

Funktionalität des Interferon TypI- und TypII- Signalwegs in Burkitt-Lymphom-Zellen

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

31. Januar 2008

vorgelegt von
Judith Mergler

angefertigt
am Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

**Gutachter: Prof. Dr. Dirk Eick
Prof. Dr. Michael Boshart**

Prüfung: 01. August 2008

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Schlee M, Holzel M, Bernard S, Mailhammer R, Schumacher M, Reschke J, Eick D, Marinkovic D, Wirth T, Rosenwald A, Staudt L.M, Eilers M, Baran-Marszak F, Fagard R, Feuillard J, Laux G, Bornkamm G.W (2007), *Int J Cancer*, 120, 1387-1395

„C-myc activation impairs the NF-kappaB and the interferon response: implications for the pathogenesis of Burkitt's lymphoma”

Die Arbeit wurde auf folgendem wissenschaftlichen Kongress präsentiert:

Summer School on Molecular Interactions during Infection, Quedlinburg 2006 (Poster)

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1	Das Epstein-Barr-Virus.....	1
1.1.1	Verbreitung und Pathogenität.....	1
1.1.2	Der Infektionszyklus.....	1
1.1.3	Die latenten EBV-Proteine und die B-Zellimmortalisierung.....	3
1.2	Das Burkitt Lymphom.....	5
1.2.1	Überblick.....	5
1.2.2	Das Burkitt Lymphom und Immunevasion.....	7
1.3	Das Interferon-System.....	9
1.3.1	Die Familie der Interferone.....	9
1.3.2	Induktion der TypI Interferone.....	10
1.3.3	Aktivierung der Expression von IFN γ	11
1.3.4	Der JAK-STAT Signalweg.....	11
1.3.5	Zelluläre Regulatoren des JAK-STAT Signalwegs.....	13
1.3.6	Zielgene von TypI und TypII IFN und deren Funktion.....	14
1.3.7	Virale Strategien gegen das Interferon-System.....	15
1.4	Zielsetzung.....	16
2.	ERGEBNISSE.....	18
2.1	Untersuchungen EBV-positiver und EBV-negativer BL-Linien.....	18
2.1.1	Stimulation verschiedener BL mit TypI und TypII IFN.....	18
2.1.2	Untersuchungen zur möglichen Beteiligung von EBV zur Resistenz gegenüber IFN γ	19
2.2	Analyse der Signalkomponenten des IFNγ-Signalwegs.....	20
2.2.1	Untersuchung möglicher Defekte in STAT1.....	21
2.2.2	Testen der Expression der IFN γ -Rezeptorketten.....	21
2.2.3	Untersuchung möglicher Defekte der Tyrosin-Kinasen JAK1 und JAK2.....	22
2.3	Wiederherstellung der Signalweiterleitung in IFNγ-resistenten Zelllinien.....	24
2.3.1	Transiente Transfektion mit JAK2.....	24
2.3.2	Stimulation der JAK2-exprimierenden Zellen.....	26
2.4	Unterscheidung zwischen einem genetischen und epigenetischen Mechanismus.....	27
2.4.1	Untersuchungen zur Methylierung des JAK2-Promotors.....	28

Inhaltsverzeichnis

2.5	Proliferationstest nach IFN-Behandlung	29
2.5.1	Zellzählung	29
2.5.2	MTT-Assay	30
2.6	Analyse von BL-Biopsien.....	32
2.7	Untersuchungen zum möglichen Einfluss der IFNγ-Resistenz auf die Immunevasion EBV-positiver Burkitt Lymphom-Zellen	33
2.7.1	⁵¹ Cr-Freisetzungsmessung	33
2.7.2	Expression der Komponenten des MHC-I-Wegs in EBV-positiven und EBV-negativen BL..	36
2.7.3	Kokultivierung mit CD40L-Zellen	37
3.	DISKUSSION	44
3.1	Evaluierung des Phänomens der IFNγ-Resistenz in EBV-positiven Latenz I Burkitt Lymphom-Zellen.....	44
3.2	Einfluss von EBV auf den Mechanismus der IFNγ-Resistenz.....	44
3.3	Untersuchungen zum Mechanismus der IFNγ-Resistenz	45
3.4	Untersuchungen zur Ursache der fehlenden JAK2-Expression.....	47
3.5	Beobachtungen zur IFNγ-Resistenz <i>ex vivo</i>	49
3.6	IFNγ-Resistenz und Immunevasion.....	49
3.7	Wirkung von TypI und TypII Interferonen auf die Proliferation von BL-Zellen.....	51
3.8	Ausblick	52
4.	MATERIAL UND METHODEN.....	53
4.1	Material.....	53
4.1.1	Chemikalien, Enzyme, Geräte und Reagenzien.....	53
4.1.2	Antikörper für Western-Blot	54
4.1.3	Plasmide	55
4.1.4	Bakterienstamm.....	55
4.1.5	Zelllinien	55
4.2	Molekularbiologische Methoden.....	60
4.2.1	DNA-Präparation und Analyse.....	60
4.2.2	VDJ-Rekombination.....	63
4.2.3	Techniken zur Isolation und Analyse von RNA.....	64

Inhaltsverzeichnis

4.3	Proteinbiochemische Methoden	68
4.3.1	Isolation und Aufbereitung von Proteinen aus Zellen	68
4.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	69
4.3.3	Western-Blot	69
4.3.4	Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörper.....	70
4.3.5	Strippen von Antikörper-beladenen Membranen	70
4.4	Zellkultur	71
4.4.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	71
4.4.2	Bestimmung der Zelldichte	71
4.4.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	71
4.4.4	Stimulation der BL-Linien und Biopsien mit IFN γ und IFN β	72
4.4.5	Behandlung von Akata und MutuI mit 5'-Azacytidin	72
4.4.6	Generierung JAK2 -exprimierender BL-Linien	72
4.4.7	Durchflusszytometrie (FACS).....	73
4.4.8	Kultivierung von LTK ⁻ - und CD40L-exprimierenden Zellen.....	74
4.4.9	⁵¹ Cr-Freisetzungsmessung	75
5.	ZUSAMMENFASSUNG	76
6.	LITERATURVERZEICHNIS	77
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	85
	TABELLENVERZEICHNIS	86
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	87
	DANKSAGUNG	90
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	92
	ERKLÄRUNG	93
	LEBENS LAUF	94

1. Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr-Virus

1.1.1 Verbreitung und Pathogenität

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) gehört zur Familie der γ -Herpesviren und infiziert vor allem humane B-Zellen; mit geringerer Effizienz infiziert es auch andere Zelltypen wie Epithelzellen (Borza & Hutt-Fletcher, 2002). In Biopsie-Material des Burkitt Lymphoms wurde zum ersten Mal das Auftreten von EBV in menschlichem Gewebe nachgewiesen (Epstein et al., 1964). Weltweit sind etwa 95% der Bevölkerung infiziert, die eine lebenslange, latente Infektion ausbilden. Die Primärinfektion erfolgt meist im Kindesalter und verläuft dann überwiegend asymptomatisch. Tritt die Infektion aber in späteren Jahren auf, kann sie häufiger zur sogenannten Infektiösen Mononukleose (IM) führen, einer selbst limitierenden lymphoproliferativen Erkrankung, die durch eine starke Immunantwort von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen charakterisiert ist. Nach der Erstinfektion persistiert EBV lebenslang in Gedächtnis-B-Zellen (Babcock et al., 1998).

Bei fehlender oder geschwächter Immunantwort (z.B. nach Organtransplantationen) kann eine EBV-Infektion durch die unkontrollierte Proliferation der Virus-tragenden Zellen zu malignen Tumorerkrankungen führen. Dazu gehören B-Zell-Lymphome wie das Burkitt-Lymphom (BL) und das Hodgkin-Lymphom (HL); EBV wird aber auch mit der Entstehung einiger T-Zell-Lymphome und Karzinome (z.B. Nasopharynxkarzinome) in Verbindung gebracht.

1.1.2 Der Infektionszyklus

Die Weitergabe des Virus erfolgt über den Speichel und die Infektion im Rachenraum, wo EBV ruhende B-Zellen effektiv infizieren kann. Nach der Aufnahme von EBV mit dem Speichel dringt das Virus durch die Epithelschicht in die darunter liegende Mantelzone ein. In dieser Zone befinden sich viele B-Zellen, die dem Virus als Zielzelle dienen. Die Bindung an die B-Zellen erfolgt über das virale Glycoprotein gp350, das an CD21 auf der B-Zelle bindet. CD21 dient als Rezeptor für das Komplementsystem bei einer durch ein Antigen ausgelösten Immunantwort. Zusätzlich dazu bindet das virale Glycoprotein gp42 an MHC-II Moleküle auf der B-Zelle. Das Virus wird durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und seine DNA im Zellkern zirkularisiert, amplifiziert und als Episom an Tochterzellen weitergegeben. Die Expression viraler Gene führt zur Aktivierung und Proliferation der infizierten B-Zelle (Thorley-Lawson, 2005; Young & Rickinson, 2004). Zytotoxische CD8⁺-T-Zellen (CTL), die

spezifisch für diese viralen Antigene sind, können die proliferierenden Zellen schnell eliminieren. Einige EBV-positive B-Zellen entgehen durch die Herunterregulation der Expression viraler Gene der Entdeckung durch das Immunsystem und können lebenslang in Gedächtnis-B-Zellen persistieren (Thorley-Lawson & Babcock, 1999). Die latent infizierten Gedächtnis-B-Zellen können durch AG-spezifische Stimulation der B-Zellen reaktiviert werden, was zu einer Virus-Produktion und der Neuinfektion von B-Zellen führt (Cohen, 2000). Wie EBV in das Gedächtnis-B-Zell-Kompartiment eintritt, ist noch nicht genau geklärt. Hierzu wurden zwei Modelle vorgeschlagen. Thorley-Lawson postulierte, dass EBV nur naive B-Zellen infiziert und in diesen durch die Expression verschiedener latenter Gene die physiologische Antigen-vermittelte Aktivierung und Differenzierung dieser B-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen imitiert (Thorley-Lawson & Babcock, 1999) (Abbildung 1A).

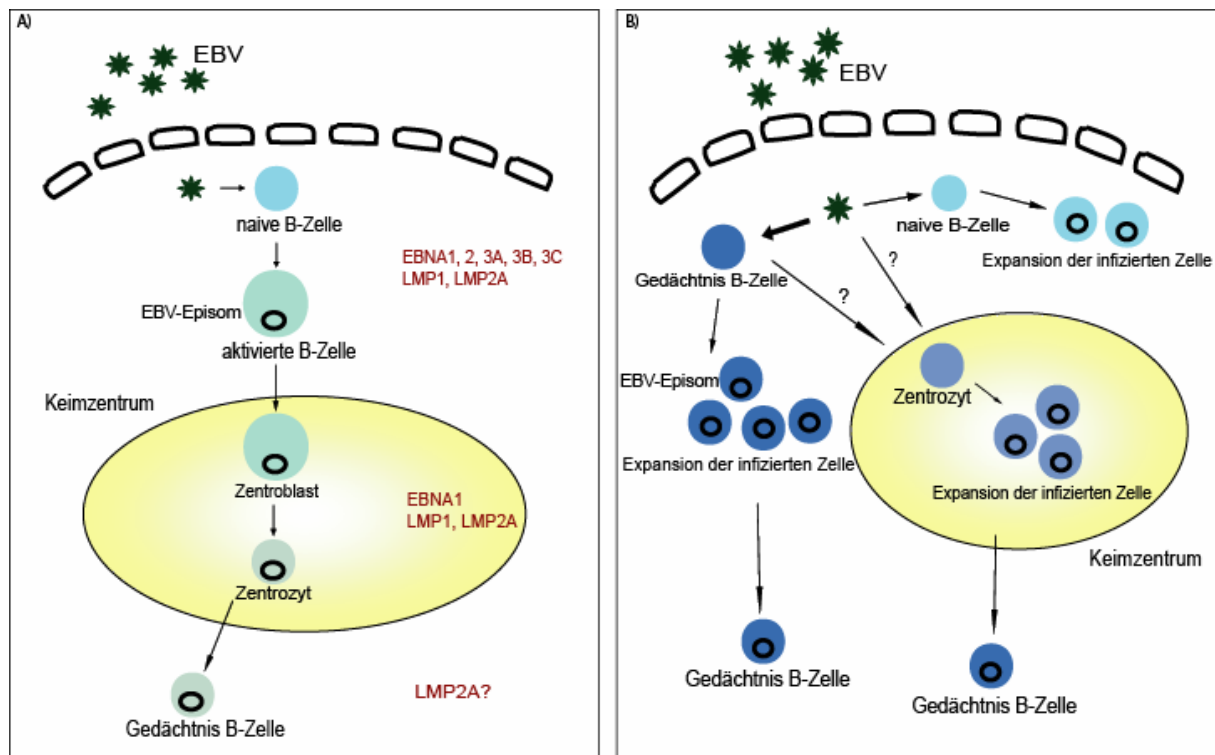


Abbildung 1: Infektionszyklen von EBV

A) Der Infektionszyklus nach Thorley-Lawson: EBV dringt durch die Epithelschicht in den Oropharynx ein und infiziert naive B-Zellen. Durch die Infektion werden die Zellen aktiviert und durchschreiten den Weg der Differenzierung zur Gedächtnis-B-Zelle. Dabei werden unterschiedliche Latenzphasen durchschritten, die durch die Expression verschiedener viraler Gene charakterisiert sind. Die viralen Gene tragen zum Überleben und zur Proliferation der Zelle auch ohne Antigen-Stimulation bei. Durch die Differenzierung der infizierten Zelle zur Gedächtnis-B-Zelle kann EBV eine lebenslange Infektion des Wirtes etablieren. Die latenten EBV-Gene, die in den unterschiedlichen Phasen exprimiert werden, sind in rot dargestellt.

B) Der Infektionszyklus nach Küppers: EBV dringt durch die Epithelschicht im Oropharynx und infiziert vor allem Gedächtnis- und Keimzentrums-B-Zellen. Naive B-Zellen werden nur mit geringer Effizienz infiziert. Diese Infektion führt zur Expansion der Zellen und zur Weitergabe des viralen Episoms an Tochterzellen. EBV-positive Zellen werden auch im Keimzentrum gefunden, es ist aber noch nicht klar, ob EBV direkt Keimzentrums-B-Zellen infizieren kann oder ob infizierte Gedächtnis-B-Zellen in das Keimzentrum wandern.

Demgegenüber stellte Küppers nach Untersuchungen von Zellen der Infektiösen Mononukleose jedoch das Modell auf, dass EBV auch Gedächtnis-B-Zellen direkt infizieren und dadurch die lebenslange Infektion etablieren kann (Küppers, 2003) (Abbildung 1B).

Ob die Unterschiede zwischen beiden Modellen auf unterschiedliche experimentelle Herangehensweisen zurückzuführen sind oder echte biologische Unterschiede zwischen gesunden EBV-positiven Personen (Thorley-Lawson & Babcock, 1999) und Patienten mit Infektiöser Mononukleose (Küppers, 2003) widerspiegeln, ist noch nicht geklärt.

1.1.3 Die latenten EBV-Proteine und die B-Zellimmortalisierung

Bei einer Infektion mit EBV können verschiedene Latenzphasen durchschritten werden, die durch die Expression verschiedener Kombinationen an viralen Genen charakterisiert sind. Insgesamt werden bisher vier Latenzphasen unterschieden (Kelly & Rickinson, 2007).

Tabelle 1: Latenzphasen und die exprimierten viralen Gene

Phase	EBER1,2	EBNA1	EBNA2	EBNA3A, 3B,3C,LP	LMP1	LMP2	BamHI-A Transkripte	Beispiel
Latenz 0	+					mRNA	+	Gedächtnis-B-Zellen
Latenz I	+	+					+	BL-Zellen
Latenz II	+	+			+	+	+	HL-Zellen
Latenz III	+	+	+	+	+	+	+	LCL

EBV hat die Fähigkeit *in vitro* ruhende B-Zellen zu infizieren und zur Proliferation anzuregen. Dies führt zur Etablierung einer Lymphoblastoiden Zelllinie (LCL), die als *in vitro*-Modell der Immortalisierung dient. Diese immortalisierten Zellen zeigen den Phänotyp der Latenz III. Dabei werden sechs EBV-nukleäre-Antigene (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C und LP), drei Latente Membran-Proteine LMP1, 2A und 2B, zwei nicht-kondierende RNAs (EBER1 und EBER2, EBV-encoded small RNA) und BamHI-A Transkripte (BARTs) exprimiert.

EBNA1 ist für die Aufrechterhaltung und Replikation des Genoms verantwortlich. Die vorkommenden Glyzin-Alanin-Wiederholungen tragen zur Stabilisierung des Proteins bei indem sie den Abbau durch das Proteasom verhindern (Levitskaya et al., 1995). Aufgrund seiner Struktur ist es nur schwach immunogen. EBNA1 kann von zwei Promotoren exprimiert werden, was sicherstellt, dass es auch unabhängig von EBNA2 produziert wird.

EBNA2 und LP sind die ersten Proteine, die nach einer Infektion detektiert werden können (Allday et al., 1989; Rooney et al., 1989). EBNA2 ist der Haupttranskriptionsaktivator aller anderer latenter viraler und einiger zellulärer Gene. EBNA2 ist essentiell für die Transformation der infizierten Zelle, was durch Experimente mit Zellen gezeigt werden konnte, in denen die Funktion von EBNA2 durch Fusion mit der Hormonbindungsdomäne des Östrogenrezeptors regulierbar gemacht wurde (Kempkes et al., 1995). EBNA2-negative Viren sind nicht in der Lage infizierte B-Zellen zu immortalisieren. Ebenso konnte gezeigt werden, dass EBNA2 eine funktionelle Äquivalenz zu Notch-IC aufweist, das die Differenzierung in B-Zellen bei der T-/B-Zelllinienentscheidung inhibiert und die Proliferation reifer B-Zellen beeinflusst (Gordadze et al., 2001; Hofelmayer et al., 2001; Radtke et al., 1999). Analog zu Notch-IC assoziiert EBNA2 mit RBP-J κ und kann auf diese Weise zur Blockade der Differenzierung der infizierten Zellen und zur anhaltenden Proliferation führen. Die zwei Hauptfunktionen von EBNA2 scheinen demnach die Aktivierung der Transkription der latenten Gene, sowie –gemeinsam mit den durch EBNA2 induzierten viralen latenten Genprodukten– die Expansion der infizierten B-Zellen zu sein. Damit die EBV-positive B-Zelle zur Gedächtnis-B-Zelle differenzieren kann, muss die Expression von EBNA2 abgeschaltet werden. Bisher konnte noch nicht gezeigt werden, durch welchen Mechanismus dies geschieht. Zusammen mit EBNA3A und 3C sowie LMP1 und LMP2 führt EBNA2 zur Proliferation der infizierten Zellen.

LMP1 ist ein konstitutiv-aktiver Rezeptor, der funktionell CD40 sehr ähnlich ist (Kilger et al., 1998; Zimmer-Strobl et al., 1996). LMP1 ahmt eine konstitutive Aktivierung des CD40-Rezeptors nach und führt über die Aktivierung der nachfolgenden Signalwege zur Proliferation der infizierten Zellen und verhindert die Induktion der Apoptose (Uchida et al., 1999). Ebenso wie LMP1 ist auch LMP2A ein konstitutiv-aktives virales Membranprotein. Das Hauptmerkmal dieses Proteins ist der Besitz eines ITAM-Motivs (Immunereceptor Tyrosine Activation Motif) in der zytoplasmatischen Domäne, das dem ITAM-Motiv der beiden B-Zell-Rezeptor (BCR) -Ketten entspricht (Beaufils et al., 1993; Engels et al., 2001). Über dieses Motiv kann es mit Mitgliedern der Src-Tyrosin-Kinase-Familie assoziieren und die anschließenden Signalwege aktivieren (Longnecker et al., 1991; Miller et al., 1993). Anfangs wurde vermutet, dass LMP2A als negativer Regulator der BCR-Signale fungiert und die Signalweiterleitung des BCR unterdrückt (Fruehling & Longnecker, 1997; Miller et al., 1993). Jedoch konnte inzwischen gezeigt werden, dass LMP2A sowohl in BCR-negativen genetisch veränderten Mäusen als auch in humanen BCR-negativen B-Zellen die antiapoptotische Wirkung der BCR-Stimulation übernimmt (Casola et al., 2004; Mancao &

Hammerschmidt, 2007). Die funktionelle Äquivalenz zwischen LMP2A und einem stimulierten BCR wird auch dadurch unterstrichen, dass LMP2A den lytischen Zyklus nicht unterdrückt, sondern induziert (Schaadt et al., 2005). In Gedächtnis-B-Zellen kann die mRNA von LMP2A als einziges latentes Gen *in vivo* detektiert werden (Babcock et al., 1998), was ebenso auf eine Überlebensfunktion von LMP2 hinweisen könnte. Die Rolle von LMP2B ist bisher noch nicht gut erforscht.

