. J., ESCARGUEIL, A. E., KWEK, K. Y., AKOULITCHEV, A. & COOK, P. R. 2004a. Molecular cross-talk between the transcription, translation, and nonsense-mediated decay machineries. *Journal of Cell Science*, 117, 899-906.
- IBORRA, F. J., JACKSON, D. A. & COOK, P. R. 2001. Coupled Transcription and Translation Within Nuclei of Mammalian Cells. *Science*, 293, 1139-1142.
- IBORRA, F. J., JACKSON, D. A. & COOK, P. R. 2004b. The case for nuclear translation. *Journal of Cell Science*, 117, 5713-5720.
- JENSEN, T. J., LOO, M. A., PIND, S., WILLIAMS, D. B., GOLDBERG, A. L. & RIORDAN, J. R. 1995. Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell*, 83, 129-135.
- JIANG, Y., XU, X.-S. & RUSSELL, J. E. 2006. A Nucleolin-Binding 3' Untranslated Region Element Stabilizes β -Globin mRNA In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 26, 2419-2429.

- JUNG, C. H., JUN, C. B., RO, S.-H., KIM, Y.-M., OTTO, N. M., CAO, J., KUNDU, M. & KIM, D.-H. 2009. ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 1992-2003.
- KAMINSKY, V. & ZHIVOTOVSKY, B. 2012. Proteases in autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824, 44-50.
- KAUR, J. & DEBNATH, J. 2015. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16, 461-472.
- KAWAHARA, H., MINAMI, R. & YOKOTA, N. 2013. BAG6/BAT3: emerging roles in quality control for nascent polypeptides. *Journal of Biochemistry*, 153, 147-160.
- KELLY, A., POWIS, S. H., KERR, L.-A., MOCKRIDGE, I., ELLIOTT, T., BASTIN, J., UCHANSKA-ZIEGLER, B., ZIEGLER, A., TROWSDALE, J. & TOWNSEND, A. 1992. Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature*, 355, 641-644.
- KHAN, S., DE GIULI, R., SCHMIDTKE, G., BRUNS, M., BUCHMEIER, M., VAN DEN BROEK, M. & GROETTRUP, M. 2001. Cutting Edge: Neosynthesis Is Required for the Presentation of a T Cell Epitope from a Long-Lived Viral Protein. *The Journal of Immunology*, 167, 4801-4804.
- KIM, J. H., PARK, S. M., PARK, J. H., KEUM, S. J. & JANG, S. K. 2011. eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions. *The EMBO Journal*, 30, 2454-2464.
- KIM, S. & SKACH, W. 2012. Mechanisms of CFTR Folding at the Endoplasmic Reticulum. *Frontiers in Pharmacology*, 3.
- KIRKIN, V., LAMARK, T., SOU, Y.-S., BJØRKØY, G., NUNN, J. L., BRUUN, J.-A., SHVETS, E., MCEWAN, D. G., CLAUSEN, T. H., WILD, P., BILUSIC, I., THEURILLAT, J.-P., ØVERVATN, A., ISHII, T., ELAZAR, Z., KOMATSU, M., DIKIC, I. & JOHANSEN, T. 2009. A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates. *Molecular Cell*, 33, 505-516.
- KISSELEV, A. F., AKOPIAN, T. N., WOO, K. M. & GOLDBERG, A. L. 1999. The Sizes of Peptides Generated from Protein by Mammalian 26 and 20 S Proteasomes: IMPLICATIONS FOR UNDERSTANDING THE DEGRADATIVE MECHANISM AND ANTIGEN PRESENTATION. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 3363-3371.
- KLIONSKY, D. J., ABELIOVICH, H., AGOSTINIS, P., AGRAWAL, D. K., ALIEV, G., ASKEW, D. S., BABA, M., BAEHRECKE, E. H., BAHR, B. A., BALLABIO, A., BAMBER, B. A., BASSHAM, D. C., BERGAMINI, E., BI, X., BIARD-PIECHACZYK, M., BLUM, J. S., BREDESEN, D. E., BRODSKY, J. L., BRUMELL, J. H., BRUNK, U. T., BURSCH, W., CAMOUGRAND, N., CEBOLLERO, E., CECCONI, F., CHEN, Y., CHIN, L.-S., CHOI, A., CHU, C. T., CHUNG, J., CLARKE, P. G. H., CLARK, R. S. B., CLARKE, S. G., CLAVÉ, C., CLEVELAND, J. L., CODOGNO, P., COLOMBO, M. I., COTO-MONTES, A., CREGG, J. M., CUERVO, A. M., DEBNATH, J., DEMARCHI, F., DENNIS, P. B., DENNIS, P. A., DERETIC, V., DEVENISH, R. J., DI SANO, F., DICE, J. F., DIFIGLIA, M., DINESH-KUMAR, S., DISTELHORST, C. W., DJAVAHERI-MERGNY, M., DORSEY, F. C., DRÖGE, W., DRON, M., DUNN, W. A., DUSZENKO, M., EISSA, N. T., ELAZAR, Z., ESCLATINE, A., ESKELINEN, E.-L., FÉSÜS, L., FINLEY, K. D., FUENTES, J. M., FUEYO, J., FUJISAKI, K., GALLIOT, B., GAO, F.-B., GEWIRTZ, D. A., GIBSON, S. B., GOHLA, A., GOLDBERG, A. L., GONZALEZ, R., GONZÁLEZ-ESTÉVEZ, C., GORSKI, S., GOTTLIEB, R. A., HÄUSSINGER, D., HE, Y.-W., HEIDENREICH, K., HILL, J. A., HØYER-HANSEN, M., HU, X., HUANG, W.-P., IWASAKI, A., JÄÄTTELÄ, M., JACKSON, W. T., JIANG, X., JIN, S., JOHANSEN, T., JUNG, J. U., KADOWAKI, M., KANG, C., KELEKAR, A., KESSEL, D. H., KIEL, J. A. K. W., KIM, H. P., KIMCHI, A., KINSELLA, T. J., KISELYOV, K., KITAMOTO, K., KNECHT, E., et al. 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4, 151-175.
- KLOETZEL, P. M. 2004. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nature Immunology*, 5, 661-669.
- KNEEN, M., FARINAS, J., LI, Y. & VERKMAN, A. S. 1998. Green Fluorescent Protein as a Noninvasive Intracellular pH Indicator. *Biophysical Journal*, 74, 1591-1599.

