

Projekt 17: Charakterisierung Vaccinia Virus-kodierter Autophagie-Inhibitoren

(Projektleiter: Prof. Dr. Ingo Drexler)

Stand der Forschung:

Autophagie ist ein Prozeß, der unter verschiedenen Bedingungen von zellulärem Stress oder bei Infektionen aktiviert wird, um das Überleben der Zelle zu sichern oder sie in die Apoptose zu treiben. Intrazelluläre Erreger wie Viren haben Mechanismen entwickelt, um Autophagie für ihre Replikation zu nutzen oder autophagievermittelte antivirale Effekte wie z.B. Verdauung viraler Partikel zu antagonisieren. Daneben nimmt Autophagie eine wichtige Rolle als Bestandteil des adaptiven Immunsystems im Rahmen der Antigenprozessierung und –präsentation für T Zellen ein. Vaccinia Virus (VACV) ist ein großes dsDNA Virus. Es führt zu einer akuten viralen Infektion und wurde erfolgreich als Impfstoff für die Ausrottung der echten Pocken eingesetzt. Impfstoffe auf Basis von attenuierten Stämmen wie MVA (modifiziertes Vaccinia Virus Ankara) sind aufgrund ihrer Sicherheit und Immunogenität als rekombinante Vektorimpfstoffe bei Infektionskrankheiten und bei der Immuntherapie von Tumoren in klinischer Erprobung.

Eigene Vorarbeiten:

Wir konnten zeigen, dass Autophagie in MVA infizierten Zellen entscheidend zur MHC Klasse II Antigenprozessierung und –präsentation und damit zur CD4+ T Zellaktivierung beiträgt (1). Neben der kanonischen Autophagie gibt es noch alternative, nicht-kanonische Aktivierungswege, die weit weniger gut molekular und funktionell untersucht sind (2). Erst kürzlich wurde die Induktion von Autophagie durch exogenes cyclic-GMP-AMP (cGAMP) im nicht-infektiösen Kontext beschrieben (3). Die cGAS-cGAMP-STING aktivierte Autophagie beruht auf einem neuen Mechanismus unabhängig von ULK1/2, der u.a. WIPI2 und ATG5 benötigt und zeigt große Ähnlichkeit zu der STING-abhängigen Autophagie, welche im Rahmen der MVA Infektion induziert, aber durch virulente Stämme wie WR aktiv inhibiert wird. Durch siRNA-Screening konnten wir bereits inhibitorische virale Genprodukte des Stamms WR identifizieren, welche die Bildung von Autophagosomen verhindern bzw. deutlich verzögern.

Ziel des Projektes:

In diesem Projekt sollen die virale Antagonisten der STING-abhängigen nicht-kanonischen Autophagie molekular und funktionell charakterisiert werden. Dabei sollen auch die zellulären Interaktionspartner identifiziert und der neuartige Aktivierungsweg mittels immunologischer, molekular- und zellbiologischer Methoden näher untersucht werden. Eine detaillierte Kenntnis der Funktionsweise der viralen Antagonisten wird zudem zur Identifizierung neuer Zielstrukturen für immuntherapeutische Ansätze und zur Verbesserung der viralen Vektorimpfstoffe beitragen.

Arbeitsprogramm:

CRISPR/Cas9 Mutagenese zur Herstellung von WR-Deletionsmutanten (•WR) sowie MVA-BAC Mutagenese zur Generierung der revertanten MVA (revMVA). Detaillierte *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung der Mutanten bzw. Revertanten im Hinblick auf Immunogenität und die Fähigkeit Autophagie zu induzieren bzw. zu inhibieren. Des Weiteren die Identifikation der zellulären Interaktionspartner für STING-abhängige Induktion von nicht-kanonischer Autophagie nach Infektion. Methoden: Westernblot, Immunpräzipitation, FACS (Immun)Analyse, CLSM, siRNA, CRISPR/Cas9 Mutagenese, Intrazelluläre Zytokinfärbung, T Zellaktivierung, Vakzinierung, KO Mäuse, Hefe-2-Hybrid-Screen, Proximity Ligation Assays, Strukturanalysen.

(1) Thiele, F., Tao, S., Zhang, Y., Muschawekch, A., Zollmann, T., Protzer, U., Abele, R., & Drexler, I. (2015) *J Virol* **89**, 2698-709

(2) Tao, S. & Drexler, I. (2020) *Front Immunol*, in press

(3) Gui, X., Yang, H., Li, T., Tan, X., Shi, P., Li, M., Du, F. & Chen, Z.J. (2019) *Nature* **567**, 262-6.