Die Funktion der nicht-kodierenden RNAs EBER1 und EBER2 ist ebenfalls noch nicht genau erforscht, sie scheinen aber eine wichtige Rolle zu spielen, da sie in allen Latenzstadien exprimiert sind. Es wurde berichtet, dass sie zur Ausschüttung von IL-10 beitragen, was zum Wachstum der infizierten Zelle und zur Unterdrückung der CTL-Antwort führt (Kitagawa et al., 2000). Es wurde zudem beschrieben, dass sie eine Rolle bei der Resistenz gegenüber der durch IFN α -ausgelösten Apoptose spielen (Nanbo et al., 2002; Takada & Nanbo, 2001).

BARTs sind eine Familie von mRNAs, die in allen EBV-positiven Zellen exprimiert werden, auch in gesunden Trägern. Trotz der weiten Verbreitung ist ihre Regulation und biologische Funktion nicht klar, jedoch konnte gezeigt werden, dass in Introns von BARTs Sequenzen für mikroRNAs (miRNA) zu finden sind (Pfeffer et al., 2004). Bisher wurden 14 solcher miRNAs in Introns von BARTs identifiziert (Cai et al., 2006) deren Funktion noch nicht gut erforscht ist. Für eine dieser miRNAs konnte beobachtet werden, dass sie die Expression einer viralen mRNA reguliert (Pfeffer et al., 2004). Die anderen miRNAs regulieren wahrscheinlich zelluläre mRNA-Moleküle (Pfeffer et al., 2004). Aufgrund ihrer breiten Expression in allen infizierten Zellen wird vermutet, dass sie mit der Immunantwort des Wirts interagieren oder an der Regulation von Apoptose und Zellwachstum beteiligt sind.

1.2 Das Burkitt-Lymphom

1.2.1 Überblick

Das Burkitt-Lymphom (BL) wurde erstmals vor 50 Jahren beschrieben und stellt eine sehr aggressive Form von Tumor dar (Burkitt, 1958). Es gibt drei Formen des BL, die durch die World Health Organization (WHO) klassifiziert wurden: die endemische, die sporadische und die mit einer Immunsuppression assoziierte Form. Die endemische Variante kommt in Zentralafrika und Neu Guinea als häufigster Tumor des Kindesalters vor und ist in nahezu 100% der Fälle mit einer EBV-Infektion verknüpft. Die sporadische Form hingegen ist mit deutlich geringerer Inzidenz weltweit verbreitet und zeigt eine Assoziation mit dem Virus nur in etwa 15-20% der Fälle, abhängig vom geographischen Ursprung (Kelly & Rickinson, 2007). Die in HIV-positiven Patienten vorkommende dritte Variante tritt oft als eines der

ersten Symptome von AIDS auf. Diese Art des Lymphoms wird hauptsächlich in erwachsenen Patienten beobachtet und zeigt eine EBV-Assoziation von 30-40% (Rickinson & Kieff, 2001). Bei der endemischen Form sind hauptsächlich die Kieferknochen betroffen, es können aber auch die Nieren, Eierstöcke und der Gastrointestinaltrakt befallen sein. Die Behandlung erfolgt mittels Chemotherapie, durch die Überlebensraten von etwa 90% über fünf Jahre erzielt werden können (Magrath et al., 1996), was aufgrund der schnellen Proliferation des Tumors mit einer Heilung gleichzusetzen ist.

Phänotypisch sind die Tumorzellen den Zentroblasten des Keimzentrums ähnlich, sie exprimieren die typischen Oberflächenmarker CD10 und CD77 und zeigen eine hohe Suszeptibilität gegenüber Apoptose. *Ex vivo* in Kultur genommene EBV-positive Tumoren zeigen eine Latenz I-Infektion (Rooney et al., 1986), *in vitro* können diese Tumorzellen nach mehreren Passagen jedoch auch einen Latenz III-Phänotyp ausbilden (Rowe et al., 1987). Die Latenz I wird durch Methylierung viraler und zellulärer Promotoren aufrecht erhalten, wohingegen der Wechsel zur Latenz III durch spontane Demethylierung der Promotoren verursacht wird. In endemischen EBV-positiven Fällen trägt jede Tumorzelle ein identisches EBV-Episom, was darauf hindeutet, dass EBV schon mit Beginn der Tumorentstehung in diesen Zellen zu finden war. Wie EBV zur Entstehung und/oder Pathogenese des Burkitt-Lymphom beiträgt, ist noch weitgehend unbekannt.

Alle Burkitt-Lymphome -unabhängig von ihrem geographischen Ursprung und einer EBV-Infektion- tragen eine von drei charakteristischen Chromosomen-Translokationen, die das *c-myc*-Proto-Onkogen unter die Kontrolle der Immunglobulin (Ig)-schweren (t(8;14)) oder einer der Ig-leichten Ketten (t(8;2) und t(8;22)) bringen und somit zur konstitutiven Überexpression von *c-myc* führen. Wahrscheinlich treten die Translokationen aufgrund fehlerhafter Schritte der B-Zellentwicklung wie VDJ-Rekombination, Klassenwechsel und somatischer Hypermutation (SHM) auf. c-Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl verschiedenster biologischer Prozesse positiv und auch negativ reguliert, dazu gehören Proliferation, Zellzyklus, Wachstum und Apoptose.

Die monoklonale Natur des Tumors schließt aus, dass EBV und die Translokation von c-Myc alleine zur Entstehung und Pathogenese dieser aggressiven Tumorart beitragen. In einigen BL-Fällen konnte beobachtet werden, dass auch das *p53*-Gen betroffen ist (Bhatia et al., 1992; Gaidano et al., 1991). So zeigen etwa 30% der untersuchten Biopsien eine Mutation im *p53*-Gen und oftmals auch den Verlust des zweiten Allels. Diese Mutationen beeinflussen die durch p53 induzierte Apoptose (Lindstrom & Wiman, 2002). Daneben wurde auch die Überexpression von MDM2, dem negativen Regulator von p53 beschrieben (Lindstrom &

Wiman, 2002), was ebenfalls einen negativen Effekt auf die Aktivität von p53 hat. Seit langem wird auch der Einfluss einer bereits bestehenden Infektion wie Malaria und HIV als Kofaktoren, die den Patienten für die Entstehung eines BL empfänglicher machen, diskutiert. Malaria ist holoendemisch in Gebieten verbreitet, in denen BL endemisch auftritt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Malaria-Infektion in diesen Regionen zu einer erhöhten Virus-Replikation und Virus-Last führt (Moormann et al., 2005). Der Zusammenhang zwischen einer Malaria-Infektion und einer EBV-Reaktivierung ist nicht gut verstanden, es wird aber vermutet, dass Proteine, die vom Erreger der Malaria *Plasmodium falciparum* exprimiert werden, zu einer direkten Reaktivierung von EBV während einer akuten Malaria-Infektion führen können und damit das Risiko für die Entwicklung von BL erhöhen (Chene et al., 2007). Es ist nicht auszuschließen, dass andere relevante zelluläre Gene und umweltbedingte Faktoren an der malignen Umwandlung der Zelle beteiligt sind.

1.2.2 Das Burkitt-Lymphom und Immunevasion

Es ist inzwischen allgemein anerkannt, dass das Immunsystem vor Tumoren viralen Ursprungs schützt (Klein & Klein, 1977). Eine wichtige Rolle bei der Abstoßung von Tumoren spielen sowohl Typ I (IFN α/β) als auch Typ II (IFN γ) Interferone.

Die Rolle von Typ I Interferonen ist noch nicht gut erforscht. IFN α/β werden von den meisten Zellen produziert und sind vor allem wegen ihrer antiviralen und antibakteriellen Aktivität bekannt. In letzter Zeit sind aber neuere Erkenntnisse über die Rolle von IFN α/β in der Immun-Überwachung erbracht worden. So konnte gezeigt werden, dass endogen produzierte Typ I IFNs für die Abstoßung transplantiert Tumoren benötigt werden (Dunn et al., 2005).

Für IFN γ konnte gezeigt werden, dass es an der Eliminierung von chemisch induzierten, spontan auftretenden und transplantierten Tumoren beteiligt ist (Kaplan et al., 1998). Es wird von Natürlichen Killerzellen (NK) und T-Zellen produziert und ist unter anderem maßgeblich an der Antigenprozessierung durch das Immunproteasom, der Hochregulation des TAP (Transporter associated with Antigen Processing)-Transporters und der Antigenpräsentation durch den MHC (Major Histocompatibility Complex) -Klasse I-Komplex beteiligt (Abbildung 2). Der Peptid-Transporter TAP ist für die Translokation von Peptiden aus dem Cytosol ins Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) verantwortlich. Dort werden die Peptide auf MHC-I-Moleküle geladen und können letztendlich an der Zelloberfläche von CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden.

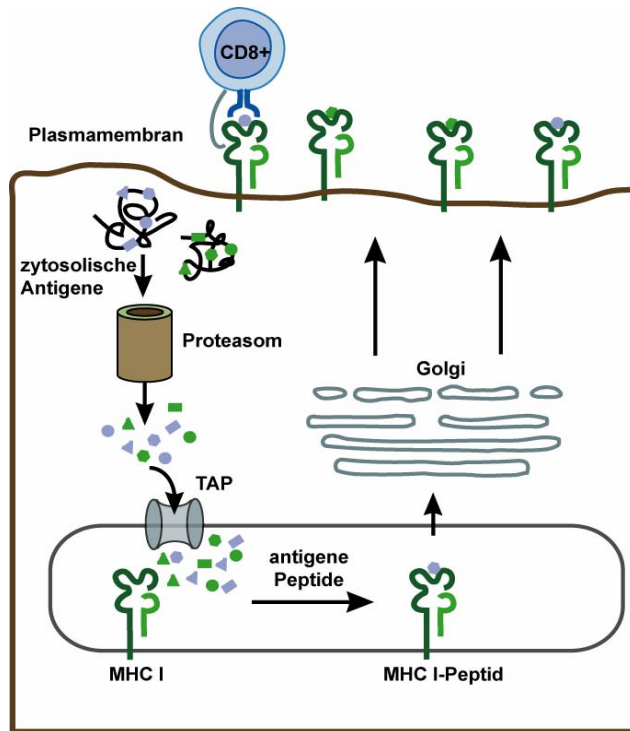


Abbildung 2: Antigenpräsentation durch den MHC-Klasse I-Komplexes

Fremdantigene werden im Cytosol der infizierten Zelle durch das Proteasom in Peptide gespalten und mit Hilfe des TAP-Transporters ins ER transportiert. Dort werden die Peptidfragmente durch MHC-I-Moleküle gebunden und letztendlich an der Zelloberfläche präsentiert.

Da Tumorzellen durch das Immunsystem einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt sind, können sich in diesem evolutionären Prozess nur solche Tumorzellen entwickeln, die vor der Entdeckung durch das Immunsystem geschützt sind. Deshalb zielt die Forschung immer stärker darauf, die Mechanismen dieser Immunevasion durch Tumorzellen zu ergründen und somit neue Ansätze zur Therapie zu erhalten.

Für das Burkitt Lymphom konnte gezeigt werden, dass EBV-positive BL-Zellen nicht vom Immunsystem erkannt werden, obwohl sie Fremdantigene exprimieren (Rooney et al., 1985). Dies ist nicht Ausdruck einer fehlenden Immunantwort gegen EBV beim Patienten. Alle EBV-positiven BL exprimieren das virale Protein EBNA1, das zur Aufrechterhaltung des viralen Genoms benötigt wird. Dieses Protein ist aufgrund seiner Struktur nur schwach immunogen, es enthält einen Gly-Ala-Repeat, der mit der proteasomalen Degradation interferiert (Levitskaya et al., 1995). Darüber hinaus konnten Lee und Mitarbeiter zeigen, dass auch solche BL-Zellen nicht erkannt werden, die die stark immunogenen viralen Proteine EBNA-3A, -3B, -3C exprimieren (Lee et al., 2004). BL-Zellen weisen Defekte in der Prozessierung und Präsentation dieser viralen Antigene auf. Durch Arbeiten mit Lymphoblastoiden Zelllinien, die durch die Expression des Proto-Onkogens *c-myc* zur Proliferation gebracht wurden, zeigte sich, dass sie ihre allostimulatorische Kapazität verlieren und denselben nicht-immunologischen Phänotyp aufweisen wie EBV-positive BL-Zellen (Staege et al 2002). Es konnte demonstriert werden, dass das Proto-Onkogen *c-myc* maßgeblich an diesem Prozess beteiligt ist, indem es unter anderem den Interferon- und den

NF κ B-Signalweg negativ reguliert (Schlee et al., 2007). Hierbei wurde erstmals beschrieben, dass nicht nur virale Proteine, sondern auch ein zelluläres Proto-Onkogenprodukt wie das c-Myc Genprodukt negativ in die Interferon-Signalkaskade eingreift und somit möglicherweise die Erkennung der Tumorzellen durch das Immunsystem verhindert.

1.3 Das Interferon-System

1.3.1 Die Familie der Interferone

Ursprünglich wurden Interferone (IFN) als Substanzen beschrieben, die von Virus-infizierten Zellen produziert werden, um mit der viralen Replikation zu interferieren (Isaacs & Lindenmann, 1957; Isaacs et al., 1957). Die Gruppe der Interferone wird aufgrund der biologischen Aktivität, der Genstruktur und der Zellen, von denen sie produziert werden, in drei Klassen eingeteilt (Pestka et al., 2004). TypI Interferone setzen sich aus den gut charakterisierten Genprodukten IFN α und IFN β zusammen, sowie den wenig erforschten IFN ω , IFN κ und IFN τ . In der vorliegenden Arbeit wird nur auf IFN α und IFN β eingegangen. Sie werden von Virus-infizierten Zellen produziert, um einen antiviralen Status in nicht-infizierten Zellen zu etablieren. Im Menschen wird IFN β durch ein Gen kodiert und IFN α von 13 verschiedenen Genen. Die IFN α und β Gene liegen auf Chromosom 9 (Roberts et al., 1998; Weissmann & Weber, 1986).

Zur zweiten Klasse der Interferone gehört IFN γ (auch TypII Interferon genannt), das vor allem durch aktivierte NK-Zellen oder T-Zellen gebildet wird, nicht jedoch von virus-infizierten Zellen (Farrar & Schreiber, 1993). Die Expression von IFN γ ist wichtig für die Aktivierung von Makrophagen, die einen effektiven Verteidigungsmechanismus gegenüber intrazellulären Mikroorganismen darstellen. Des Weiteren ist es an der Entwicklung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen beteiligt. Ebenso wie IFN β liegt das IFN γ -Gen als Einzel-Kopie vor und ist auf Chromosom 12 lokalisiert (Bach et al., 1997; Ikeda et al., 2002; Pestka, 1997). Neben diesen beiden lange bekannten Gruppen wurde vor einigen Jahren eine dritte Klasse (TypIII) beschrieben, zu der IFN λ 1, λ 2 und λ 3 gehören (Pestka et al., 2004). Bisher ist noch nicht viel über diese Klasse bekannt, sie werden wie TypI IFN durch virus-infizierte Zellen produziert und zeigen Ähnlichkeiten zu IFN α und β . Der weitere Fokus liegt aber auf den schon relativ gut erforschten TypI und TypII Interferonen.

Das Interferon-System setzt sich aus solchen Zellen zusammen, die IFN als Antwort auf externe Stimuli produzieren und solchen, die durch die Etablierung eines antiviralen Status auf IFN antworten. IFN haben autokrine und parakrine Wirkung, sie stellen einen Verteidigungsmechanismus dar, der schon vor Beginn der adaptiven Immunantwort aktiv ist. Inzwischen ist bekannt, dass IFN nicht nur anti-virale oder anti-mikrobielle Wirkung haben.

Sie spielen auch eine Rolle bei der Regulation des Zellwachstums, der Differenzierung und Apoptose (Samuel, 2001). Wie in Abschnitt 1.2.2 bereits beschrieben, wird ihnen auch eine Funktion bei der Tumorabwehr zugesprochen.

1.3.2 Induktion der TypI Interferone

Die Erkennung von Viren und die damit verbundene Aktivierung von TypI IFN kann generell auf zwei Arten erfolgen. Es gibt Transmembran-Rezeptoren (TLR, Toll-like-receptor), die Strukturen von Viren an der Membran binden und es gibt zytosolische Rezeptoren (RIG-I, Retinoic acid-Inducible Gene I, sowie MDA5, Melanoma Differentiation-Associated gene 5), die in den letzten Jahren als wichtige Faktoren identifiziert wurden, um die Expression von IFN zu stimulieren (Yoneyama et al., 2005; Yoneyama et al., 2004).

Die Induktion von TypI IFN über RIG-I und MDA5 wird in eine frühe und eine späte Phase unterteilt. In der frühen Phase werden mit Hilfe von RIG-I und MDA5 virale Strukturen erkannt (dsRNA). Über ihre RNA-Helikase-Domäne binden RIG-I und MDA5 virale RNA, was zu einer Konformationsänderung der beiden Proteine und der Aktivierung ihrer CARD-Domänen (Caspase-Recruitment and Activation Domain) führt. Über diese Domäne binden sie das Adaptor-Molekül IPS-1 (IFN β promotor stimulator-1, auch MAVS/VISA/Cardif), das ebenfalls eine CARD-Domäne besitzt und über eine Transmembran-Domäne an Mitochondrien lokalisiert ist. IPS-1 aktiviert viele verschiedene Signalproteine, die zum einen zur Aktivierung des NF κ B-Signalwegs und der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen führt (Kawai et al., 2005; Xu et al., 2005). Zum anderen werden Ser/Thr-Kinasen aktiviert, die IRF3 und IRF7 (Interferon Regulatory Factor) phosphorylieren und somit aktivieren. Durch die Phosphorylierung bilden IRF3 und 7 Homo- oder Heterodimere und induzieren die Produktion von IFN β (Oganesyan et al., 2006; Saha et al., 2006). Die späte Phase der TypI-Induktion wird durch die Bindung von IFN β an den TypI-Rezeptor eingeleitet. Dadurch wird letztendlich mehr IRF7 produziert, was zur Induktion von IFN α und mehr IFN β führt und somit einen positiven feedback-loop darstellt.

TLRs stellen eine Familie von Transmembran-Rezeptoren dar, die jeweils eine unterschiedliche Struktur bei Mikroorganismen erkennen. Sie besitzen alle eine TIR-Domäne (Toll-IL-1 receptor), mit der sie an Adaptor-Moleküle binden können, die ebenfalls eine TIR-Domäne besitzen. Zu diesen Adaptor-Molekülen gehören unter anderem MyD88 und Trif. Anhand dieser Adaptoren lässt sich die TLR-vermittelte TypI IFN-Induktion in zwei Kategorien einteilen, den MyD88-abhängigen und den Trif-abhängigen Signalweg (Akira et al., 2006). MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88) wird von allen TLRs außer TLR3 als Adaptor-Molekül genutzt, Trif (TIR domain containing adaptor-inducing

IFN) nur von TLR3 und TLR4. Beide aktivieren hauptsächlich den NF κ B- und den MAPK-Signalweg, spielen aber auch durch die Interaktion mit IRF3 (Trif) und IRF7 (MyD88) eine wichtige Rolle bei der Induktion von TypI IFN durch TLRs.

Hauptsächlich werden IFN α und IFN β von plasmacytoiden Dendritischen Zellen produziert (Siegal et al., 1999), in Kultur sind jedoch die meisten infizierten Zellen in der Lage, TypI IFN zu exprimieren.