- KONDO, M. 2010. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunological reviews*, 238, 37-46.
- KOOPMANN, J.-O., POST, M., NEEFJES, J. J., HÄMMERLING, G. J. & MOMBURG, F. 1996. Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *European Journal of Immunology*, 26, 1720-1728.
- KOPITO, R. R. 1999. Biosynthesis and Degradation of CFTR. *Physiological Reviews*, 79, S167-S173.
- KUNDU, M., LINDSTEN, T., YANG, C.-Y., WU, J., ZHAO, F., ZHANG, J., SELAK, M. A., NEY, P. A. & THOMPSON, C. B. 2008. Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood*, 112, 1493-1502.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- LAIDLAW, B. J., CRAFT, J. E. & KAECH, S. M. 2016. The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. *Nature Review Immunology*, 16, 102-111.
- LAUMONT, C. M., DAOUDA, T., LAVERDURE, J.-P., BONNEIL, E., CARON-LIZOTTE, O., HARDY, M.-P., GRANADOS, D. P., DURETTE, C., LEMIEUX, S., THIBAUT, P. & PERREAULT, C. 2016. Global proteogenomic analysis of human MHC class I-associated peptides derived from non-canonical reading frames. *Nature Communications*, 7, 10238.
- LEE, S., LIU, B., LEE, S., HUANG, S.-X., SHEN, B. & QIAN, S.-B. 2012. Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, E2424-E2432.
- LEE, S. P., THOMAS, W. A., BLAKE, N. W. & RICKINSON, A. B. 1996. Transporter (TAP)-independent processing of a multiple membrane-spanning protein, the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2. *European Journal of Immunology*, 26, 1875-1883.
- LEONE, P., SHIN, E.-C., PEROSA, F., VACCA, A., DAMMACCO, F. & RACANELLI, V. 2013. MHC Class I Antigen Processing and Presenting Machinery: Organization, Function, and Defects in Tumor Cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 105, 1172-1187.
- LEVINE, B. & KROEMER, G. 2008. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, 132, 27-42.
- LÉVY, F., BURRI, L., MOREL, S., PEITREQUIN, A.-L., LÉVY, N., BACHI, A., HELLMAN, U., VAN DEN EYNDE, B. J. & SERVIS, C. 2002. The Final N-Terminal Trimming of a Subaminoterminal Proline-Containing HLA Class I-Restricted Antigenic Peptide in the Cytosol Is Mediated by Two Peptidases. *The Journal of Immunology*, 169, 4161-4171.
- LI, W.-W., LI, J. & BAO, J.-K. 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 1125-1136.
- LIANG, C., FENG, P., KU, B., DOTAN, I., CANAANI, D., OH, B.-H. & JUNG, J. U. 2006. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nature Cell Biology*, 8, 688-698.
- LIU, J., XIA, H., KIM, M., XU, L., LI, Y., ZHANG, L., CAI, Y., NORBERG, H. V., ZHANG, T., FURUYA, T., JIN, M., ZHU, Z., WANG, H., YU, J., LI, Y., HAO, Y., CHOI, A., KE, H., MA, D. & YUAN, J. 2011. Beclin1 Controls the Levels of p53 by Regulating the Deubiquitination Activity of USP10 and USP13. *Cell*, 147, 223-234.
- LOVITCH, S. B., PU, Z. & UNANUE, E. R. 2006. Amino-Terminal Flanking Residues Determine the Conformation of a Peptide-Class II MHC Complex. *The Journal of Immunology*, 176, 2958-2968.
- LUKACS, G. L., MOHAMED, A., KARTNER, N., CHANG, X. B., RIORDAN, J. R. & GRINSTEIN, S. 1994. Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *The EMBO Journal*, 13, 6076-6086.
- LUKACS, G. L. & VERKMAN, A. S. 2012. CFTR: folding, misfolding and correcting the Δ F508 conformational defect. *Trends in Molecular Medicine*, 18, 81-91.
- MACINTYRE, A. C. & CUTLER, D. J. 1988. Role of Lysosomes in Hepatic Accumulation of Chloroquine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77, 196-199.