1.3.3 Aktivierung der Expression von IFN γ

Die Expression von IFN γ erfolgt nicht sofort nach einer Infektion, sondern sozusagen in einer zweiten Welle. Zu Beginn einer Immunantwort wird es vor allem durch aktivierte T-Zellen produziert, später auch von NK-Zellen (Boehm et al., 1997). Viele Zytokine wurden beschrieben, die Produktion von IFN γ zu aktivieren, eine Schlüsselrolle spielt hier IL-12 (Trinchieri, 2003). Diese Zytokine können entweder allein oder in Kombination über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF κ B oder STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) die Expression induzieren (Sica et al., 1997; Szabo et al., 2000; Tsuji-Takayama et al., 1999). IFN α und IFN β wurden ebenfalls als Regulatoren beschrieben, die sowohl einen negativen als auch einen positiven Einfluss auf die IFN γ -Produktion haben können (Trinchieri, 2003).

1.3.4 Der JAK-STAT Signalweg

Über die Bindung von IFN an den jeweiligen Rezeptor wird hauptsächlich der JAK-STAT Signalweg aktiviert, zusammen mit anderen Signal-Kaskaden.

TypI IFNs besitzen einen gemeinsamen Rezeptor, der sich aus zwei Ketten zusammensetzt, IFN α R1 und IFN α R2 (Darnell et al., 1994; Stark et al., 1998), IFN γ bindet an einen eigenen Rezeptor, der ebenfalls aus zwei Ketten besteht, IFN γ R1 und IFN γ R2 (Bach et al., 1997; Stark et al., 1998). Die intrazellulären Domänen beider Rezeptoren interagieren mit einer Familie von Tyrosin-Kinasen, die Janus-Kinasen (JAK). Diese Familie besteht aus vier Mitgliedern JAK1, 2, 3 und Tyk2, die alle eine unterschiedliche Funktion in Cytokin-Signalwegen ausüben. Im IFN-TypI Signalweg ist JAK1 mit IFN α R2 assoziiert und Tyk2 mit IFN α R1. Beim IFN γ -Rezeptor ist JAK1 konstitutiv mit IFN γ R1 assoziiert, wohingegen JAK2 an IFN γ R2 bindet. Die Bindung von TypI IFNs an ihren Rezeptor führt zur Dimerisierung der beiden Rezeptorketten; die Bindung eines IFN γ -Dimers an den IFN γ -Rezeptor führt zur Tetramerisierung beider Rezeptorketten. Die assoziierten Tyrosin-Kinasen werden durch Autophosphorylierung aktiviert und phosphorylieren ihrerseits Tyrosin-Reste an den Rezeptorketten. An diese phosphorylierten Aminosäuren kann dann ein STAT-Molekül über

seine SH2-Domäne binden und durch JAKs an Tyrosin-Resten bzw. durch Serinkinasen an Serin-Resten phosphoryliert werden. Dies führt zur Homo- oder Heterodimerisierung von STAT-Molekülen, Wanderung der Komplexe in den Zellkern, Bindung an spezifische DNA-Sequenzen und Induktion ihrer Zielgene.

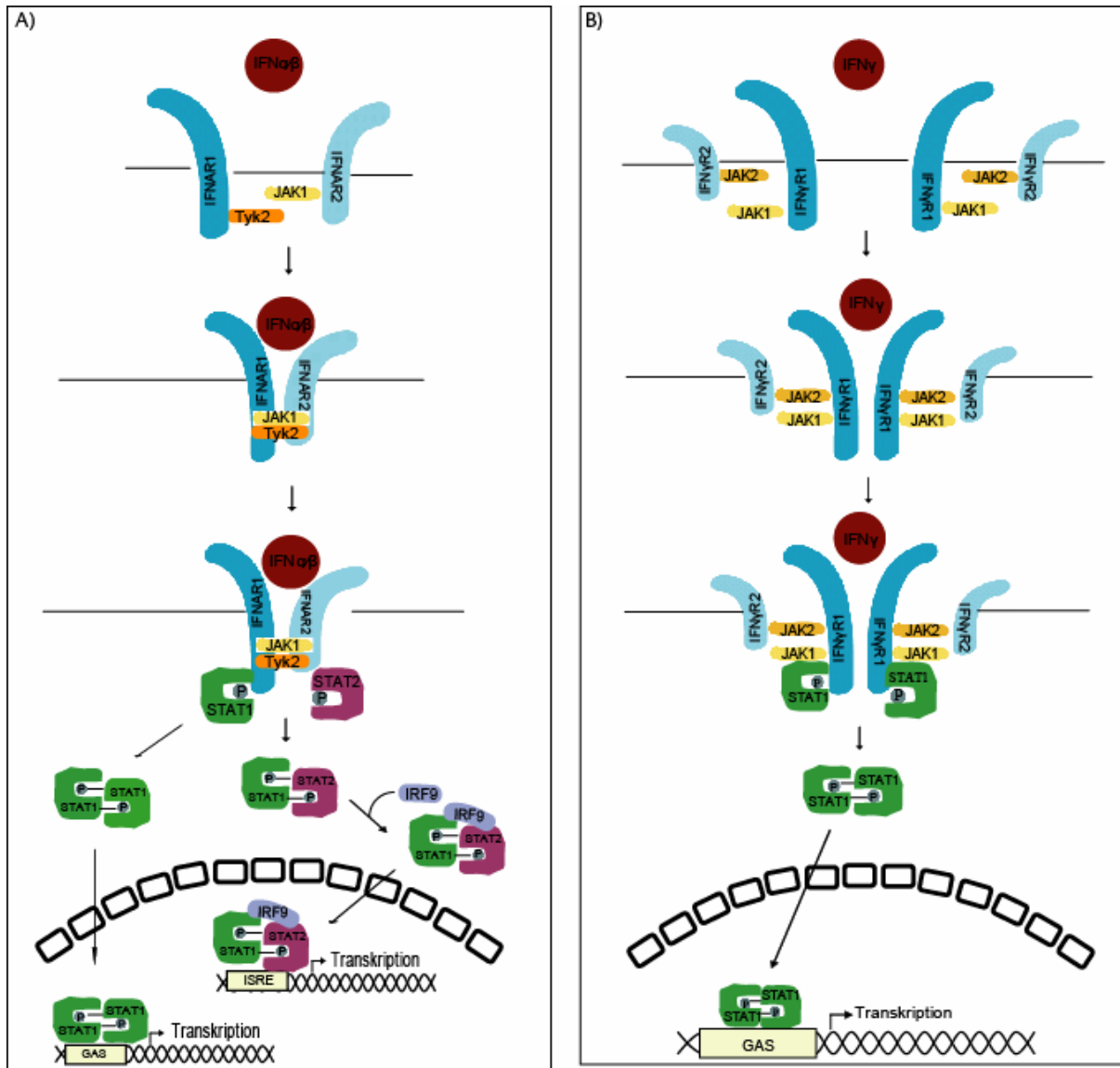


Abbildung 3: JAK-STAT Signalwege

A) Typ I IFN: Die Bindung von IFN α/β an den IFN α -Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung im Rezeptor, welche die assoziierten Tyrosin-Kinasen JAK1 und Tyk2 aktiviert. Diese Kinasen phosphorylieren Tyrosin-Reste an den Rezeptorketten, woran STAT-Moleküle über ihre SH2-Domänen binden können. JAKs phosphorylieren STAT1 und STAT2 an Tyrosin 701, was diese zur Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren befähigt. Heterodimere bilden mit IRF9 den sogenannten ISGF3-Komplex, der in den Kern wandert, an ISRE-Sequenzen bindet und die Transkription verschiedener Zielgene aktiviert. Als Homodimer bindet STAT1 an GAS-Sequenzen an der DNA.

B) Typ II IFN: Die Signalweiterleitung erfolgt wie unter A) beschrieben. Im Gegensatz zu Typ I IFN bindet ein IFN γ -Dimer an einen tetrameren IFN γ -Rezeptor, der aus je zwei IFN γ R1- und IFN γ R2-Ketten besteht. Im Falle von IFN γ ist JAK2 anstatt Tyk2 an der Phosphorylierung der Rezeptorketten und STAT-Moleküle beteiligt. Hier wird nur STAT1 phosphoryliert. Diese STAT1-Homodimere binden an GAS-Sequenzen in der DNA und aktivieren die Transkription verschiedener Zielgene.

Im TypI IFN-Signalweg werden STAT1 und STAT2 phosphoryliert, die mit IRF9 den sogenannten ISGF3-Komplex (IFN-stimulated gene factor 3) bilden (Darnell et al., 1994). Hierzu konnte vor kurzem gezeigt werden, dass nach der Stimulation des IFN α -Rezeptors CBP (CREB-binding protein) an die phosphorylierte β -Kette des Rezeptors bindet und ein bestimmtes Lysin (Lys399) acetyliert. An dieses acetylierte Lysin kann IRF9 binden und die Bildung des ISGF3-Komplexes durch die Rekrutierung von STAT1 und STAT2 an den Rezeptor induzieren (Tang et al., 2007). ISGF3 wandert in den Kern und aktiviert durch die Bindung an ISRE-Sequenzen (IFN-stimulated regulatory element) die Expression verschiedenster Zielgene mit antiviraler Aktivität. STAT1 bildet aber auch Homodimere aus, welche an GAS-Sequenzen binden (Abbildung 3A). Bei der Aktivierung des IFN γ -Signalwegs wird nur STAT1 phosphoryliert und bildet Homodimere (Decker et al., 1991). Diese Dimere wandern in den Kern und binden an GAS-Sequenzen (γ -activated sequences) in Promotoren von Zielgenen (Abbildung 3B).

1.3.5 Zelluläre Regulatoren des JAK-STAT Signalwegs

Durch die Bindung von IFN und anderer Zytokine an ihre Rezeptoren wird nicht nur die Expression bestimmter Zielgene induziert, es werden auch Proteine aktiviert, die die Signalweiterleitung negativ regulieren. Mit Hilfe dieser Proteine wird die Dauer und Stärke einer Immunantwort kontrolliert. Es gibt verschiedene Regulatoren, die den JAK-STAT Signalweg und damit auch die Wirkung von IFNs negativ beeinflussen. Die drei bekanntesten sind SOCS (suppressor of cytokine signaling), Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) und PIAS (protein inhibitors of activated STATs).

Die Familie der SOCS-Proteine setzt sich aus acht Mitgliedern zusammen, SOCS1-7 und CIS (cytokine-inducible SH2-containing protein). Im Allgemeinen sind SOCS-Proteine in unstimulierten Zellen nur in geringer Menge exprimiert, die Expression wird aber sehr schnell durch die Stimulation mit Zytokinen hochreguliert. Die Rolle von SOCS1, 3 und CIS bei der Regulation des JAK-STAT Signalwegs wurde bereits gut charakterisiert, sie zeigen unterschiedliche Mechanismen. SOCS1 interagiert direkt mit JAK-Kinasen und inhibiert ihre katalytische Aktivität (Endo et al., 1997; Naka et al., 1999). SOCS3 hingegen bindet an den Rezeptor und inhibiert dort die Aktivität von JAKs (Sasaki et al., 2000). CIS bindet an die phosphorylierten Tyrosine der Rezeptorketten und konkurriert mit STAT-Molekülen um die Bindung an den Rezeptor (Yoshimura, 1998).

PTPs wie SHP1, SHP2 (beide SH2-domain containing PTPs) oder CD45 sind konstitutiv aktive Tyrosinphosphatasen. Sie binden direkt an phosphorylierte JAK-Kinasen und dephosphorylieren sie, dabei tragen sie zur Inhibition der Signalweiterleitung bei (David et

al., 1995; Irie-Sasaki et al., 2001; You et al., 1999). PTPs können aber auch an phosphorylierte STAT-Moleküle binden und diese dephosphorylieren, wie für SHP2 und STAT5 gezeigt werden konnte (Chen et al., 2003).

Zur Gruppe der regulatorischen Proteine, die ebenfalls die Aktivität von STAT-Molekülen beeinflussen gehört die Familie der PIAS-Proteine. Bisher wurden vier Mitglieder beschrieben, PIAS1, 3, X, Y (Liu et al., 1998; Shuai, 2000), die mit verschiedenen STAT-Mitgliedern interagieren. Wie PTPs sind PIAS-Proteine konstitutiv aktiv, die Interaktion mit STATs ist aber Zytokin-abhängig, sie erfolgt nicht in unstimulierten Zellen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass PIAS nur STAT-Dimere binden kann, jedoch nicht STAT-Monomere (Liao et al., 2000). Es wurden verschiedene Mechanismen für die Aktivität von PIAS beschrieben. So ist bekannt, dass PIAS1 und 3 die DNA-Bindung von STAT-Dimeren verhindern, wohingegen PIASX und Y die STAT-abhängige Transkription blockieren ohne die DNA-Bindung zu beeinträchtigen (Arora et al., 2003; Chung et al., 1997; Liu et al., 2001; Liu et al., 1998).

1.3.6 Zielgene von TypI und TypII IFN und deren Funktion

Die Replikation vieler verschiedener RNA- und DNA-Viren wird durch IFN inhibiert. Hierfür werden unterschiedliche Proteine induziert, die antivirale Aktivität zeigen. Dazu gehören die Protein-Kinase PKR, die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS) und RNaseL, die RNA-spezifische Adenosin Deaminase (ADAR) und Mx-Protein GTPasen.

PKR ist eine RNA-abhängige Serin/Threonin-Kinase, die konstitutiv exprimiert wird (Clemens & Elia, 1997; Williams, 1999). Die Aktivierung erfolgt durch Autophosphorylierung, die durch dsRNA induziert wird. Die so aktive PKR katalysiert die Phosphorylierung verschiedener Proteine, die an der Translation beteiligt sind, wie zum Beispiel eIF2 α (α -Untereinheit des eukaryotischen Proteinsynthese Initiationsfaktor 2) (Panniers & Henshaw, 1983) und Phosphatase 2A (Xu & Williams, 2000). Als Konsequenz wird die Translation viraler und zellulärer RNA blockiert.

Die Degradation viraler RNA erfolgt mit Hilfe von OAS und RNaseL (Player & Torrence, 1998; Rebouillat & Hovanessian, 1999). Es gibt drei Formen von OAS (OAS1-3), die in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten zu finden sind und sich in den Bedingungen, die zu ihrer Aktivität führen, sowie in der Länge der Oligoadenylaten (2-5A), die sie produzieren, unterscheiden. Der Grund für diese Unterschiede ist bisher noch nicht bekannt. OAS werden während viraler Infektionen aktiviert, dabei ist die Menge an induzierten OAS abhängig vom IFN-Typ, Zelltyp und Wachstums-Status der Zelle (Samuel, 1991; Stark et al., 1998). RNaseL hat Endoribonuklease-Aktivität und wird durch 2-5A Oligonukleotide

aktiviert. Das Auftreten eines funktionellen 2-5A Oligomers führt zur Konformationsänderung der inaktiven Monomer-Form in die aktive Dimer-Form (Dong & Silverman, 1995; Dong et al., 1994). Aktivierte RNaseL katalysiert die Degradation viraler und zellulärer RNA.

Neben der Degradation von RNA ist die post-transkriptionale Modifikation ein wirkungsvoller Mechanismus, um die funktionelle Aktivität viraler und zellulärer RNA zu verändern. IFN-induzierbare ADAR1 (RNA-specific Adenosin Deaminase) gehört zu den Proteinen, die RNAs modifizieren können (Patterson & Samuel, 1995; Patterson et al., 1995). Die Deaminierung von Adenosin zu Inosin destabilisiert dsRNA durch die Zerstörung von Basenpaaren (Wagner et al., 1989). Nach IFN-Behandlung ist eine Akkumulation von ADAR1-Transkripten um etwa das 5-fache zu beobachten.

Die wohl am Besten charakterisierten IFN-induzierbaren Genprodukte mit antiviraler Aktivität sind die Protein Mx-GTPasen (MxA1-3). Ihre intrinsische GTPase-Aktivität wird für die antivirale Aktivität benötigt. Sie sind in der Lage, virale Replikation ohne die Mithilfe eines anderen Proteins zu blockieren (Haller et al., 1998). Die Assoziation erfolgt mit sich selbst und viralen Protein-Komplexen. Mx-GTPasen werden durch TypI IFN, nicht jedoch durch TypII IFN induziert (Simon et al., 1991). Das Spektrum an antiviraler Aktivität und molekularer Mechanismen zur Inhibition viraler Replikation ist vom spezifischen Mx-Protein, seiner zellulären Lokalisation und dem Virus-Typ abhängig.

1.3.7 Virale Strategien gegen das Interferon-System

Viren haben verschiedene Strategien entwickelt, den antiviralen Aktivitäten des Interferon-Systems entgegenzuwirken. So blockieren sie entweder die Synthese von IFNs, binden und inaktivieren IFN-Moleküle, blockieren IFN-aktivierte Signale oder verhindern die Wirkung von IFN-induzierten antiviralen Proteinen. Hierbei gibt es Systeme, die weitläufig die Transkription und Translation der Wirtszelle abschalten, und solche, die gegen spezifische Faktoren gerichtet sind. Bei der generellen Inhibition von Transkription und Translation muss nicht zwingend eine Komponente des IFN-Signalwegs blockiert werden, es reicht die generelle Blockade der Replikation, um die Signalweiterleitung zu unterbinden (Chee & Roizman, 2004; Chen et al., 1999). Bei der spezifischen Inhibition von IFN-Komponenten gibt es verschiedene Strategien, die antivirale Aktivität zu unterdrücken. Hierbei ist es möglich, dass ein virales Protein verschiedene Komponenten des IFN-Induktions- sowie des IFN-Signalwegs inhibiert und dass ein Virus mehrere Strategien gegen die Aktivität von IFNs entwickelt hat. So bindet das virale Protein NS1 von Influenza B Viren unter anderem an dsRNA und inhibiert dadurch die Induktion von TypI IFNs (Dauber et al., 2004). Daneben

blockiert NS1 auch die Polyadenylierung von mRNA und hat einen positiven Einfluss auf die Translation viraler mRNA (Krug et al., 2003). V-Proteine einiger Paramyxoviren binden an MDA5 und inhibieren dadurch die Induktion von IFN (Andrejeva et al., 2004) und führen darüber hinaus durch Ubiquitinierung zur Degradation von STAT1 (Precious et al., 2005). Auch Mitglieder der IRF-Familie bilden Angriffspunkte viraler Mechanismen gegen eine Induktion von IFNs. Hier ist am häufigsten IRF3 betroffen, das einen erheblichen Einfluss auf die Induktion von TypI-Interferonen hat (Foy et al., 2003). Es wurde beschrieben, dass die Aktivierung von IRF3 blockiert sein kann (Basler et al., 2003; Brzozka et al., 2005; Unterstab et al., 2005) oder virale IRF-Homologe exprimiert werden, die die Aktivität des zellulären IRF nachahmen oder einen dominant-negativen Effekt ausüben (Lubyova et al., 2004; Lubyova & Pitha, 2000). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Expression von SOCS-Proteinen induziert wird, welche negative Regulatoren des JAK-STAT-Signalwegs sind (Bode et al., 2003; Yokota et al., 2004). Auch die Zielgene des IFN-Systems sind Ziele viraler Antagonisten. Viren mit dsRNA-Binde-Aktivität haben nicht nur eine Strategie gegen die Induktion von IFN entwickelt, sie wirken somit auch der Aktivität von IFN-induzierten Genen wie PKR und OAS entgegen (Vyas et al., 2003).

Die bisherigen Kenntnisse über die Komponenten des Interferon-Systems und ihre viralen Gegenspieler sind begrenzt. Die Erforschung und das Verständnis viraler Strategien, die gegen die Immunantwort der Wirtszelle gerichtet sind, könnten helfen, neue antivirale Medikamente und Therapien zu entwickeln.