- MALARKANNAN, S., HORNG, T., SHIH, P. P., SCHWAB, S. & SHASTRI, N. 1999. Presentation of Out-of-Frame Peptide/MHC Class I Complexes by a Novel Translation Initiation Mechanism. *Immunity*, 10, 681-690.
- MARSHALL, N. B. & SWAIN, S. L. 2011. Cytotoxic CD4 T Cells in Antiviral Immunity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 8.
- MATSUNAGA, K., SAITOH, T., TABATA, K., OMORI, H., SATOH, T., KUROTORI, N., MAEJIMA, I., SHIRAHAMA-NODA, K., ICHIMURA, T., ISOBE, T., AKIRA, S., NODA, T. & YOSHIMORI, T. 2009. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nature Cell Biology*, 11, 385-396.
- MAUTNER, J., PICH, D., NIMMERJAHN, F., MILOSEVIC, S., ADHIKARY, D., CHRISTOPH, H., WITTER, K., BORNKAMM, G. W., HAMMERSCHMIDT, W. & BEHREND, U. 2004. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 evades direct immune recognition by CD4+ T helper cells. *European Journal of Immunology*, 34, 2500-2509.
- MAVROPOULOS, A., SULLY, G., COPE, A. P. & CLARK, A. R. 2005. Stabilization of IFN- γ mRNA by MAPK p38 in IL-12- and IL-18-stimulated human NK cells. *Blood*, 105, 282-288.
- MEDZHITOV, R. & JANEWAY JR, C. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173, 89.
- MEHDI, H., ONO, E. & GUPTA, K. C. 1990. Initiation of translation at CUG, GUG, and ACG codons in mammalian cells. *Gene*, 91, 173-178.
- MIJALJICA, D., PRESCOTT, M. & DEVENISH, R. J. 2011. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 7, 673-682.
- MILLER, S., OLEKSY, A., PERISIC, O. & WILLIAMS, R. L. 2010. Finding a fitting shoe for Cinderella: Searching for an autophagy inhibitor. *Autophagy*, 6, 805-807.
- MINAMI, R., HAYAKAWA, A., KAGAWA, H., YANAGI, Y., YOKOSAWA, H. & KAWAHARA, H. 2010. BAG-6 is essential for selective elimination of defective proteasomal substrates. *The Journal of Cell Biology*, 190, 637-650.
- MIZUSHIMA, N., YOSHIMORI, T. & OHSUMI, Y. 2011. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 107-132.
- MOORE, M. W., CARBONE, F. R. & BEVAN, M. J. 1988. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell*, 54, 777-785.
- MUELLER, D. L., JENKINS, M. K. & SCHWARTZ, R. H. 1989. Clonal Expansion Versus Functional Clonal Inactivation: A Costimulatory Signalling Pathway Determines the Outcome of T Cell Antigen Receptor Occupancy. *Annual Review of Immunology*, 7, 445-480.
- MÜNZ, C. 2009. Enhancing Immunity Through Autophagy. *Annual Review of Immunology*, 27, 423-449.
- MÜNZ, C. 2016. Autophagy proteins in antigen processing for presentation on MHC molecules. *Immunological Reviews*, 272, 17-27.
- MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M., JANEWAY JR., C. A., MOWAT, A. & WEAVER, C. T. 2012. *Janeway's Immunobiology*, New York, Garland Science.
- NAGY, E. & RIGBY, W. F. C. 1995. Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Selectively Binds AU-rich RNA in the NAD⁺-binding Region (Rossmann Fold). *Journal of Biological Chemistry*, 270, 2755-2763.
- NATHANSON, L., XIA, T. & DEUTSCHER, M. P. 2003. Nuclear protein synthesis: A re-evaluation. *RNA*, 9, 9-13.
- NEEFJES, J., JONGSMA, M. L. M., PAUL, P. & BAKKE, O. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*, 11, 823-836.
- NEEFJES, J., MOMBURG, F. & HAMMERLING, G. 1993. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*, 261, 769-771.
- NELSON, C. A., PETZOLD, S. J. & UNANUE, E. R. 1993. Identification of two distinct properties of class II major histocompatibility complex-associated peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 1227-1231.