1.4 Zielsetzung

Durch Vorarbeiten zum Einfluss des Proto-Onkogens *c-myc* auf die Immunerkennung und die Interferon-Signalwege, die die Immunerkennung steuern, wurde die Beobachtung gemacht, dass EBV-positive BL-Linien auf IFN γ nicht mit einer Phosphorylierung von STAT1 antworten. In EBV-negativen BL-Linien wird STAT1 dagegen durch IFN γ -Behandlung an Tyrosin 701 phosphoryliert. Es ist bekannt, dass EBV-positive BL-Zellen trotz der Expression von Fremdanigenen nicht vom Immunsystem erkannt werden. Die IFN γ -Resistenz könnte einer der Mechanismen für die Immunevasion dieser Tumorzellen sein, da wichtige Gene für die zellvermittelte Immunantwort (wie z.B. MHC-Moleküle, Komponenten des Immunproteasoms und Peptidtransporters) durch IFN γ -regulatorische Promotorelemente stimuliert werden.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Phänomens der IFN γ -Resistenz in EBV-positiven Burkitt Lymphom-Zellen im Latenz I-Phänotyp. Hierbei sollte zuerst der Mechanismus der Resistenz und die mögliche Beteiligung eines viralen Genprodukts ermittelt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, welche Wirkung diese Resistenz auf die T-Zell-Erkennung EBV-positiver BL-Zellen hat.

2. Ergebnisse

Um den Mechanismus des Phänomens der IFN γ -Resistenz und den möglichen Einfluss auf die Immunevasion zu verstehen, wurden in der vorliegenden Arbeit EBV-negative und EBV-positive BL auf ihre Gemeinsamkeiten und Unterschiede hinsichtlich der Reaktivität gegenüber TypI und TypII IFN untersucht. Neben der Analyse des Phänomens sollte die Regulation immunmodulatorischer Proteine studiert werden.

2.1 Untersuchungen EBV-positiver und EBV-negativer BL-Linien

Um herauszufinden, ob die beobachtete IFN γ -Resistenz allgemein in EBV-positiven BL-Zellen mit einem Latenz I-Phänotyp zu beobachten ist, wurden viele verschiedene Zelllinien auf ihre Sensitivität gegenüber TypI und TypII IFN getestet. Als Kontrollen wurden EBV-negative BL, LCL sowie EBV-positive BL im Latenz III-Phänotyp herangezogen. Neben der Behandlung mit IFN γ erfolgte auch eine Stimulation mit IFN β um zu untersuchen, ob eine generelle Resistenz gegenüber IFN vorliegt. Eine ausführliche Beschreibung der untersuchten Zelllinien ist in Abschnitt 4.1.5 zu finden.

2.1.1 Stimulation verschiedener BL mit TypI und TypII IFN

Die Behandlung von Zellen mit IFN γ und IFN β führt in beiden Fällen zur Phosphorylierung von STAT1 an Tyrosin 701. Diese Phosphorylierung zeigt die Aktivierung des jeweiligen Signalwegs an und diente als Nachweis für die Sensitivität gegenüber dem jeweiligen IFN. Die Zellen wurden mit jeweils 300 U/ml IFN γ und IFN β für 30 min und 24 h behandelt. Als Negativkontrolle wurde stets ein Teil der Zellen nicht mit IFN behandelt. Zur Überprüfung der Sensitivität der getesteten Linien wurden Zellextrakte gewonnen und diese mittels Western-Blot-Methode auf die Phosphorylierung von STAT1 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen phosphoryliertes Tyrosin 701 hin analysiert.

In allen getesteten EBV-negativen Zelllinien konnte die Phosphorylierung von STAT1 an Tyrosin 701 sowohl nach Stimulation mit IFN γ als auch mit IFN β beobachtet werden. Dabei ist anzumerken, dass das Signal für die Phosphorylierung nach Gabe von TypI IFN stärker war als bei TypII IFN. Des Weiteren war zu beobachten, dass die Signalstärke nach 24-stündiger Inkubation stark nachgelassen hatte, wohingegen nach 30 min ein gutes Signal zu sehen war.

Wie die EBV-negativen Zelllinien zeigten auch alle getesteten EBV-positiven Latenz III-Linien sowie alle stimulierten LCL eine Antwort auf TypI und TypII IFN.

Die Mehrheit der EBV-positiven Latenz I BL-Zellen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, zeigte eine deutliche Antwort auf IFN β , jedoch waren sie gegenüber IFN γ resistent. Einzige Ausnahme stellte die Zelllinie CHEP-BL dar, die trotz eines stabilen Latenz I-Phänotyps eine Phosphorylierung von STAT1 an Tyrosin 701 nach IFN γ -Behandlung zeigte.

In Abbildung 4 ist beispielhaft das Ergebnis einer Latenz I-Linie, einer Latenz III-Linie sowie einer EBV-negativen Linie gezeigt.

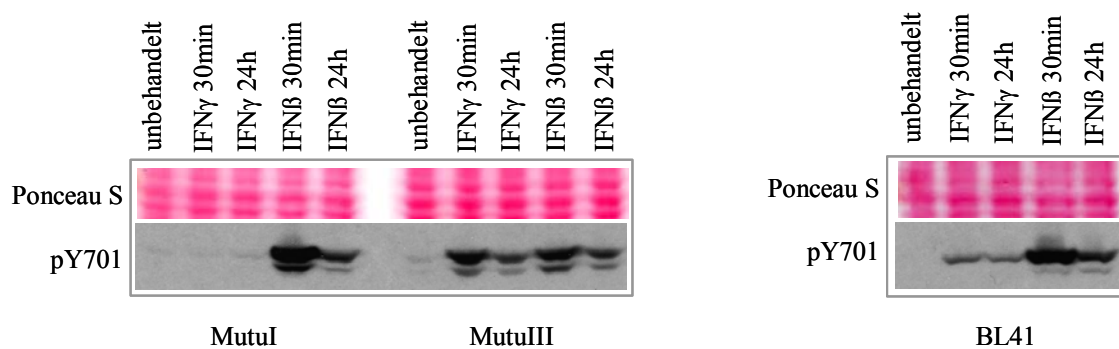


Abbildung 4: IFN-Stimulation verschiedener BL-Linien

In der Regel wurden 3×10^5 Zellen ausplattiert und jeweils mit 300 U/ml IFN γ bzw. IFN β für die angegebenen Zeitpunkte inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde nicht behandelt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen geerntet und Lysate hergestellt. Anschließend wurde mittels der Western-Blot-Methode die Phosphorylierung von STAT1 an Tyrosin 701 mit einem spezifischen Antikörper analysiert.

Ponceau S (Ladekontrolle), pY701 (phosphoryliertes Tyrosin 701 von STAT1)

MutuI (Latenz I BL-Linie), MutuIII (Latenz III BL-Linie), BL41 (EBV-negative BL-Linie).

2.1.2 Untersuchungen zur möglichen Beteiligung von EBV zur Resistenz gegenüber IFN γ

Aufgrund der beobachteten Unterschiede in EBV-negativen und EBV-positiven BL hinsichtlich der Sensitivität gegenüber IFN γ sollte ermittelt werden, ob ein virales Genprodukt an der Resistenz in EBV-positiven Latenz I-Linien beteiligt ist. Hierzu wurden sogenannte EBV-Verlust-Mutanten analysiert, die ursprünglich einen Latenz I-Phänotyp zeigten, das EBV-Genom jedoch nach langer Kultivierung verloren haben und diesen EBV-negativen Phänotyp beibehalten haben (Kitagawa et al., 2000; Nanbo et al., 2002; Shimizu et al., 1994). Die EBV-positiven Ursprungszellen waren gegen IFN γ resistent. Insgesamt standen drei solcher Zelllinien zur Verfügung, die ebenfalls mit jeweils 300 U/ml TypI und TypII IFN für 30 min und 24 h stimuliert und auf die Phosphorylierung von STAT1 an Tyrosin 701 hin untersucht wurden. Ebenso wie ihre Ursprungszellen zeigten diese EBV-Verlust-Mutanten keine Reaktion auf die Behandlung mit IFN γ . Auch eine Reinfektion dieser Verlust-Mutanten mit rekombinantem EBV erbrachte keine Unterschiede zu den Ursprungszellen (Abbildung 5A). Neben diesen Mutanten standen noch andere Zelllinien zur

Verfügung, die ursprünglich EBV-negativ waren und durch die Infektion mit rekombinantem Virus EBV-positiv geworden waren (Calender et al., 1987); diese Linien werden als Konvertanten bezeichnet. Diese Mutanten waren, ebenso wie ihre EBV-negativen Ursprungszellen gegenüber IFN γ sensitiv (Abbildung 5B).

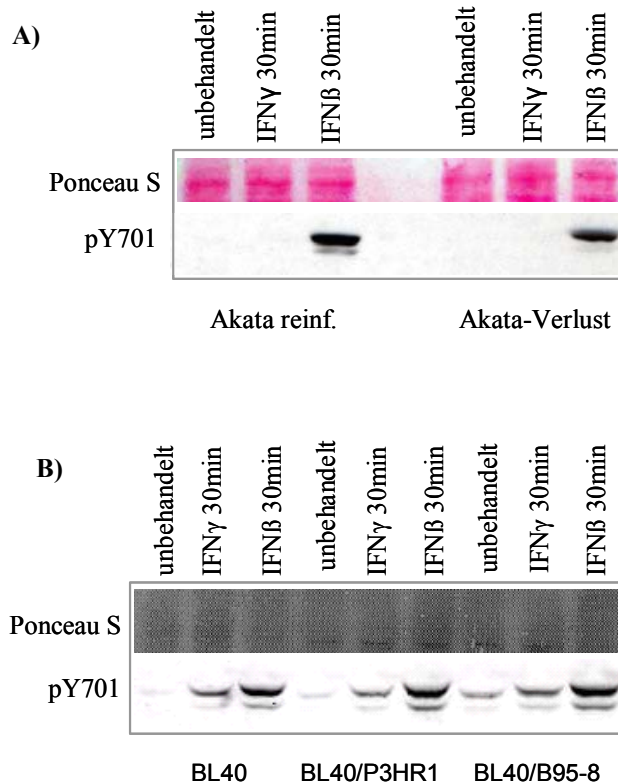


Abbildung 5: IFN-Stimulation von EBV-Verlust-Mutanten (A) und Konvertanten (B)

Die Behandlung wurde wie in Abbildung 4 beschrieben durchgeführt. Der Nachweis der Phosphorylierung von STAT1 an Tyrosin 701 erfolgte ebenfalls mittels spezifischer Antikörper im Western-Blot.

Ponceau S (Ladekontrolle), pY701 (phosphoryliertes Tyrosin 701 von STAT1)

Akata-Verlust (Verlust-Mutante der Zelllinie Akata, ursprünglich eine Latenz I-Linie), Akata reinf. (Reinfektionsmutante von Akata), BL40 (EBV-negative BL), BL40/P3HR1 (Konvertante von BL40, infiziert mit dem rekombinanten EBV P3HR1), BL40/B95-8 (Konvertante von BL40, infiziert mit dem rekombinanten EBV B95-8).

2.2 Analyse der Signalkomponenten des IFN γ -Signalwegs

Um die mögliche Ursache für den Verlust der Reaktivität gegenüber IFN γ in EBV-positiven BL-Zellen zu ermitteln, wurde die Expression aller Komponenten des IFN γ -Signalwegs oberhalb von STAT1 und von STAT1 selber überprüft; die Untersuchung erfolgte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene. Mittels quantitativer Real Time-PCR (qRT-PCR) konnte die Expression auf RNA-Ebene ermittelt werden. Hierzu wurden die antwortenden Linien und die IFN γ -resistenten Linien jeweils in einer Gruppe zusammengefasst. Zur Analyse der Expression auf Proteinebene wurde entweder die Western-Blot-Methode herangezogen oder die Expression anhand von FACS-Analysen ermittelt.

2.2.1 Untersuchung möglicher Defekte in STAT1

Alle getesteten Zelllinien, unabhängig ihrer Sensitivität gegenüber IFN γ , zeigten eine Phosphorylierung von STAT1 an Tyrosin 701 nach Stimulation mit IFN β . Dies zeigt, dass keine Mutation des Tyrosin 701 vorliegt, welche die Resistenz gegenüber IFN γ erklären könnte (Abbildung 4 und 5). Des Weiteren konnte eine fehlende Expression von STAT1-Molekülen ausgeschlossen werden, da STAT1 in allen getesteten Zelllinien nachgewiesen werden konnte (Abbildung 6). Bei einigen Linien konnte nach 24-stündiger IFN-Stimulation eine Hochregulation der STAT1-Expression beobachtet werden (Abbildung 6, BL41). Da in allen getesteten Zelllinien eine deutliche Expression von STAT1 und eine Phosphorylierung nach IFN β -Stimulation nachgewiesen werden konnte, ist ein Defekt in dieser Signalkomponente unwahrscheinlich.

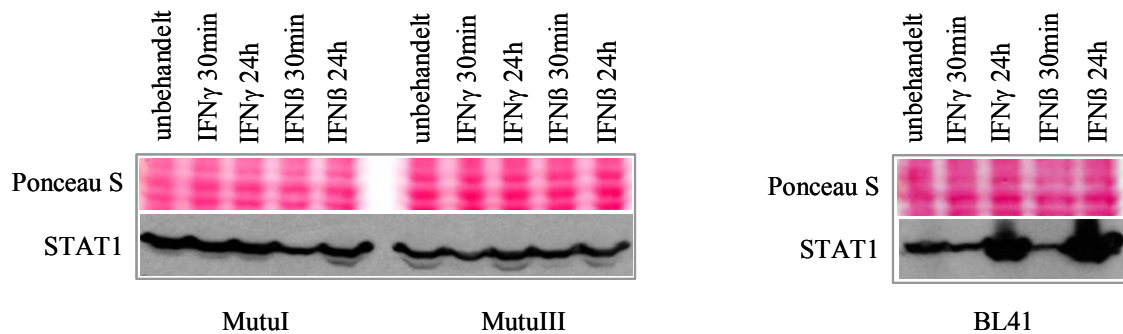


Abbildung 6: Expression von STAT1 in verschiedenen BL-Linien

Die Zellen wurden wie im vorigen Abschnitt beschrieben behandelt und geerntet, anschließend wurden Lysate hergestellt. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen STAT1 konnte die Expression des Proteins in den getesteten Zelllinien nachgewiesen werden.

Ponceau S (Ladekontrolle), STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1)

MutuI (Latenz I BL-Linie), MutuIII (LatenzIII BL-Linie), BL41 (EBV-negative BL-Linie).

2.2.2 Testen der Expression der IFN γ -Rezeptorketten

Die Analyse der Expression beider Ketten des IFN γ -Rezeptors mittels quantitativer RT-PCR zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen IFN γ -resistenten und suszeptiblen Zellen (Abbildung 7A). Die Untersuchung der Expression der Rezeptorketten auf der Zelloberfläche erfolgte mittels FACS-Analysen. Für die α -Kette des IFN γ -Rezeptors konnte kein Unterschied in der Expression von sensitiven und resistenten Zellen beobachtet werden (Abbildung 7B). Die Expression der β -Kette konnte aufgrund fehlender spezifischer Antikörper weder durch FACS-Analysen noch durch Western-Blots nachgewiesen werden. Jedoch ist bekannt, dass die α -Kette nur dann an der Oberfläche exprimiert wird, wenn eine funktionierende β -Kette anwesend ist (Farrar & Schreiber, 1993). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die β -Kette ebenso exprimiert und funktionell ist.

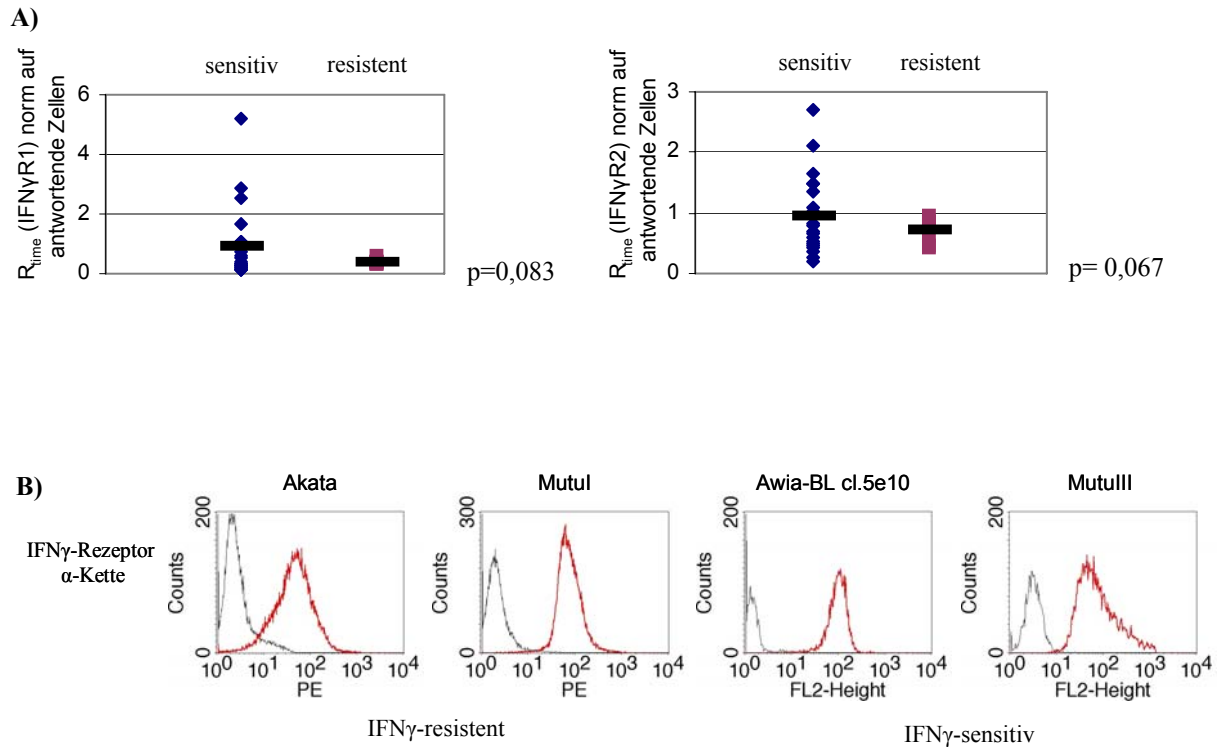


Abbildung 7: Die Expression des IFN γ -Rezeptors

Die Expression wurde auf RNA- (qRT-PCR) und Protein-Ebene untersucht.

A) Die mRNA-Mengen beider Rezeptorketten wurden auf die mRNA von CD19 standardisiert und auf den Mittelwert der antwortenden Zellen normalisiert. Beide Rezeptorketten sind gering reduziert in resistenten Linien exprimiert.

B) Die Expression der α -Kette auf der Zelloberfläche wurde mit Hilfe von FACS-Analysen bestimmt. Die Expression unterscheidet sich nicht in resistenten und antwortenden Linien.

Akata und MutuI (resistent, Latenz I-BL), MutuIII (sensitiv, Latenz III-BL), Awia-BL cl.5e10 (sensitiv, EBV-negative BL).

2.2.3 Untersuchung möglicher Defekte der Tyrosin-Kinasen JAK1 und JAK2

Durch die Beteiligung von JAK1 sowohl am TypI- als auch am TypII-Signalweg und die erfolgreiche Phosphorylierung von STAT1 in allen Linien nach IFN β -Gabe konnte ein Defekt in JAK1 als Ursache für die Resistenz gegenüber IFN γ ausgeschlossen werden. So konnte auch demonstriert werden, dass JAK1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in allen Zelllinien exprimiert wird (Abbildung 8).