- NELSON, C. A., PETZOLD, S. J. & UNANUE, E. R. 1994. Peptides determine the lifespan of MHC class II molecules in the antigen-presenting cell. *Nature*, 371, 250-252.
- NIMMERJAHN, F., MILOSEVIC, S., BEHRENDT, U., JAFFEE, E. M., PARDOLL, D. M., BORNKAMM, G. W. & MAUTNER, J. 2003. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *European Journal of Immunology*, 33, 1250-1259.
- NORBURY, C. C. 2016. Defining cross presentation for a wider audience. *Current Opinion in Immunology*, 40, 110-116.
- O'SHEA, J. J. & PAUL, W. E. 2010. Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4+ T Cells. *Science*, 327, 1098-1102.
- O'FARRELL, F., RUSTEN, T. E. & STENMARK, H. 2013. Phosphoinositide 3-kinases as accelerators and brakes of autophagy. *FEBS Journal*, 280, 6322-6337.
- PALUDAN, C., SCHMID, D., LANDTHALER, M., VOCKERODT, M., KUBE, D., TUSCHL, T. & MÜNZ, C. 2005. Endogenous MHC Class II Processing of a Viral Nuclear Antigen After Autophagy. *Science*, 307, 593-596.
- PAULSSON, K. M., ANDERSON, P. O., CHEN, S., SJÖGREN, H.-O., LJUNGGREN, H.-G., WANG, P. & LI, S. 2001. Assembly of tapasin-associated MHC class I in the absence of the transporter associated with antigen processing (TAP). *International Immunology*, 13, 23-29.
- PEDEMONTE, N., LUKACS, G. L., DU, K., CACI, E., ZEGARRA-MORAN, O., GALIETTA, L. J. V. & VERKMAN, A. S. 2005. Small-molecule correctors of defective $\Delta F508$ -CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *The Journal of Clinical Investigation*, 115, 2564-2571.
- PEDEMONTE, N., TOMATI, V., SONDO, E. & GALIETTA, L. J. V. 2010. Influence of cell background on pharmacological rescue of mutant CFTR. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 298, C866-C874.
- PERERA, R. M. & ZONCU, R. 2016. The Lysosome as a Regulatory Hub. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32, 223-253.
- PFISTER, H. 2012. *Untersuchungen zur Autophagie-anhängigen Präsentation intrazellulärer Antigene auf MHC Klasse II Molekülen*. Dissertation, Ludwig Maximilians Universität München.
- PRLIC, M., WILLIAMS, M. A. & BEVAN, M. J. 2007. Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. *Current Opinion in Immunology*, 19, 315-319.
- PUERTOLLANO, R. 2014. mTOR and lysosome regulation. *F1000Prime Reports*, 6, 52.
- QIAN, S.-B., PRINCIOTTA, M. F., BENNINK, J. R. & YEWDELL, J. W. 2006a. Characterization of Rapidly Degraded Polypeptides in Mammalian Cells Reveals a Novel Layer of Nascent Protein Quality Control. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 392-400.
- QIAN, S.-B., REITS, E., NEEFJES, J., DESLICH, J. M., BENNINK, J. R. & YEWDELL, J. W. 2006b. Tight Linkage between Translation and MHC Class I Peptide Ligand Generation Implies Specialized Antigen Processing for Defective Ribosomal Products. *The Journal of Immunology*, 177, 227-233.
- RABENSTEIN, H., BEHRENDT, A. C., ELLWART, J. W., NAUMANN, R., HORSCH, M., BECKERS, J. & OBST, R. 2014. Differential Kinetics of Antigen Dependency of CD4+ and CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology*, 192, 3507-3517.
- RAJ, A., VAN DEN BOGAARD, P., RIFKIN, S. A., VAN OUDENAARDEN, A. & TYAGI, S. 2008. Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nature methods*, 5, 877-879.
- REITH, W., LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. & WALDBURGER, J.-M. 2005. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nature Reviews Immunology*, 5, 793-806.
- REITS, E. A. J., VOS, J. C., GROMME, M. & NEEFJES, J. 2000. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature*, 404, 774-778.
- RIEDEL, A. 2007. *Untersuchungen zur endogenen MHC-Klasse-II-restringierten Präsentation nukleärer Antigene*. Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

- RIESE, R. J., WOLF, P. R., BRÖMME, D., NATKIN, L. R., VILLADANGOS, J. A., PLOEGH, H. L. & CHAPMAN, H. A. 1996. Essential Role for Cathepsin S in MHC Class II–Associated Invariant Chain Processing and Peptide Loading. *Immunity*, 4, 357-366.
- ROBBINS, P. F., EL-GAMIL, M., LI, Y. F., FITZGERALD, E. B., KAWAKAMI, Y. & ROSENBERG, S. A. 1997. The intronic region of an incompletely spliced gp100 gene transcript encodes an epitope recognized by melanoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 159, 303-8.
- ROCHE, P. A. & FURUTA, K. 2015. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, 15, 203-216.
- ROCK, K. L., FARFÁN-ARRIBAS, D. J., COLBERT, J. D. & GOLDBERG, A. L. 2014. Re-examining class-I presentation and the DRiP hypothesis. *Trends in Immunology*, 35, 144-152.
- ROCK, K. L. & GOLDBERG, A. L. 1999. DEGRADATION OF CELL PROTEINS AND THE GENERATION OF MHC CLASS I-PRESENTED PEPTIDES. *Annual Review of Immunology*, 17, 739-779.
- ROCK, K. L., GRAMM, C., ROTHSTEIN, L., CLARK, K., STEIN, R., DICK, L., HWANG, D. & GOLDBERG, A. L. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, 78, 761-771.
- ROCK, K. L., YORK, I. A. & GOLDBERG, A. L. 2004. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nature Immunology*, 5, 670-677.
- ROCKEL, B., KOPEC, K. O., LUPAS, A. N. & BAUMEISTER, W. 2012. Structure and function of tripeptidyl peptidase II, a giant cytosolic protease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824, 237-245.
- ROMMENS, J., IANNUZZI, M., KEREM, B., DRUMM, M., MELMER, G., DEAN, M., ROZMAHEL, R., COLE, J., KENNEDY, D., HIDAKA, N. & AL., E. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 245, 1059-1065.
- ROSCOE, D. M., ISHIKAWA, K. & LYLES, D. S. 1991. Role of de novo protein synthesis in target cells recognized by cytotoxic T lymphocytes specific for vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology*, 65, 6856-6861.
- RUDOLPH, M. G., STANFIELD, R. L. & WILSON, I. A. 2006. HOW TCRS BIND MHCS, PEPTIDES, AND CORECEPTORS. *Annual Review of Immunology*, 24, 419-466.
- SAHU, R., KAUSHIK, S., CLEMENT, C. C., CANNIZZO, E. S., SCHARF, B., FOLLENZI, A., POTOLICCHIO, I., NIEVES, E., CUERVO, A. M. & SANTAMBROGIO, L. 2011. Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Developmental Cell*, 20, 131-139.
- SARKAR, S., FLOTO, R. A., BERGER, Z., IMARISIO, S., CORDENIER, A., PASCO, M., COOK, L. J. & RUBINSZTEIN, D. C. 2005. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *The Journal of Cell Biology*, 170, 1101-1111.
- SATO, S., WARD, C. L. & KOPITO, R. R. 1998. Cotranslational Ubiquitination of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 7189-7192.
- SCHMID, D., PYPAERT, M. & MÜNZ, C. 2007. Antigen-Loading Compartments for Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Continuously Receive Input from Autophagosomes. *Immunity*, 26, 79-92.
- SCHUBERT, U. 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404, 770-774.
- SCHWAB, S. R., SHUGART, J. A., HORNG, T., MALARKANNAN, S. & SHASTRI, N. 2004. Unanticipated Antigens: Translation Initiation at CUG with Leucine. *PLoS Biol*, 2, e366.
- SEDRANI, R., COTTENS, S., KALLEN, J. & SCHULER, W. 1998. Chemical modification of rapamycin: the discovery of SDZ RAD. *Transplantation Proceedings*, 30, 2192-2194.
- SEGLEN, P. O. & GORDON, P. B. 1982. 3-Methyladenine: Specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 1889-1892.

- SHIN, J.-S., EBERSOLD, M., PYPAERT, M., DELAMARRE, L., HARTLEY, A. & MELLMAN, I. 2006. Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature*, 444, 115-118.
- SHOR, B., GIBBONS, J. J., ABRAHAM, R. T. & YU, K. 2009. Targeting mTOR globally in cancer: Thinking beyond rapamycin. *Cell Cycle*, 8, 3831-3837.
- SMITH-GARVIN, J. E., KORETZKY, G. A. & JORDAN, M. S. 2009. T Cell Activation. *Annual Review of Immunology*, 27, 591-619.
- SNYDER, H. L., YEWDELL, J. W. & BENNINK, J. R. 1994. Trimming of antigenic peptides in an early secretory compartment. *The Journal of Experimental Medicine*, 180, 2389-2394.
- SPIES, T., CERUNDOLO, V., COLONNA, M., CRESSWELL, P., TOWNSEND, A. & DEMARS, R. 1992. Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature*, 355, 644-646.
- STARCK, S. R., JIANG, V., PAVON-ETERNOD, M., PRASAD, S., MCCARTHY, B., PAN, T. & SHASTRI, N. 2012. Leucine-tRNA Initiates at CUG Start Codons for Protein Synthesis and Presentation by MHC Class I. *Science*, 336, 1719-1723.
- STARCK, S. R., OW, Y., JIANG, V., TOKUYAMA, M., RIVERA, M., QI, X., ROBERTS, R. W. & SHASTRI, N. 2008. A Distinct Translation Initiation Mechanism Generates Cryptic Peptides for Immune Surveillance. *PLoS ONE*, 3, e3460.
- STARCK, S. R. & SHASTRI, N. 2016. Nowhere to hide: unconventional translation yields cryptic peptides for immune surveillance. *Immunological Reviews*, 272, 8-16.
- STEINMAN, R. M., MELLMAN, I. S., MULLER, W. A. & COHN, Z. A. 1983. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *The Journal of Cell Biology*, 96, 1-27.
- STERN, L. J. & SANTAMBROGIO, L. 2016. The melting pot of the MHC II peptidome. *Current Opinion in Immunology*, 40, 70-77.
- SWAIN, S. L., MCKINSTRY, K. K. & STRUTT, T. M. 2012. Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. *Nature Reviews Immunology*, 12, 136-148.
- TAN, S. H., SHUI, G., ZHOU, J., LI, J. J. E., BAY, B.-H., WENK, M. R. & SHEN, H.-M. 2012. Induction of Autophagy by Palmitic Acid via Protein Kinase C-mediated Signaling Pathway Independent of mTOR (Mammalian Target of Rapamycin). *Journal of Biological Chemistry*, 287, 14364-14376.
- TASSET, I. & CUERVO, A. M. 2016. Role of chaperone-mediated autophagy in metabolism. *The FEBS Journal*, 283, 2403-2413.
- THOREEN, C. C., KANG, S. A., CHANG, J. W., LIU, Q., ZHANG, J., GAO, Y., REICHLING, L. J., SIM, T., SABATINI, D. M. & GRAY, N. S. 2009. An ATP-competitive Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Reveals Rapamycin-resistant Functions of mTORC1. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 8023-8032.
- THURSTON, T. L. M., RYZHAKOV, G., BLOOR, S., VON MUHLINEN, N. & RANDOW, F. 2009. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nature Immunology*, 10, 1215-1221.
- TOWNSEND, A. R. M., GOTCH, F. M. & DAVEY, J. 1985. Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. *Cell*, 42, 457-467.
- TROMBETTA, E. S. & MELLMAN, I. 2005. CELL BIOLOGY OF ANTIGEN PROCESSING IN VITRO AND IN VIVO. *Annual Review of Immunology*, 23, 975-1028.
- TURK, V., STOKA, V., VASILJEVA, O., RENKO, M., SUN, T., TURK, B. & TURK, D. 2012. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824, 68-88.
- UENAKA, A., ONO, T., AKISAWA, T., WADA, H., YASUDA, T. & NAKAYAMA, E. 1994. Identification of a unique antigen peptide pRL1 on BALB/c RL male 1 leukemia recognized by cytotoxic T lymphocytes and its relation to the Akt oncogene. *The Journal of Experimental Medicine*, 180, 1599-1607.