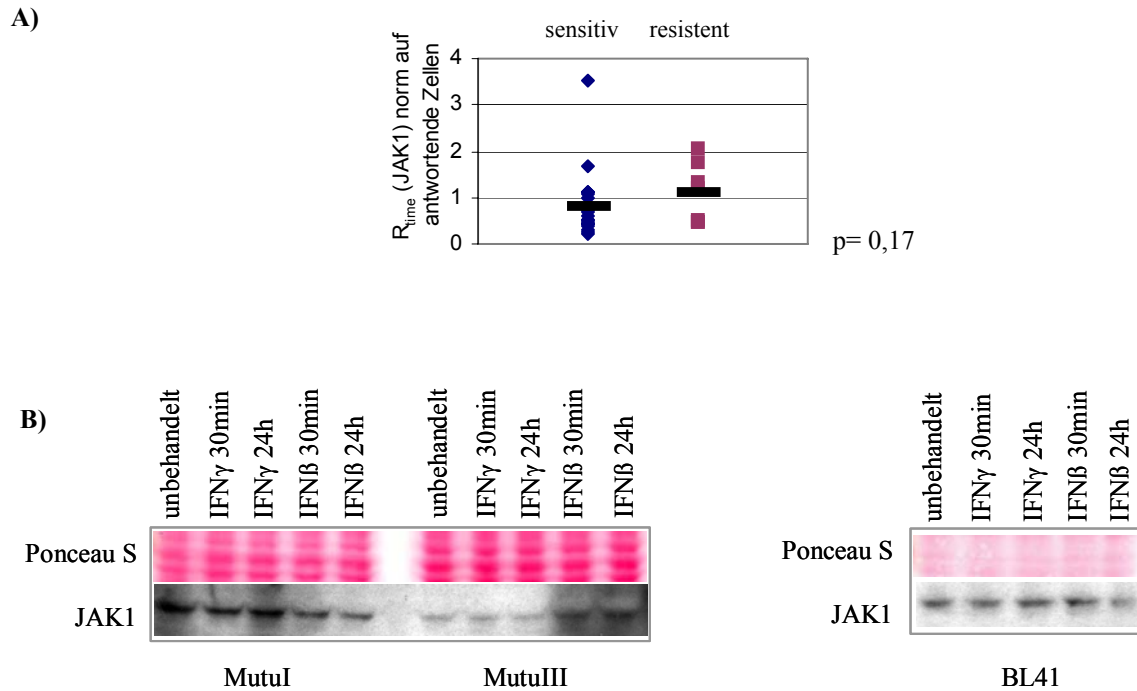


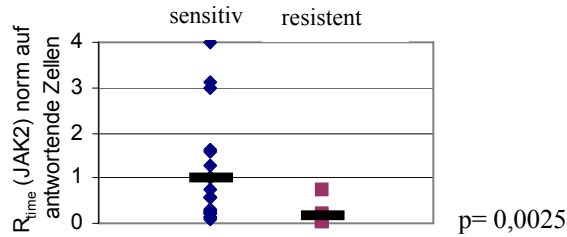
Abbildung 8: Expression der Tyrosin-Kinase JAK1

A) Die mRNA-Menge sowohl von JAK1 wurde auf die mRNA von CD19 standardisiert und jeweils der Mittelwert der antwortenden Zellen und resistenten Zelllinien gebildet. JAK1 ist in IFN γ -resistenten Linien leicht erhöht exprimiert.

B) Alle getesteten Zelllinien wurden auf die Expression der Tyrosin-Kinase JAK1 auf Proteinebene mit Hilfe der Western-Blot-Methode untersucht. Hierfür wurden die Zellen wie unter 4.3.1 beschrieben aufbereitet. Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE konnte JAK1 durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. JAK1 wird in allen Linien -unabhängig von einer Resistenz gegenüber IFN γ - exprimiert. Ponceau-S (Ladekontrolle), JAK1 (Januskinase 1), MutuI (Latenz I BL-Linie), MutuIII (Latenz III BL-Linie), BL41 (EBV-negative BL-Linie).

Die Untersuchung von JAK2 zeigte hingegen ein signifikant reduziertes mRNA-Expressionsniveau sowie eine fehlende Expression auf Proteinebene in der Mehrheit der IFN γ -resistenten Linien (Abbildung 9). Lediglich in vier (BL29, Rael, WAN, WW2) von zehn getesteten resistenten Linien konnte die Expression von JAK2 gezeigt werden und nur BL29 zeigte eine Expression in einer vergleichbaren Höhe zu antwortenden Zellen. Die anderen drei Linien zeigten eine kaum nachweisbare Expression. In Abbildung 9 sind zur Demonstration der Expression von JAK2 in IFN γ -sensitiven Zelllinien die EBV-positiven, Latenz III-Linien Jijoye und BL89, sowie eine LCL (EBV 1.25) und eine EBV-negative Linie (BL49) abgebildet.

A)



B)

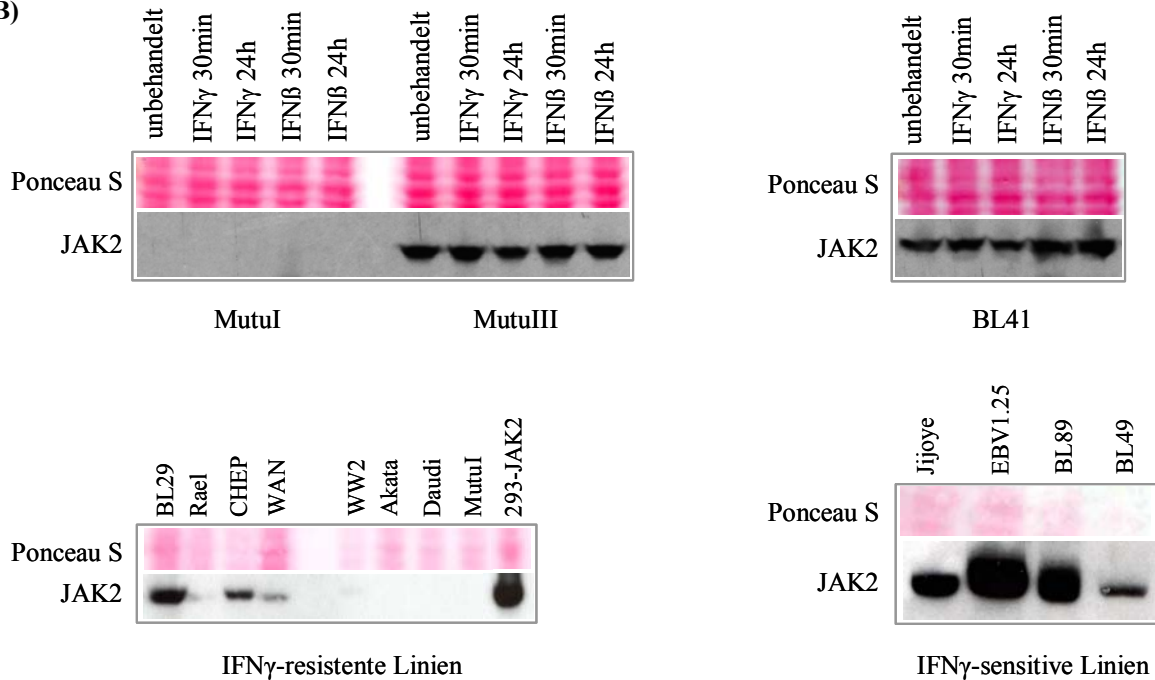


Abbildung 9: Expression der Tyrosin-Kinase JAK2 auf mRNA- und Proteinebene

A) Die Expression von JAK2 auf mRNA-Ebene wurde wie im vorigen Abschnitt beschrieben untersucht. Die Tyrosin-Kinase zeigt eine deutliche Reduktion in resistenten Linien.

B) Die Untersuchung der Expression von JAK2 auf Proteinebene erfolgte ebenfalls in allen in dieser Arbeit analysierten Zelllinien wie in der vorherigen Abbildung bereits beschrieben. Die Tyrosin-Kinase JAK2 wird in allen antwortenden Zellen exprimiert, jedoch konnte sie nur in vier der zehn getesteten IFN γ -resistenten Linien nachgewiesen werden. Nur BL29 zeigte eine vergleichbare Expression zu antwortenden Linien.

Ponceau-S (Ladekontrolle), JAK1 (Januskinase 1), JAK2 (Januskinase 2), MutuI, BL29, Rael, CHEP, WAN, WW2, Akata, Daudi (Latenz I BL-Linie), MutuIII, BL89, Jijoye (Latenz III BL-Linie), BL41, BL49 (EBV-negative BL-Linie), EBV 1.25 (LCL), 293-JAK2 (Positivkontrolle für JAK2).

2.3 Wiederherstellung der Signalweiterleitung in IFN γ -resistenten Zelllinien

2.3.1 Transiente Transfektion mit JAK2

Um zu untersuchen, ob die fehlende oder mangelhafte Expression von JAK2 für die Resistenz in EBV-positiven Latenz I-Zelllinien verantwortlich ist, wurden die Zellen mit dem retroviralen JAK2-Expressionsplasmid MIGR-1 transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit

dem pINCO-Plasmid kotransfiziert, welches zur Expression eines verkürzten NGFR (Nerve Growth Factor Receptor, Δ NGFR) führt. Dies ermöglichte es, die JAK2-exprimierenden Zellen mittels MACS (Magnetic Associated Cell Sorting) aufzureinigen. Die Verkürzung des NGFR am intrazellulären Teil verhindert eine Signalweiterleitung im Falle einer Interaktion des Rezeptors mit einem Liganden oder agonistischen Antikörper. Als Negativkontrolle diente die Transfektion von pINCO allein.

Die Transfektion erfolgte in drei JAK2-negative Linien (Akata, MutuI und Elijah), sowie in die vier IFN γ -resistenten, JAK2-exprimierenden Linien (WAN, WW2, Rael und BL29). Die Transfektionseffizienz von WAN, WW2 und BL29 stellte sich als sehr niedrig heraus, so dass für diese Linien keine Ergebnisse erzielt werden konnten. Die restlichen Linien zeigten jedoch eine deutliche Expression von JAK2 nach Transfektion und Aufreinigung der transfizierten Zellen (Abbildung 10).

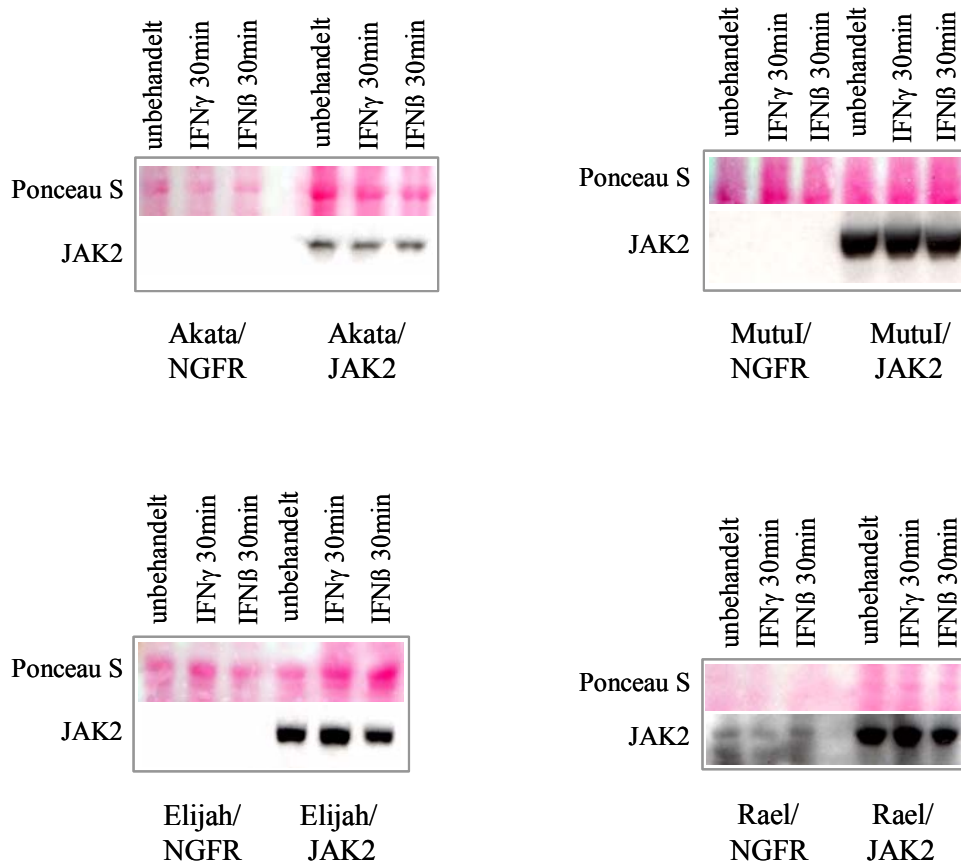


Abbildung 10: JAK2-Expression nach transienter Transfektion

Die Zellen wurden wie in Kapitel 4.4.5 beschrieben transient mit dem retroviralen JAK2-Expressionsplasmid MIGR-1-JAK2 transfiziert. Zur anschließenden Aufreinigung mittels MACS wurden die Zellen mit Δ NGFR kotransfiziert. Nach erfolgter Transfektion und Aufreinigung wurden die Zellen mittels Western-Blot auf die Expression von JAK2 untersucht.

Ponceau-S (Ladekontrolle), NGFR (alleinige Transfektion mit pINCO-NGFR, Negativkontrolle, Nerve Growth Factor Receptor), JAK2 (Januskinase 2)

Akata-, MutuI-, Elijah-, Rael-JAK2 (transfizierte Zellen der ursprünglich JAK2-negativen Linien).

2.3.2 Stimulation der JAK2-exprimierenden Zellen

Die über MACS aufgereinigten Zellen wurden mit 300 U/ml IFN γ und IFN β stimuliert. Allerdings erfolgte aufgrund der geringen Anzahl der Zellen nach der Aufreinigung nur eine Stimulation für 30 min. Als Negativkontrolle blieb auch hier ein Teil der Zellen unstimuliert. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, konnte für Akata, MutuI, Elijah und Rael nach Transfektion von JAK2 und Stimulation mit IFN γ eine Aktivierung des Signalwegs beobachtet werden. Dies zeigt, dass die fehlende Expression von JAK2 für die IFN γ -Resistenz verantwortlich ist. Rael gehört zu den resistenten Zelllinien, die eine geringe Menge an JAK2 exprimieren und dennoch nicht auf IFN γ antworten. Die Expression von exogenem JAK2 ermöglichte jedoch die Signalweiterleitung nach IFN γ -Stimulation.

Da nach der Aufreinigung der Zellen mittels MACS eine sehr geringe Anzahl an Zellen für die IFN-Behandlung zur Verfügung stand, sollen Einzelzellklone etabliert werden. Damit soll sichergestellt werden, dass eine ausreichende Zellzahl für Experimente zur Verfügung steht. Hierfür wurde das *jak2*-Gen bereits in das Expressionsplasmid p141CAG-3SIP eingebracht.

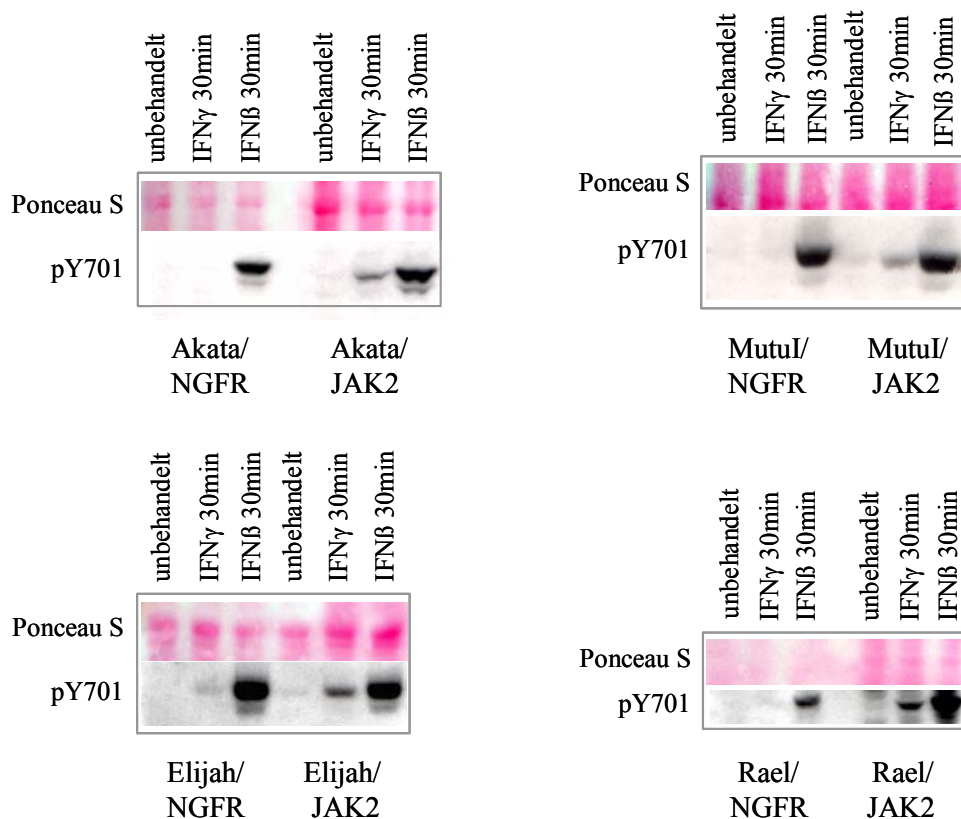


Abbildung 11: STAT1-Phosphorylierung an Tyrosin 701 nach Transfektion mit JAK2

Jeweils 2×10^7 Zellen wurden mit JAK2 und Δ NGFR transient transfiziert. Die Aufreinigung der JAK2-positiven Zellen erfolgte mittels MACS, anschließend wurden die aufgereinigten Zellen mit 300 U/ml IFN γ bzw. IFN β für 30 min stimuliert. Die Transfektion mit NGFR diente als Negativkontrolle. Nach Transfektion von JAK2 und Stimulation mit IFN γ war eine Phosphorylierung von STAT1 an Tyrosin 701 und somit die Aktivierung des IFN γ -Signalwegs nachweisbar.

Ponceau-S (Ladekontrolle), NGFR (Nerve Growth Factor Receptor), pY701 (phosphoryliertes Tyrosin 701 von STAT1), JAK2 (Januskinase 2), Akata-, MutuI-, Elijah-, Rael-JAK2 (JAK2-transfizierte Linien).

2.4 Unterscheidung zwischen einem genetischen und epigenetischen Mechanismus

Die fehlende Expression von JAK2 kann grundsätzlich durch zwei Mechanismen hervorgerufen werden. Sie kann entweder auf genetische Ursachen zurückzuführen sein (z.B. Mutationen) oder einen epigenetischen Ursprung haben (z.B. Methylierung der Promotorregion). Um zu testen, ob es sich um eine genetische oder epigenetische Veränderung handelt, wurden Latenz I-Zelllinien und BL-Linien mit einem Latenz III-Phänotyp auf ihre Antwort gegenüber IFN γ verglichen. Da man davon ausgehen kann, dass Zelllinien mit einem Latenz III-Phänotyp ursprünglich aus Latenz I-Zellen entstanden sind, kann durch eine IFN γ -Suszeptibilität von Latenz III-Zellen eine genetische Inaktivierung des JAK2-Gens als Ursache für die IFN γ -Resistenz ausgeschlossen werden.

Tabelle 2: Zusammenfassung aller getesteter Zelllinien

Zelllinie	EBV-Status	Latenz	Translokation	Anzahl	IFN γ -Antwort
BL	-		t(8;14)	8	pos.
	-		t(8;22)	4	pos.
BL	Konvertant	?	t(8;14)	4	pos.
BL	+	III	t(8;14)	12	pos.
	+	III	t(8;22)	10	pos.
	+	III	t(8;2)	4	pos.
BL	+	I	t(8;14)	10	9 neg., 1 pos.
BL	EBV-Verlust	I \rightarrow -	t(8;14)	3	neg.
BL	EBV-reinfiziert	I \rightarrow - \rightarrow I	t(8;14)	2	neg.
LCL	+	III		10	pos.

Die Ergebnisse, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind, unterstreichen die Annahme, dass keine genetische Veränderung vorliegt, die für die IFN γ -Resistenz in EBV-positiven Latenz I-Linien verantwortlich ist, da alle getesteten Latenz III-Zelllinien gegenüber IFN γ suszeptibel waren.

Um zu verifizieren, dass Latenz III-Zellen (IFN γ -responsiv) tatsächlich aus Latenz I-Linien (IFN γ -resistent) hervorgegangen sind, stand eine Zelllinie (Mutu) zur Verfügung, die sowohl in der Latenz III, als auch Latenz I vorlag. Für die Untersuchung wurde eine DNA-Analyse zur Überprüfung der VDJ-Rekombination durchgeführt, die Aufschluss über Verwandtschaftsverhältnisse dieser BL-Zellen liefern sollte. B-Zellen entwickeln während der Differenzierung durch somatische Rekombination ihrer Immunglobulin-Ketten einen

individuellen B-Zell-Rezeptor aus (BCR). Diese Individualität kann genutzt werden, um anhand der Diversität der Zusammensetzung der verschiedenen Gensegmente der Immunglobulin-Ketten und der Basensequenz der Verbindungsstellen die Verwandtschaft von B-Zellen zu überprüfen. Da Latenz III-Linien in Kultur aus Latenz I-Linien hervorgehen, können aufgrund der VDJ-Rekombination Rückschlüsse auf die Ursprungszelle der Linien gezogen werden. Zellen gleichen Ursprungs besitzen dieselbe VDJ-Rekombination.