- UNANUE, E. R., TURK, V. & NEEFJES, J. 2016. Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease. *Annual Review of Immunology*, 34, 265-297.
- VAN ENDERT, P. 2011. Post-proteasomal and proteasome-independent generation of MHC class I ligands. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 1553-1567.
- VAN GOOR, F., HADIDA, S., GROOTENHUIS, P. D. J., BURTON, B., STACK, J. H., STRALEY, K. S., DECKER, C. J., MILLER, M., MCCARTNEY, J., OLSON, E. R., WINE, J. J., FRIZZELL, R. A., ASHLOCK, M. & NEGULESCU, P. A. 2011. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 18843-18848.
- VAN KASTEREN, S. I. & OVERKLEEF, H. S. 2014. Endo-lysosomal proteases in antigen presentation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 23, 8-15.
- VAN MEEGEN, M. A., TERHEGGEN, S. W. J., KOYMANS, K. J., VIJFTIGSCHILD, L. A. W., DEKKERS, J. F., VAN DER ENT, C. K. & BEEKMAN, J. M. 2013. CFTR-mutation specific applications of CFTR-directed monoclonal antibodies. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12, 487-496.
- VAN NIEL, G., WUBBOLTS, R., TEN BROEKE, T., BUSCHOW, S. I., OSSENDORP, F. A., MELIEF, C. J., RAPOSO, G., VAN BALKOM, B. W. & STOOORVOGEL, W. 2006. Dendritic Cells Regulate Exposure of MHC Class II at Their Plasma Membrane by Oligoubiquitination. *Immunity*, 25, 885-894.
- VERSTREPEN, L., VERHELST, K., CARPENTIER, I. & BEYAERT, R. 2011. TAX1BP1, a ubiquitin-binding adaptor protein in innate immunity and beyond. *Trends in Biochemical Sciences*, 36, 347-354.
- VILLADANGOS, J. A., BRYANT, R. A. R., DEUSSING, J., DRIESSEN, C., LENNON-DUMÉNIL, A.-M., RIESE, R. J., ROTH, W., SAFTIG, P., SHI, G.-P., CHAPMAN, H. A., PETERS, C. & PLOEGH, H. L. 1999. Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunological Reviews*, 172, 109-120.
- VILLARINO, A. V., KATZMAN, S. D., GALLO, E., MILLER, O., JIANG, S., MCMANUS, M. T. & ABBAS, A. K. 2011. Posttranscriptional Silencing of Effector Cytokine mRNA Underlies the Anergic Phenotype of Self-Reactive T Cells. *Immunity*, 34, 50-60.
- VYAS, J. M., VAN DER VEEN, A. G. & PLOEGH, H. L. 2008. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, 8, 607-618.
- WAISMAN, A., LUKAS, D., CLAUSEN, B. E. & YOGEV, N. 2016. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Seminars in Immunopathology*, 1-11.
- WAN, J. & QIAN, S.-B. 2014. TISdb: a database for alternative translation initiation in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 42, D845-D850.
- WANG, Y., LOO, T. W., BARTLETT, M. C. & CLARKE, D. M. 2007. Correctors Promote Maturation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-processing Mutants by Binding to the Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 33247-33251.
- WARD, C. L. & KOPITO, R. R. 1994. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 25710-8.
- WARD, C. L., OMURA, S. & KOPITO, R. R. 1995. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*, 83, 121-127.
- WEI, M. L. & CRESSWELL, P. 1992. HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature*, 356, 443-446.
- WILD, P., FARHAN, H., MCEWAN, D. G., WAGNER, S., ROGOV, V. V., BRADY, N. R., RICHTER, B., KORAC, J., WAIDMANN, O., CHOUDHARY, C., DÖTSCH, V., BUMANN, D. & DIKIC, I. 2011. Phosphorylation of the Autophagy Receptor Optineurin Restricts Salmonella Growth. *Science*, 333, 228-233.
- WIRTH, M., JOACHIM, J. & TOOZE, S. A. 2013. Autophagosome formation—The role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. *Seminars in Cancer Biology*, 23, 301-309.