Die Untersuchung der VDJ-Rekombination erfolgte mittels PCR, über die die verschiedenen Gensegmente amplifiziert wurden. Die PCR-Produkte wurden sequenziert und anschließend mit dem Programm Chromas analysiert. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Blast-Programms auf Gemeinsamkeiten untersucht. Die Analyse der Daten zeigte, dass MutuI und MutuIII von derselben Ursprungszelle abstammen. Aufgrund der Tatsache, dass MutuIII aus einer MutuI-Linie hervorgegangen ist und MutuIII IFN γ -sensitiv ist, ist eine genetische Ursache für die fehlende JAK2-Expression zumindest in dieser Zelllinie unwahrscheinlich.

2.4.1 Untersuchungen zur Methylierung des JAK2-Promotors

Durch die Untersuchung der VDJ-Rekombination in den Zelllinien MutuI und MutuIII erscheint zumindest für diese Zelllinie ein genetischer Mechanismus für die fehlende JAK2-Expression unwahrscheinlich. Da alle hier untersuchten Latenz III-Linien auf IFN γ antworteten ist eine epigenetische Veränderung (z.B. Methylierung des JAK2-Promotors) in den restlichen getesteten Latenz I-Linien als Ursache für die fehlende oder stark reduzierte Expression von JAK2 sehr wahrscheinlich.

Die mögliche Methylierung des Promotors wurde durch den Einsatz von 5'-Azacytidin untersucht. Diese Substanz ist ein Cytidin-Analogon und führt durch die Blockierung von DNA-Methyltransferasen zur Demethylierung von DNA-Abschnitten. Zwei resistente Zelllinien (Akata und MutuI) wurden für insgesamt sieben Tage mit 10 μ M 5'-Azacytidin (AZA) behandelt. Zu jedem Zeitpunkt (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 168 h) wurden Zellen geerntet und für die Western-Blot-Methode vorbereitet. Zuerst wurde die Expression von EBNA2 untersucht, da dieses Protein in Latenz I-Linien aufgrund von Methylierung nicht exprimiert wird (Masucci et al., 1989). Nach 72-stündiger AZA-Behandlung war in der Zelllinie Akata eine deutliche Expression von EBNA2 nachweisbar, jedoch kann keine Expression von JAK2 und somit auch keine Phosphorylierung von STAT1 beobachtet werden. Ein ähnliches Bild zeigte MutuI; hier war ebenfalls nach 72 h ein deutliches Signal für die Expression von EBNA2 zu sehen, jedoch weder eine Expression von JAK2, noch eine Phosphorylierung des Tyrosin 701 von STAT1 (Abbildung 12).

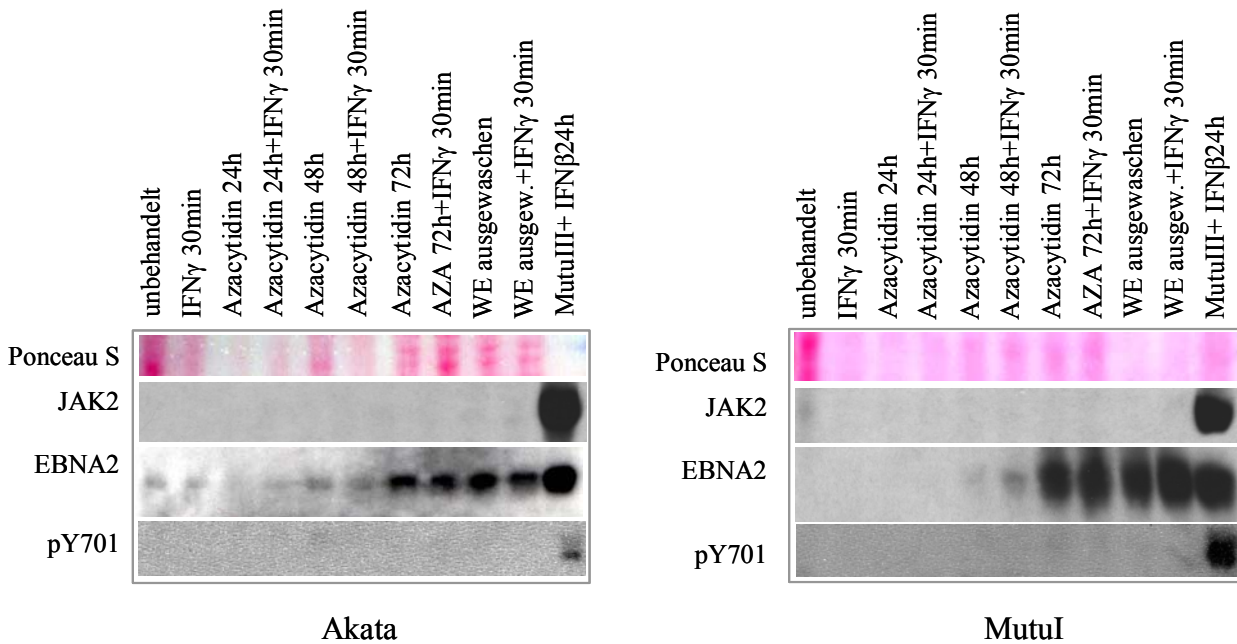


Abbildung 12: Untersuchung zur Methylierung des JAK2-Promotors

Je 3×10^5 Zellen der Latenz I-Linien MutuI und Akata wurden ausplattiert und für die angezeigten Zeitpunkte mit $10 \mu\text{M}$ 5'-Azacytidin und gegebenenfalls auch mit $\text{IFN}\gamma$ behandelt. Nach 72 h Inkubation wurde Azacytidin aus dem Medium gewaschen und die Zellen für zwei Tage in Zellkulturmedium weiterkultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Lysate der Zellen gewonnen und diese für den Western-Blot vorbereitet. Die Expression von EBNA2, JAK2 und die Phosphorylierung von STAT1 an Tyrosin 701 wurde mittels spezifischer Antikörper gegen das jeweilige Protein nachgewiesen. Nach 72 h war eine deutliche Expression von EBNA2 zu beobachten. Dies ging jedoch nicht mit der Expression von JAK2 und somit auch nicht mit der Phosphorylierung von STAT1 einher.

Ponceau-S (Ladekontrolle), pY701 (phosphoryliertes Tyrosin 701 von STAT1), JAK2 (Januskinase 2), EBNA2 (EBV-nuclear antigen 2),

Akata, MutuI (Latenz I BL-Linie), MutuIII (Latenz III BL-Linie, Positivkontrolle für die Expression von EBNA2 und JAK2).

2.5 Proliferationstest nach IFN-Behandlung

Neben der Untersuchung der $\text{IFN}\gamma$ -Resistenz sollte die Wirkung von TypI und TypII IFN auf die Proliferation EBV-positiver und EBV-negativer BL analysiert werden. Dies erfolgte mittels Zellzählung und mit Hilfe des MTT-Assays.

2.5.1 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zugabe von IFN, insgesamt wurde ein Zeitraum von sieben Tagen untersucht. Durch die Anfärbung toter Zellen mit Trypanblau konnten die lebenden Zellen von den toten unterschieden werden. Es wurden zwei EBV-positiv Latenz I-Zellen, sowie zwei EBV-negativ und zwei Latenz III-Linien analysiert. Wie in den Graphiken zu sehen ist, hatte die Behandlung mit TypI-IFNs in der Zelllinie BL31 einen negativen Einfluss auf das Wachstum (Abbildung 13). Durch die

Stimulation mit TypII IFN konnte bei keiner Linie ein Effekt auf die Proliferation festgestellt werden.

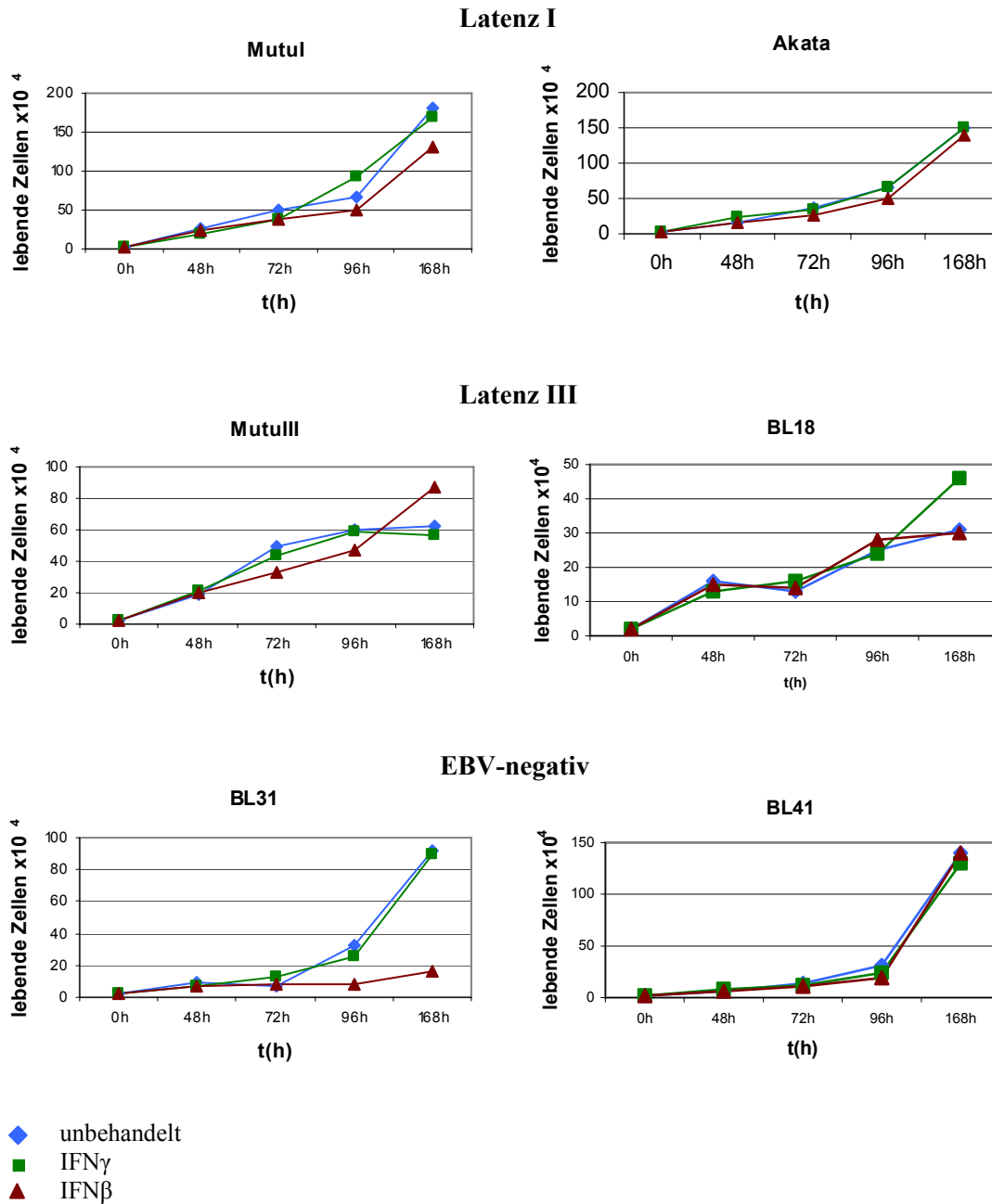


Abbildung 13: Proliferation IFN-behandelter Zellen

Jeweils zwei EBV-positive Latenz I (Akata, Mutul), EBV-positive Latenz III (MutuIII, BL18) und EBV-negative (BL41, BL31) BL-Linien wurden in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ ausgesät. Die Zellen wurden jeweils mit 300 U/ml IFN γ , mit 300 U/ml IFN β behandelt oder blieben zur Kontrolle ohne IFN. Zu den angezeigten Zeitpunkten wurden die toten Zellen mit Trypanblau angefärbt und die lebenden gezählt.

2.5.2 MTT-Assay

Zusätzlich zur Zellzählung wurde ein MTT-Assay durchgeführt, mit dem ebenfalls die Proliferation der Zellen gemessen wurde. Der Nachweis der Proliferation beruht auf der Reduktion des gelben Farbstoffs MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazoliumbromid) in ein blau-violettes Formazan. Diese Reduktion erfolgt hauptsächlich durch die Umsetzung von NADH und NADPH. Die Messung erfolgte zu denselben Zeitpunkten, an denen auch die Zellzählung durchgeführt wurde. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis des Experiments. Auch hier ist zu sehen, dass IFN β einen negativen Einfluss auf die Proliferation von BL31-Zellen hatte, die übrigen Zelllinien jedoch nicht in ihrem Wachstum beeinträchtigte. IFN γ hingegen zeigte auch hier keinen Effekt.

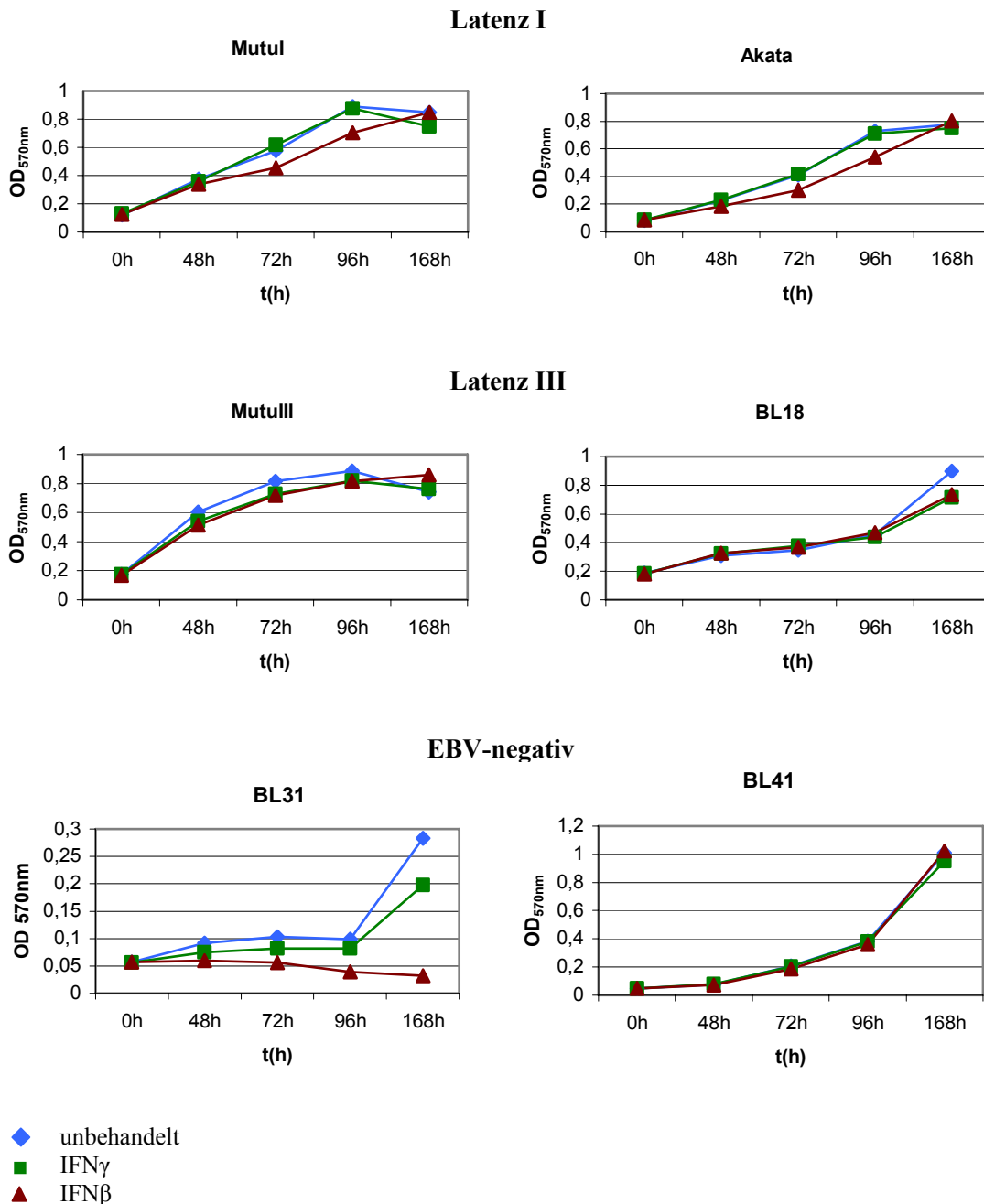


Abbildung 14: MTT-Messung

Bei diesem Experiment wurden dieselben Zelllinien eingesetzt wie im vorigen Abschnitt. Die Zellen wurden jeweils mit 300 U/ml IFN γ bzw. IFN β behandelt oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen. Zu den angezeigten Zeitpunkten wurden die Zellen mit dem Farbstoff MTT für vier Stunden inkubiert. Anschließend wurde die OD bei 570 nm gemessen. Ein Farbumschlag von gelb nach violett-blau zeigt die Proliferation der Zellen an.

2.6 Analyse von BL-Biopsien

Alle bisher vorliegenden Ergebnisse beruhen auf Experimenten mit Zelllinien in Kultur, was die Situation *in vitro* widerspiegelt. Um eine bessere Aussage über die *in vivo*-Situation machen zu können, wurden Zellen von sieben EBV-positiven Burkitt Lymphom-Biopsien mit TypI und TypII IFN behandelt und auf die Aktivierung ihrer Signalwege und die Expression von JAK2 hin untersucht.

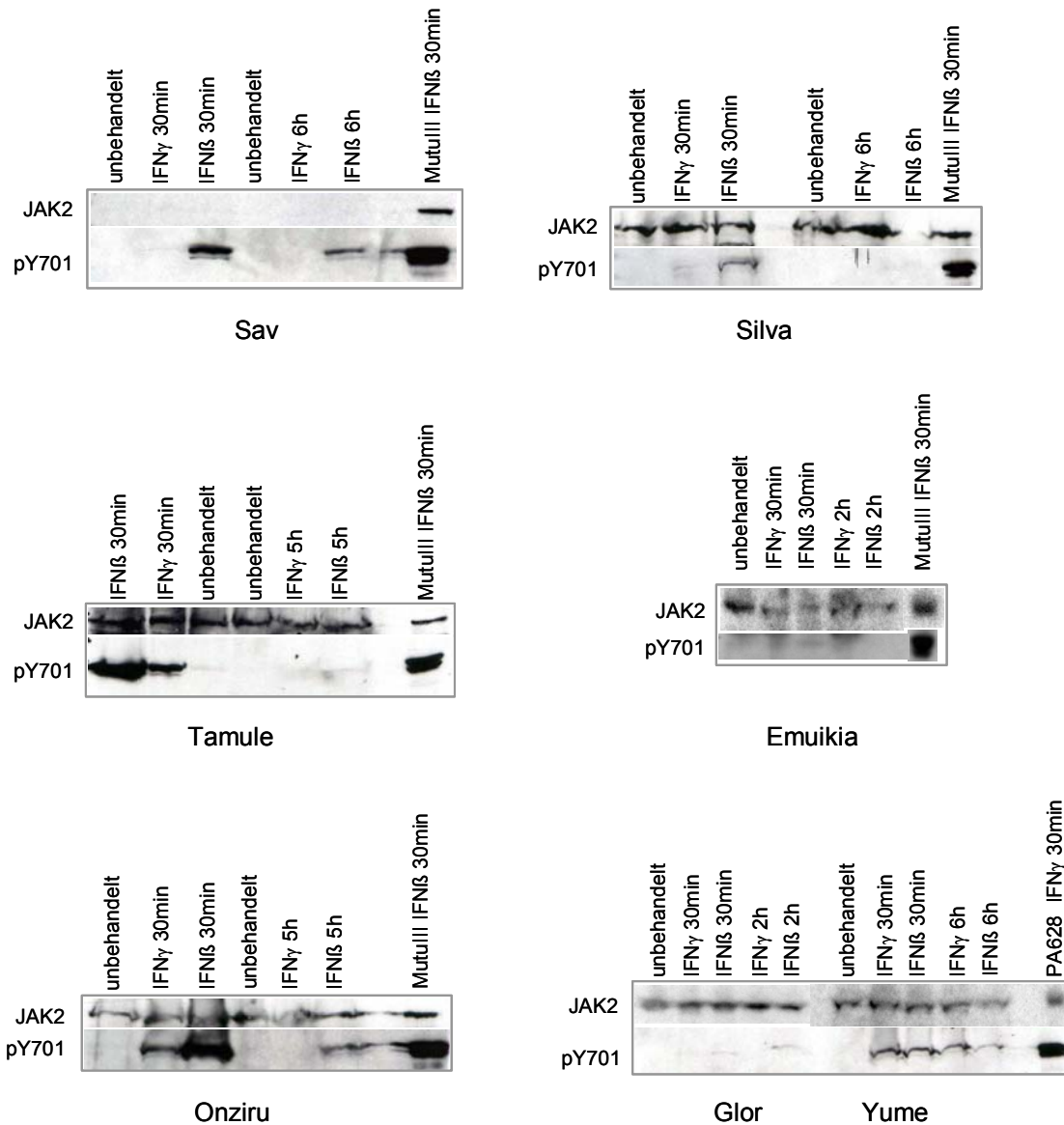


Abbildung 15: IFN-Stimulation von EBV-positiven Biopsien

4×10^6 Biopsiesuspensionszellen wurden mit IFN γ und IFN β für 30 min und 2-6 h behandelt bzw. als Negativkontrolle unbehandelt gelassen. Insgesamt wurden sieben EBV-positive Biopsien des BL auf ihre Sensitivität gegenüber IFN γ hin untersucht. Zwei (Sav und Silva) zeigten eine IFN γ -Resistenz, drei waren responsiv (Yume, Onziru, Tamule) und zwei Biopsien brachten keine auswertbaren Ergebnisse (Emuikia, Glor). JAK2 (Januskinase 2), pY701 (phosphoryliertes Tyrosin 701 von STAT1) MutuIII, PA628 (beide EBV-positive Latenz III-Linien, Positivkontrolle).

Die Zellen aus Biopsien wurden wie die Zelllinien in Kultur mit IFN γ und IFN β behandelt. Aufgrund der schnellen und hohen Sterberate von frisch aufgetautem Biopsie-Material wurde die Inkubationszeit mit IFN auf 30 min und 2-6 h reduziert. Anschließend wurden die Proben für den Western-Blot aufbereitet. Die Analyse der Phosphorylierung von STAT1 nach IFN-Behandlung ergab ein uneinheitliches Bild. Drei der getesteten Biopsien zeigten eine Phosphorylierung von STAT1 an Tyrosin 701 nach Stimulation mit IFN γ . Bei zwei Biopsien war aufgrund der geringen Anzahl an lebenden Zellen keine Aussage möglich. Bei zwei der getesteten Biopsien wurde eine IFN γ -Resistenz beobachtet (Abbildung 15).

Neben der Phosphorylierung von STAT1 wurde auch die Expression von JAK2 mit Hilfe der Western-Blot-Methode untersucht. Für sechs der getesteten Biopsien war eine JAK2-Expression zu beobachten (Abbildung 15). Nur eine Biopsie, die auch eine Resistenz gegenüber IFN γ aufwies, exprimierte kein JAK2. Jedoch war das Expressionsniveau von JAK2 in einigen Biopsien geringer als das von antwortenden Linien. Eine geringe JAK2-Expression war auch in einigen IFN γ -resistenten Zelllinien (BL29, WAN, WW2, Rael) beobachtet worden (Abbildung 9).

2.7 Untersuchungen zum möglichen Einfluss der IFN γ -Resistenz auf die Immunevasion EBV-positiver Burkitt Lymphom-Zellen

Es ist bekannt, dass EBV-positive BL-Zellen trotz der Expression von Fremdantigenen nicht vom Immunsystem erkannt werden. Die IFN γ -Resistenz könnte einer der Mechanismen für die Immunevasion dieser Tumorzellen sein, da wichtige Gene für die zellvermittelte Immunantwort (wie z.B. MHC-Moleküle, Komponenten des Immunproteasoms und Peptidtransporters) durch IFN γ -regulatorische Promotorelemente stimuliert werden. Der mögliche Einfluss der IFN γ -Resistenz auf die Immunevasion sollte durch verschiedene Experimente getestet werden.

2.7.1 ⁵¹Cr-Freisetzungsmessung

Mit Hilfe dieser Messung sollte der Einfluss der IFN γ -Resistenz auf die Erkennung und Tötung EBV-infizierter BL durch zytotoxische T-Zellen (CTL) untersucht werden. Als Positivkontrolle wurden EBV-negative BL eingesetzt, die zur Expression viraler Antigene (AG) mit rekombinanten Vakzinia-Viren infiziert wurden. IFN γ ist bekannt dafür, die AG-Präsentation in infizierten Zellen zu stimulieren, was zu einer effektiveren Erkennung und Tötung infizierter Zellen durch CTL führt. Die beobachtete IFN γ -Resistenz könnte eine Rolle bei der Immunevasion EBV-positiver BL spielen, indem sie verhindert, dass solche Zellen durch IFN γ aktiviert werden, das von CTLs ausgeschüttet wird. *In vivo* könnten AG-

spezifische CTLs zur IFN γ -Ausschüttung gebracht werden, wenn virale Antigene, die von apoptotischen BL-Zellen freigesetzt werden, durch Makrophagen oder Dendritische Zellen kreuzpräsentiert werden.

Es wurden zwei mal zwei Zelllinien eingesetzt, die jeweils denselben HLA-Typ exprimieren. MutuI (EBV-positiv, IFN γ -resistent) und BL31 (EBV-negativ, IFN γ -sensitiv) exprimieren HLA-A2, Akata (EBV-positiv, IFN γ -resistent) und BL41 (EBV-negativ, IFN γ -sensitiv) exprimieren HLA-B32. Die Expression desselben HLA-Typs war wichtig, damit jeweils die gleichen CTL-Klone, die spezifisch für einen bestimmten HLA-Typ sind, für die Analyse der EBV-positiven und -negativen Linie eingesetzt werden konnten. Die HLA-identischen Zelllinienpaare wurden jeweils mit Vakzinia-Viren infiziert, die zur Expression unterschiedlicher EBV-AG führen. Als Positivkontrolle für die Funktionalität der CTL-Klone wurden alle eingesetzten Zellen direkt mit Peptiden, die zur Präsentation keine Prozessierung benötigen, beladen. Des Weiteren wurden zwei Negativkontrollen eingesetzt (DMSO und Vakzinia-Leervektor, vaccTK⁻), die zu keiner Erkennung und Tötung führen.

Bevor die Inkubation der Zellen mit ihren spezifischen CTL-Klonen erfolgte, wurden die Zellen mit IFN γ stimuliert (als Negativkontrolle wurde auch hier wieder ein Teil der Zellen unstimuliert gelassen) und mit verschiedenen Vakzinia-Viren infiziert. Zur Messung des CTL-vermittelten Zelltods wurden die Zellen mit radioaktivem Chrom beladen, das durch die Tötung der Zellen freigesetzt wurde. Anhand der Menge an freigesetztem Chrom können Rückschlüsse auf die Immunerkennung und Tötung der Zellen gemacht werden.

Peptid-beladene EBV-positive und EBV-negative BL wurden durch die eingesetzten CTL-Klone gut erkannt und getötet, allerdings konnte kein Unterschied zwischen IFN γ -Behandlung und unbehandelten Zellen beobachtet werden. Nach Infektion mit Vakzinia-Viren konnte weder bei den eingesetzten EBV-negativen, noch bei den EBV-positiven BL-Linien eine CTL-vermittelte Tötung beobachtet werden. Auch hier ergab sich kein Unterschied beim Vergleich IFN γ -behandelter und unbehandelter Zellen (Abbildung 16 und 17).

Ergebnisse

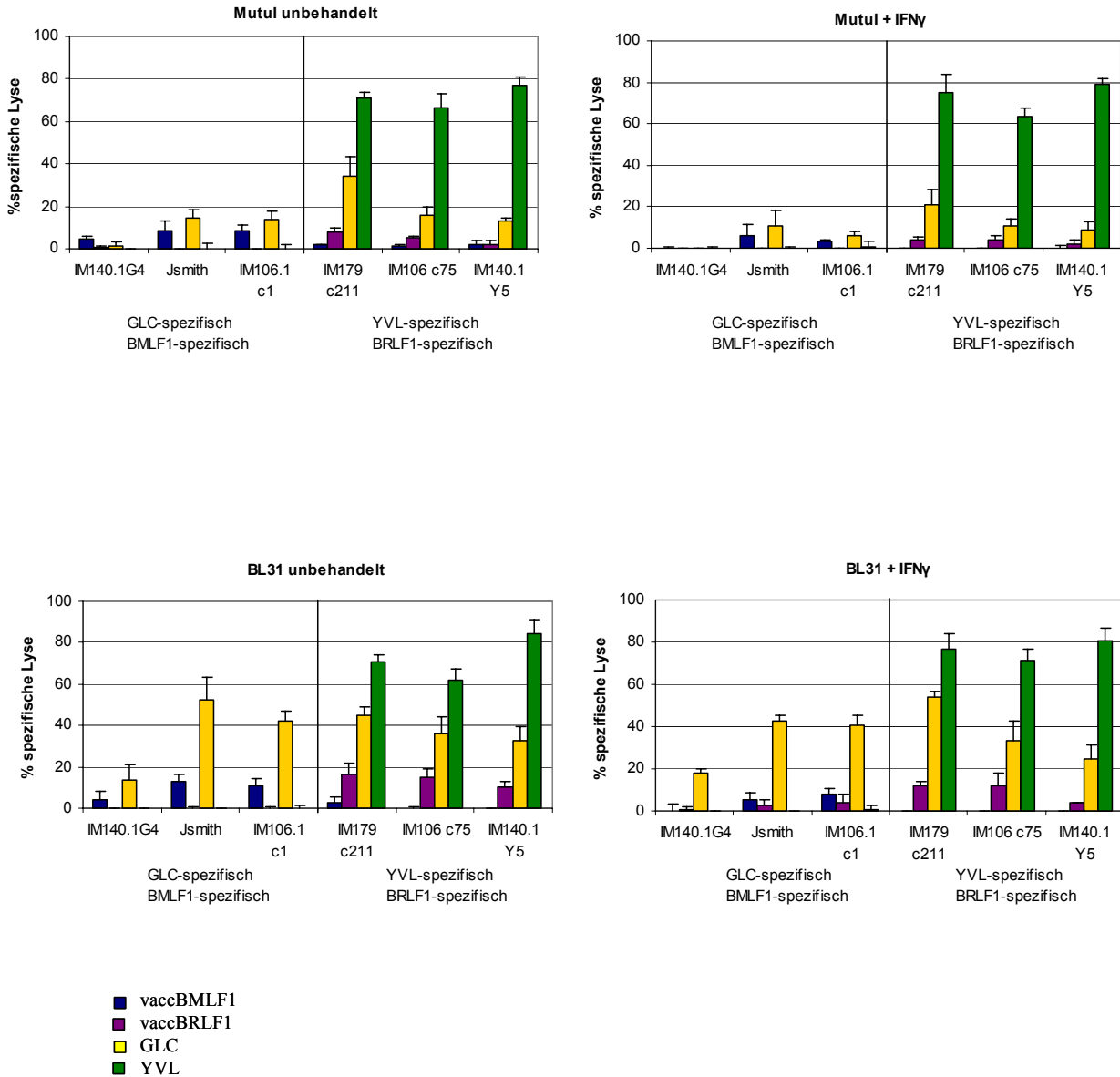


Abbildung 16: Lyse durch EBV-spezifische CTLs HLA-A2-exprimierender BL-Zelllinien

EBV-positive (MutuI) und –negative (BL31) BL-Linien wurden mit rekombinanten Vakzinia-Viren infiziert, die EBV-Antigene exprimieren (vaccBMLF1, vaccBRLF1). Als Kontrolle wurden die Zellen mit Peptiden beladen (GLC, YVL). Die eingesetzten Zellen wurden mit 300 U/ml IFN γ behandelt oder unbehandelt gelassen und mit spezifischen CTL-Klonen inkubiert. Die Freisetzung von ^{51}Cr diente als Maß der Erkennung und Tötung der BL durch ihre spezifischen CTL.

IM140.1G4, Jsmith, IM106.1 c1 (CTL-Klone spezifisch für GLC und vaccBMLF1)

IM179 c211, IM106 c75, IM140.1 Y5 (CTL-Klone spezifisch für YVL und vaccBRLF1).

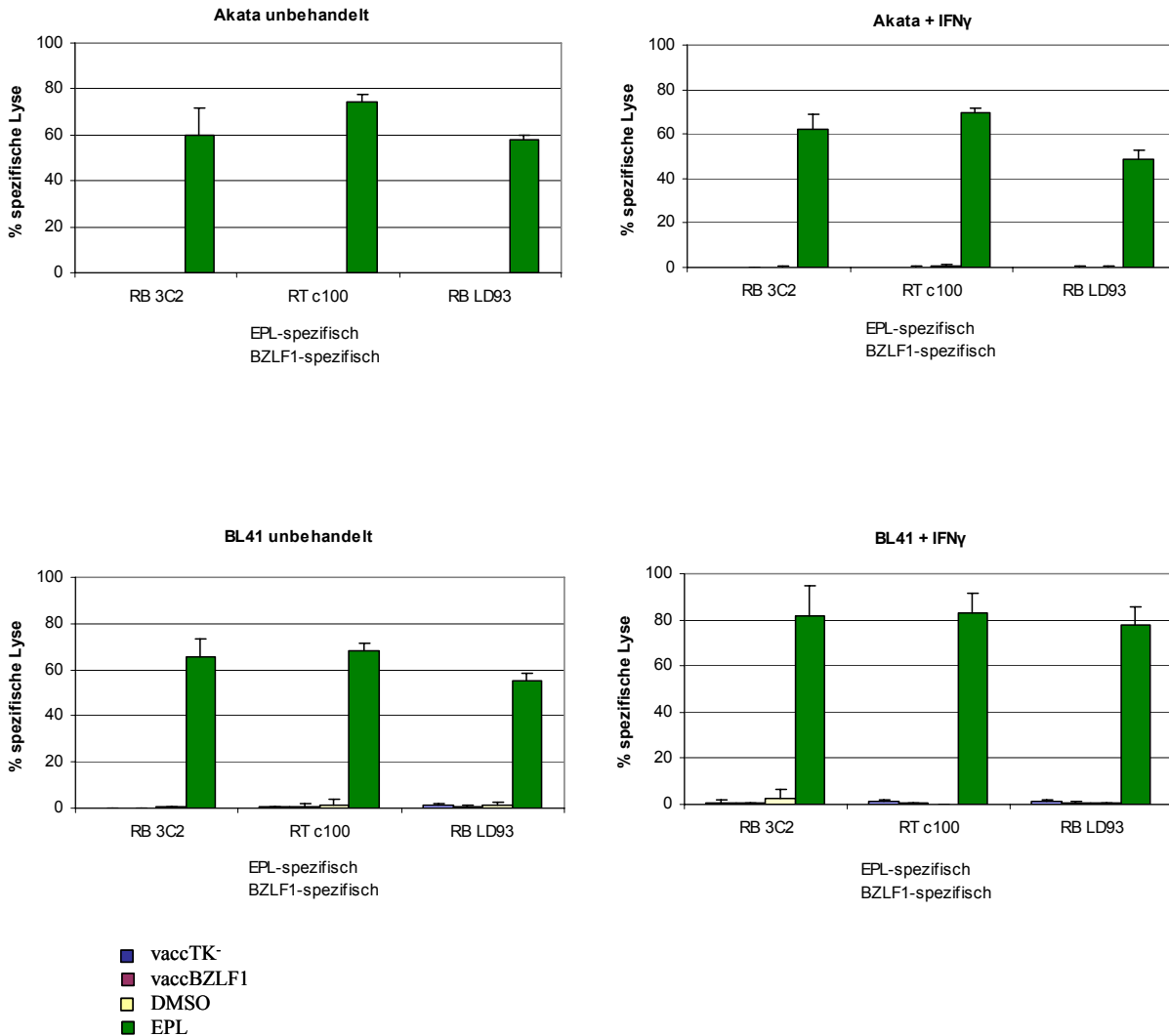


Abbildung 17: Lyse durch EBV-spezifische CTLs HLA-B32-exprimierender BL-Linien

Die EBV-positive BL-Linie Akata und die EBV-negative Linien BL41 wurden wie in Abbildung 16 beschrieben mit rekombinanten Vakzinia-Viren infiziert. Diese Infektion führt zur Expression eines EBV-Antigens (vaccBZLF1). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Peptid (EPL) beladen. Die Zellen wurden entweder mit 300U/ml IFN γ behandelt oder ohne Zytokin-Stimulation belassen und mit dem spezifischen CTL-Klon inkubiert. Auch hier diente die Freisetzung von ⁵¹Cr als Maßstab für die Erkennung und Tötung der BL durch ihren spezifischen CTL-Klon.

vaccTK⁻ (Negativkontrolle des Antigens vaccBZLF1, führt nicht zur Erkennung und Tötung von BL durch CTL), DMSO (Negativkontrolle des Peptids EPL, führt nicht zur Erkennung und Tötung von BL durch CTL), RB 3C2, RT c100, RB LD93 (CTL-Klone spezifisch für EPL und BZLF1).

2.7.2 Expression der Komponenten des MHC-I-Wegs in EBV-positiven und EBV-negativen BL

Da bekannt ist, dass in B-Zellen die Antigenpräsentation mittels des MHC-Klasse I-Wegs durch Ligation mit CD40-Ligand (CD40L) -ebenso wie durch IFN γ - hochreguliert wird, sollte geklärt werden, ob die Behandlung mit IFN γ und CD40L gemeinsam die AG-Präsentation

durch MHC-Klasse I-Moleküle stärker stimuliert als die Behandlung der Zellen mit je einem der beiden Faktoren allein.

Zu Beginn wurde mittels Western-Blot die basale Expression der Peptidtransporter-Untereinheiten TAP1 und TAP2 getestet. EBV-negative Linien (BL41 und BL31) zeigten eine Hochregulation der Expression nach 24-stündiger Behandlung mit TypI und TypII IFN. Dies war jedoch nicht bei Linien mit einem Latenz I-Phänotyp (Akata, MutuI) zu beobachten. Hier war lediglich eine geringe Hochregulation nach Gabe von IFN β zu sehen, wohingegen sich die Expression von TAP1 und TAP2 nach IFN γ -Behandlung nicht von der in unbehandelten Zellen unterschied (Abbildung 18).