- WONG, P.-M., PUENTE, C., GANLEY, I. G. & JIANG, X. 2013. The ULK1 complex. *Autophagy*, 9, 124-137.
- WRIGHT, C. A., KOZIK, P., ZACHARIAS, M. & SPRINGER, S. 2004. Tapasin and other chaperones: models of the MHC class I loading complex. *Biological Chemistry*.
- WU, Y.-T., TAN, H.-L., SHUI, G., BAUVY, C., HUANG, Q., WENK, M. R., ONG, C.-N., CODOGNO, P. & SHEN, H.-M. 2010. Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III Phosphoinositide 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 10850-10861.
- YAGÜE, J., VÁZQUEZ, J. & CASTRO, J. A. L. D. 2000. A post-translational modification of nuclear proteins, NG,NG-dimethyl-Arg, found in a natural HLA class I peptide ligand. *Protein Science*, 9, 2210-2217.
- YAMAMOTO, A., CREMONA, M. L. & ROTHMAN, J. E. 2006. Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway. *The Journal of Cell Biology*, 172, 719-731.
- YANG, Z. J., CHEE, C. E., HUANG, S. & SINICROPE, F. A. 2011. The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Molecular cancer therapeutics*, 10, 1533-1541.
- YEWEDELL, J. W. 2005. The seven dirty little secrets of major histocompatibility complex class I antigen processing. *Immunological Reviews*, 207, 8-18.
- YEWEDELL, J. W., ANTÓN, L. C. & BENNINK, J. R. 1996. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *The Journal of Immunology*, 157, 1823-6.
- YEWEDELL, J. W. & NICCHITTA, C. V. 2006. The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension. *Trends in Immunology*, 27, 368-373.
- YU, J. & RUSSELL, J. E. 2001. Structural and Functional Analysis of an mRNP Complex That Mediates the High Stability of Human β -Globin mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 5879-5888.
- ZARLING, A. L., FICARRO, S. B., WHITE, F. M., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F. & ENGELHARD, V. H. 2000. Phosphorylated Peptides Are Naturally Processed and Presented by Major Histocompatibility Complex Class I Molecules in Vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 192, 1755-1762.
- ZHONG, Y., WANG, Q. J., LI, X., YAN, Y., BACKER, J. M., CHAIT, B. T., HEINTZ, N. & YUE, Z. 2009. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature Cell Biology*, 11, 468-476.
- ZHOU, D., LI, P., LIN, Y., LOTT, J. M., HISLOP, A. D., CANADAY, D. H., BRUTKIEWICZ, R. R. & BLUM, J. S. 2005. Lamp-2a Facilitates MHC Class II Presentation of Cytoplasmic Antigens. *Immunity*, 22, 571-581.
- ZHOU, J., TAN, S.-H., NICOLAS, V., BAUVY, C., YANG, N.-D., ZHANG, J., XUE, Y., CODOGNO, P. & SHEN, H.-M. 2013. Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion. *Cell Research*, 23, 508-523.
- ZHOU, L., CHONG, M. M. W. & LITTMAN, D. R. 2009. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*, 30, 646-655.
- ZINKERNAGEL, R. M. & DOHERTY, P. C. 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248, 701-702.
- ZONCU, R., BAR-PELED, L., EFEYAN, A., WANG, S., SANCAK, Y. & SABATINI, D. M. 2011. mTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids Through an Inside-Out Mechanism That Requires the Vacuolar H⁺. *Science*, 334, 678-683.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Prozessierung und Präsentation von Antigen auf MHC-Klasse-I-Molekülen.....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Prozessierung und Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-II-Molekülen.....	13
Abbildung 3: CFTRwt-GFP und CFTRmut-GFP Fusionsproteine werden exprimiert und sind in der Membran lokalisiert.....	50
Abbildung 4: CFTRwt und CFTRmut werden TAP-anhängig auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert.	52
Abbildung 5: Einfluss der Faltungsmodulatoren VX-809 und Corr4a auf die CFTRwt-GFP- und CFTRmut-GFP-Proteinmengen.....	53
Abbildung 6: Die VX-809- und Corr4a-Behandlung transfizierter Zellen führt zu erhöhten CFTRwt- und CFTRmut-Proteinspiegeln.....	55
Abbildung 7: Die Faltungsmodulatoren VX-809 und Corr4a haben keinen Effekt auf die Antigenpräsentation.	57
Abbildung 8: Schematische Darstellung des BZLF1 Gens und der eingeführten Veränderungen.....	58
Abbildung 9: Der Nachweis der Expression der verschiedenen BZLF1-Konstrukte.....	59
Abbildung 10: Die relativen BZLF1-Transkriptmengen werden durch die eingeführten Mutationen beeinflusst.....	60
Abbildung 11: Intron-kodierte T-Zellepitope werden nicht effizient auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert.	62
Abbildung 12: Schematische Darstellung der BZLF1-Expressionskonstrukte und der verschiedenen 3'UTRs.....	64
Abbildung 13: Die Präsentation des RAK-Epitops variiert in Abhängigkeit von der 3'UTR.	65
Abbildung 14: Antigenpräsentation und GFP-Signal korrelieren mit der Doxycyclin-Induktion der stabil transfizierten Zelllinien.....	66
Abbildung 15: Die BZLF1 Proteinexpression in Abhängigkeit von den 3' UTRs.....	67
Abbildung 16: Die 3'UTRs beeinflussen die Stabilität der BZLF1 mRNAs.	68
Abbildung 17: Schematische Darstellung der verschiedenen NeoR-Konstrukte.....	70
Abbildung 18: Die Länge der kodierenden Sequenzen hat einen Einfluss auf die Präsentation des DRY-Epitops.....	71
Abbildung 19: Schematische Darstellung der an das DRY-Epitop angefügten flankierenden Sequenzen.....	72
Abbildung 20: Kurze flankierende Regionen können die Präsentation des DRY-Epitops modulieren.	73

Abbildung 21: Die Präsentation der DRY-Konstrukte korreliert mit der transfizierten DNA-Menge. ... 74

Abbildung 22: Nachweis der Expression von NeoR Konstrukten mittels Dot-Blot..... 75

Abbildung 23: Erkennung exogen beladener NeoR-Konstrukte durch DRY-spezifische T-Zellen..... 76

Abbildung 24: Schematische Darstellung der Makroautophagie (blau) und Teilen des mTOR-Signalwegs (grün)..... 78

Abbildung 25: Einige Inhibitoren der Autophagie steigern den Anteil oder die Fluoreszenzintensität NeoR-GFP-positiver Zellen. 80

Abbildung 26: Einfluss der Autophagie-Inhibitoren auf die NeoR-GFP-Proteinspiegel..... 81

Abbildung 27: Autophagie-Inhibitoren verringern die Präsentation von NeoR-GFP auf MHC-Klasse-II-Molekülen. 82

Abbildung 28: Einige mTOR-Inhibitoren verringern den Anteil oder die Fluoreszenzintensität NeoR-GFP-positiver Zellen. 83

Abbildung 29: NeoR-GFP-Proteinspiegel sind nach Behandlung mit mTOR-Inhibitoren erniedrigt. ... 84

Abbildung 30: Die Präsentation von NeoR-GFP auf MHC-Klasse-II-Molekülen wird durch Inhibition von mTOR nicht verstärkt. 85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien 19

Tabelle 2: Verwendete Geräte 20

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien 21

Tabelle 4: Verwendete Puffer 21

Tabelle 5: HLA-Typisierung der verwendeten Zelllinien 22

Tabelle 6: Verwendete T-Zellen 23

Tabelle 7: Verwendete Zellkultur-Reagenzien..... 23

Tabelle 8: Verwendete Bakterienmedien 24

Tabelle 9: Verwendete Plasmide 25

Tabelle 10: Verwendete immunologische Reagenzien..... 29

Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper 30

Tabelle 12: Verwendete Sekundärantikörper..... 30

Tabelle 13: Verwendete Proteinbiochemische Reagenzien 31

Tabelle 14: PCR-Ansatz 34

Tabelle 15: Restriktionsenzym-Verdau 34

Tabelle 16: Enzymmix reverse Transkription..... 37

Tabelle 17: Sequenzen der Oligonukleotide für Zielgen und Referenzgene in der qPCR..... 37
Tabelle 18: Mastermix für ein Gen in der qPCR..... 38
Tabelle 19: qPCR-Programm im Lightcycler..... 38

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 24.11.2016

Anne-Wiebe Mohr

Erklärung

Hiermit erkläre ich, *

- dass die Dissertation **nicht** ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.
- dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.
- ~~dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach und in den Nebenfächern bei der Fakultät für der (Hochschule/Universität) unterzogen habe.~~
- ~~dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.~~

*) Nichtzutreffendes streichen

München, den 24.11.2016

Anne-Wiebe Mohr

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Jedem bedanken, der mich beim Anfertigen dieser Arbeit unterstützt hat.

Mein größter und herzlichster Dank geht an PD Dr. Josef Mautner und Prof. Dr. Uta Behrends. Vielen Dank für die Aufnahme in Eure Arbeitsgruppe und Euer Vertrauen in mich. Ich möchte Euch auch für die Anregungen, Diskussionen und gute Betreuung herzlich danken.

Vielen Dank, Frau Prof. Weiß, dass Sie sich bereit erklärt haben, meine Zweitgutachterin zu sein.

Vielen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe. Danke, liebe Doris und liebe Grit, für eure Unterstützung. Danke, liebe Steffi und Ana, für eure Ideen und Gesellschaft. Danke, lieber Dinesh, für die anregenden Diskussionen. Danke, liebe Praktikanten, für eure Mithilfe. Und Danke allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und Kollegen des Hämatologikums für die gute Zusammenarbeit.

Danke, liebe Freunde und Familie, für Eure Unterstützung und Geduld.

Danke, lieber Simon.

Lebenslauf