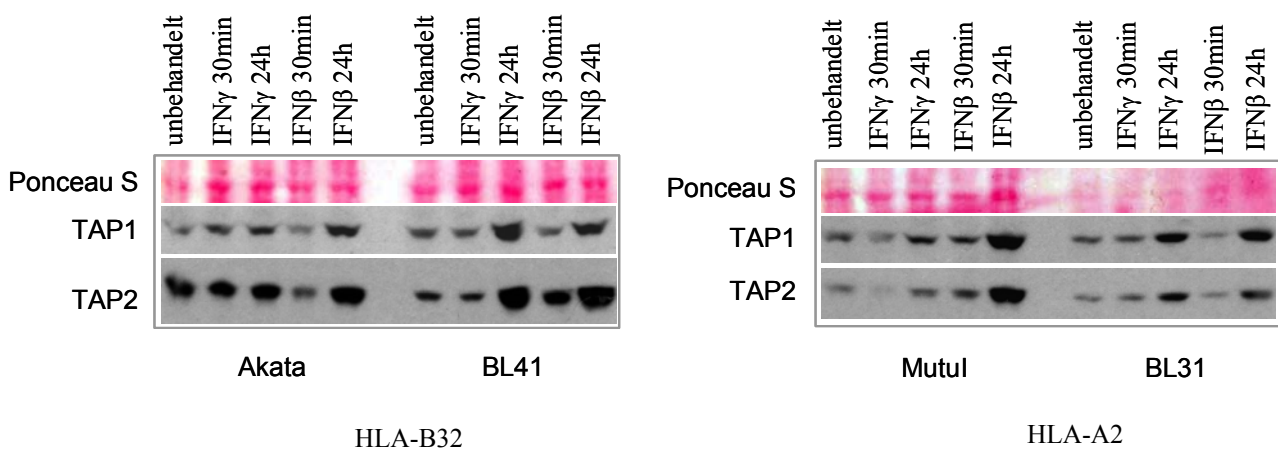


Abbildung 18: Regulation der Expression des TAP-Transporters in BL-Linien

Untersucht wurden jeweils zwei Latenz I-Linien (Akata und MutuI) und zwei EBV-negative Linien (BL41 und BL31), die, wie im vorherigen Abschnitt bereits beschrieben, jeweils den gleichen HLA-Phänotyp zeigen. Die Expression beider Transporter-Untereinheiten stieg in EBV-negativen Linien nach 24-stündiger Behandlung mit TypI und TypII IFN an. In Akata und MutuI ist diese Hochregulation nur nach IFN β -Behandlung zu beobachten.

TAP1 und TAP2 (Untereinheiten des TAP-Transporters), Ponceau S (Ladekontrolle).

2.7.3 Kokultivierung mit CD40L-Zellen

Die Kultivierung erfolgte wie in Kapitel 4.4.7 beschrieben. Als Negativkontrolle wurden LTK⁻-Zellen eingesetzt, die keinen CD40-Liganden exprimieren. Es wurden insgesamt sieben verschiedene Ansätze analysiert: unbehandelt, IFN γ -Gabe für 30 min und 24 h, CD40L bzw. Kokultivierung mit LTK⁻ für 36 h, CD40L bzw. LTK⁻-Kokultivierung für 36 h plus IFN γ -Behandlung für 30 min und 24 h. Die anschließende Analyse der einzelnen Komponenten erfolgte entweder mittels FACS-Analyse oder Western-Blot. Im FACS wurde die Expression der Oberflächemarker CD10, CD38, CD80, CD86, MHC-I und MHC-II bestimmt. CD10 und CD38 sind Keimzentrumsmarker, deren Expression durch die Aktivierung der B-Zellen herunterreguliert wird. CD80 und CD86 sind Aktivierungsmarker, deren Expression durch die

Aktivierung ansteigt, ebenso wie die der MHC-I und MHC-II Moleküle. Neben diesen Oberflächenmarkern wurde die Regulation von TAP1 und TAP2, der beiden Ketten des Peptidtransporters überprüft. Für das Experiment wurde das gleiche Set an Zelllinien wie in Abschnitt 2.7.1 herangezogen. Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche CD40-Ligation diente die Aktivierung der MAP-Kinasen, JNK1 und 2 und Erk1 und 2. Durch Kokultivierung mit CD40L-exprimierenden Zellen, nicht jedoch bei Kokultivierung mit LTK⁻-Zellen (Negativkontrolle) wurden JNK1 und 2 und Erk1 phosphoryliert (Abbildung 19), wobei in der EBV-negativen Linie BL31 die MAP-Kinasen bereits konstitutiv phosphoryliert waren. Diese konstitutive Aktivierung in BL31-Zellen war jedoch nicht mit einer Hochregulation des TAP-Transporters verbunden (Abbildung 22), die erst nach erfolgter Behandlung mit IFN γ oder CD40-Ligation zu beobachten war. Die MAP-Kinase Erk2 zeigte in der EBV-negativen Linie BL41 und der EBV-positiven Linie Akata eine schwache Phosphorylierung bereits in unbehandelten Zellen, diese Phosphorylierung wurde jedoch durch die Ligation mit CD40L deutlich erhöht (Abbildung 19A). Bei Kokultivierung mit LTK⁻-Zellen war dies nicht zu beobachten. Hier war lediglich eine schwache Phosphorylierung von Erk2 in der Zelllinie Akata zu sehen. Ebenso wie in der Zelllinie BL31 war die beobachtete Phosphorylierung der MAP-Kinase nicht mit einer Hochregulation der TAP-Untereinheiten verbunden. Diese war erst nach IFN γ -Behandlung oder CD40-Ligation zu beobachten (Abbildung 22).

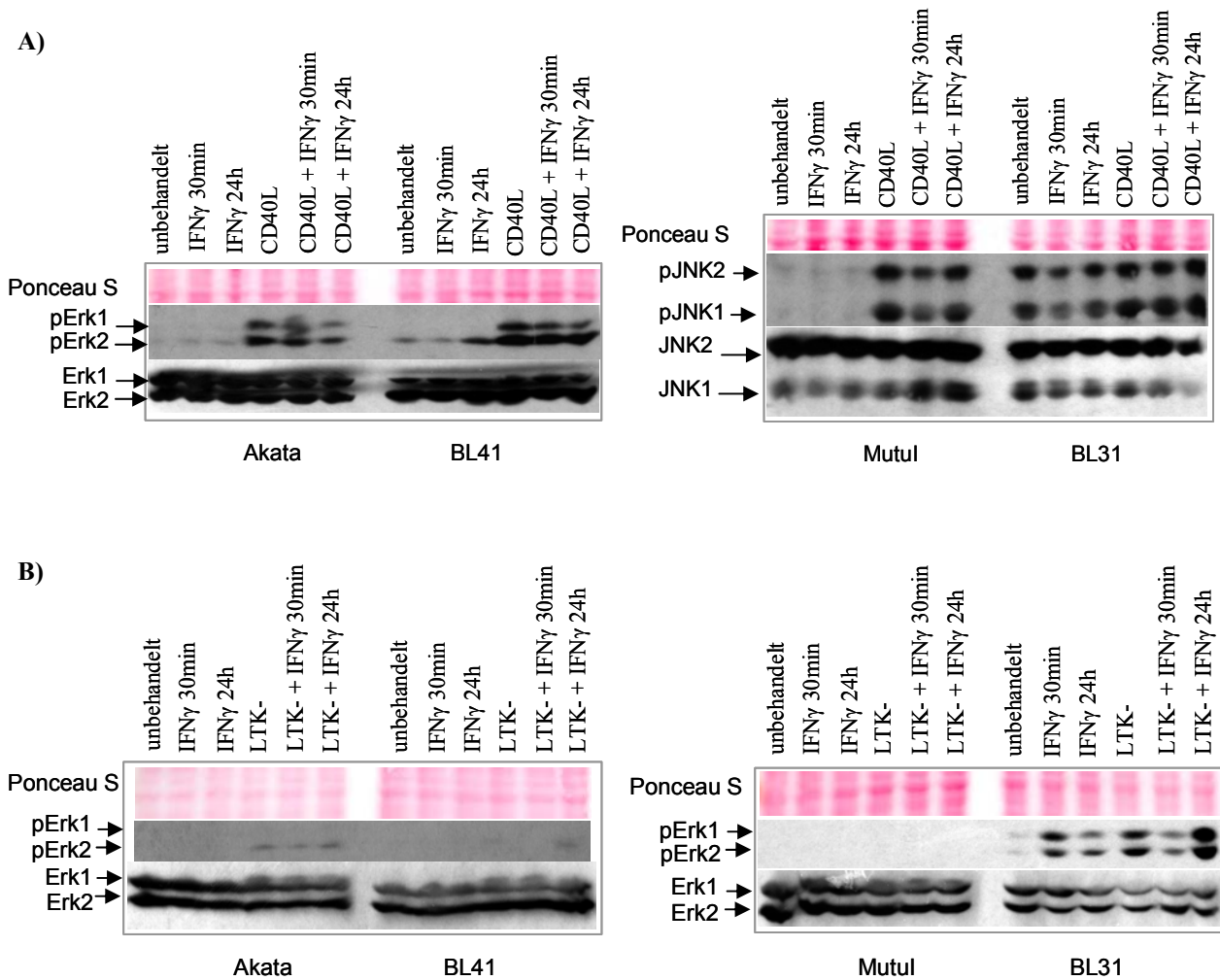


Abbildung 19: Phosphorylierung von MAP-Kinasen

A) Jeweils $2,5 \times 10^6$ Zellen wurden ausplattiert und ein Teil mit CD40L-exprimierenden Fibroblasten kokultiviert. Einige Zellen wurden zusätzlich mit IFN γ behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zelllysate gewonnen und mittels Western-Blot die Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk und JNK untersucht. Nur nach CD40-Ligation war die Bande für das phosphorylierte Protein zu sehen, ohne Ligation konnte lediglich das unphosphorylierte Protein nachgewiesen werden. Eine Ausnahme stellte die EBV-negative Linie BL31 dar, die trotz einer fehlenden CD40-Ligation eine Aktivierung der MAP-Kinase JNK zeigt. Diese Aktivierung geht aber nicht mit einer Hochregulation der TAP-Untereinheiten einher (siehe Abbildung 23).

B) Die Zellen wurden in gleicher Weise wie in A) behandelt, mit dem Unterschied, dass statt CD40L-exprimierenden Fibroblasten die parentalen LTK⁻-Zellen als Negativkontrolle eingesetzt wurden. Ponceau S (Ladkontrolle), pErk1,2 (phosphorylierte Form der MAP-Kinase Erk1,2), Erk1,2 (MAP-Kinase), pJNK1,2 (Phosphorylierte Form der MAP-Kinase JNK1,2), JNK1,2 (MAP-Kinase).

Die Analyse der Oberflächen-Marker zeigte, dass nach CD40-Ligation die Aktivierungsmarker CD80 und CD86 in geringem Maße hochreguliert werden, dies wird nicht durch die gleichzeitige Stimulation mit IFN γ erhöht. Des Weiteren ist derselbe Effekt nicht nach alleiniger Gabe von IFN γ zu beobachten. Die Keimzentrumsmarker CD10 und CD38 zeigten nur einen geringen Effekt nach Stimulation mit IFN γ oder CD40L, ebenso wie die MHC-Moleküle, die meist genauso wie in unbehandelten Zellen exprimiert wurden. Nach der Kokultivierung mit LTK⁻-Zellen, die keinen CD40-Liganden exprimieren und somit als

Negativkontrolle für die CD40-Ligation dienten, konnte nur in einzelnen Fällen ein Effekt auf die analysierten Oberflächen-Moleküle festgestellt werden (Abbildung 20 und 21).

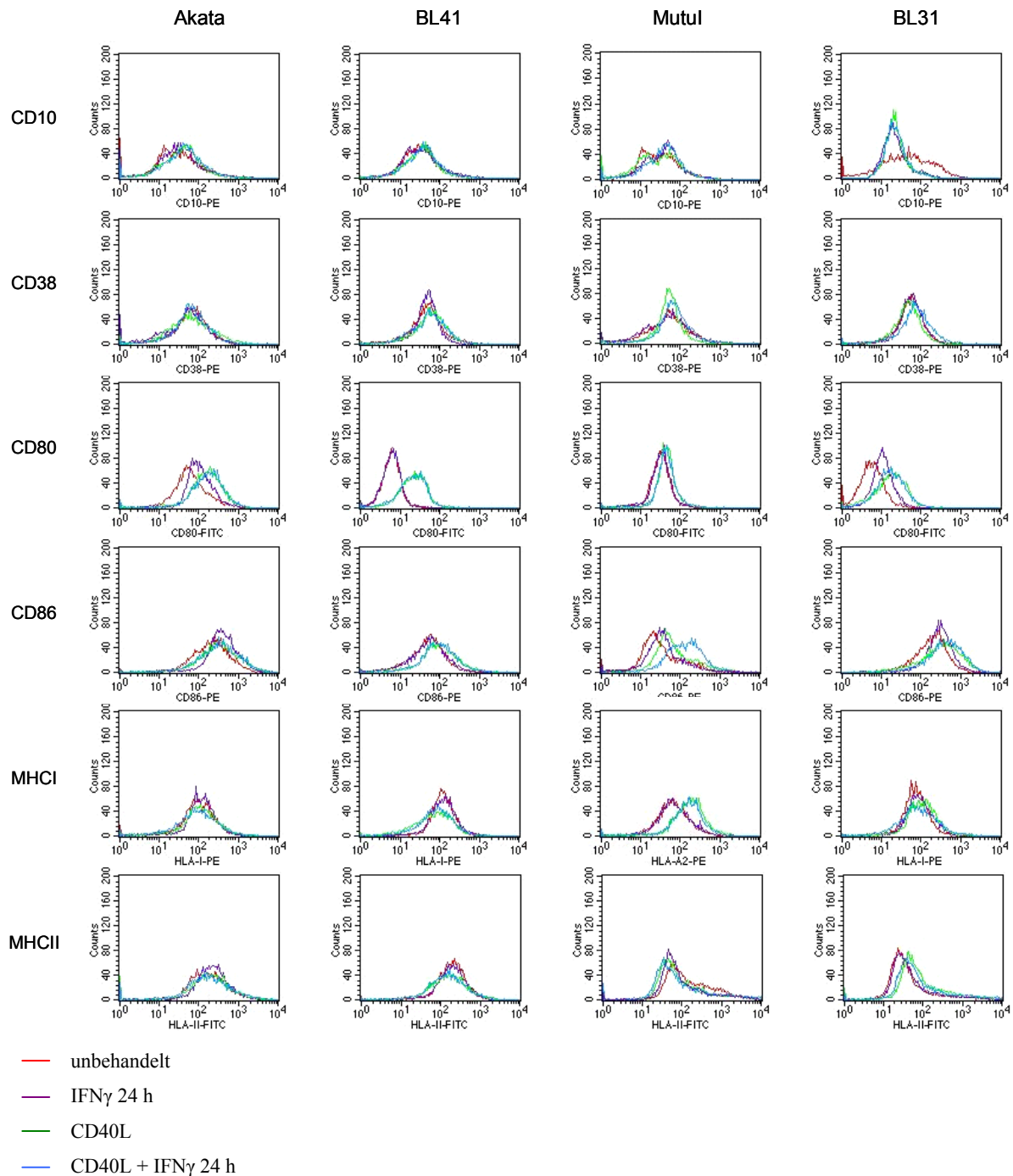


Abbildung 20: Regulation der Oberflächenmoleküle nach CD40-Ligation

Jeweils $2,5 \times 10^6$ Zellen pro Linie und Ansatz wurden entweder für unterschiedliche Zeiten mit IFN γ stimuliert, als Kontrolle unbehandelt belassen oder für 36 h mit den CD40-Liganden-exprimierenden Fibroblasten kokultiviert und ebenfalls für unterschiedliche Zeiten mit IFN γ behandelt. Nach 36 h wurden die BL-Zellen von den adhären CD40L-Zellen gelöst und mit den entsprechenden Antikörpern für die FACS-Analyse inkubiert. Insgesamt wurde die Expression von sechs verschiedenen Oberflächen-Molekülen untersucht. CD10 und CD38 sind Keimzentrumsmarker, deren Expression durch die Aktivierung der B-Zellen negativ reguliert werden sollte; CD80 und CD86 sind Aktivierungsmarker, die -ebenso wie MHC-I und MHC-II (auch HLA-I und HAL-II)-durch IFN γ und CD40L hochreguliert werden sollten.

Akata, Mutul (EBV-positive BL mit einem Latenz I-Phänotyp), BL41, BL31 (EBV-negative BL).

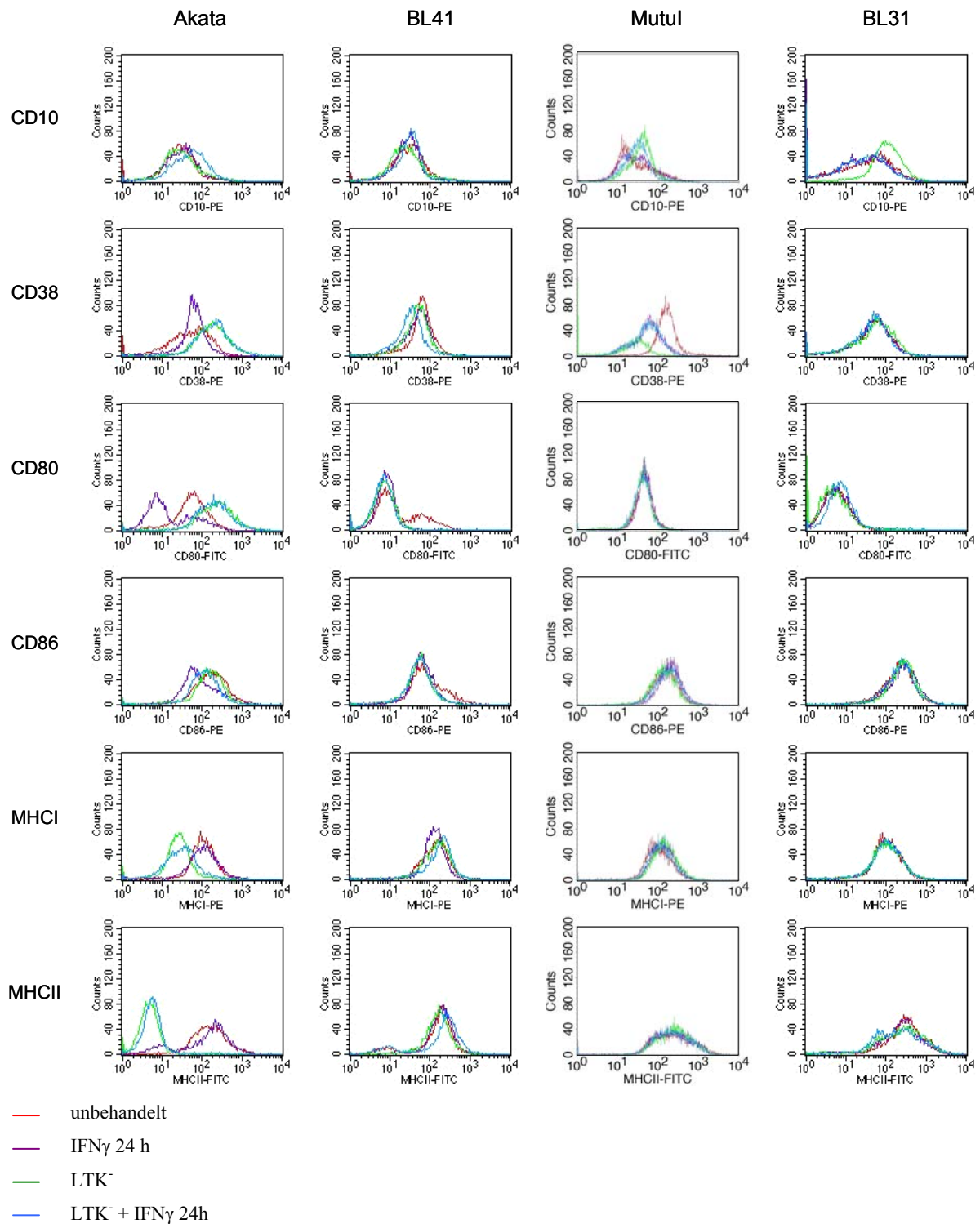


Abbildung 21: Regulation der Oberflächenmoleküle ohne CD40-Ligation

Die Zellen wurden in gleicher Weise wie in Abbildung 20 behandelt mit dem einzigen Unterschied, dass statt CD40L-exprimierenden Fibroblasten LTK⁻ Zellen als Negativkontrolle eingesetzt wurden. Akata, Mutul (EBV-positive BL mit einem Latenz I-Phänotyp), BL41, BL31 (EBV-negative BL).

Die Untersuchung der Regulation des Peptidtransporters TAP1 und TAP2 zeigte, dass in EBV-negativen, IFN γ -sensitiven BL (BL41, BL31) durch die Behandlung sowohl mit IFN γ als auch CD40L die Expression beider Untereinheiten erhöht wurde. Durch die Kombination

von CD40L und IFN γ wurde dieser Effekt nicht erhöht. Hingegen war in EBV-positiven, IFN γ -resistenten BL (Akata, MutuI) eine Hochregulation des TAP-Transporters erst durch Ligation mit CD40, nicht jedoch durch IFN γ -Behandlung zu beobachten (Abbildung 22).

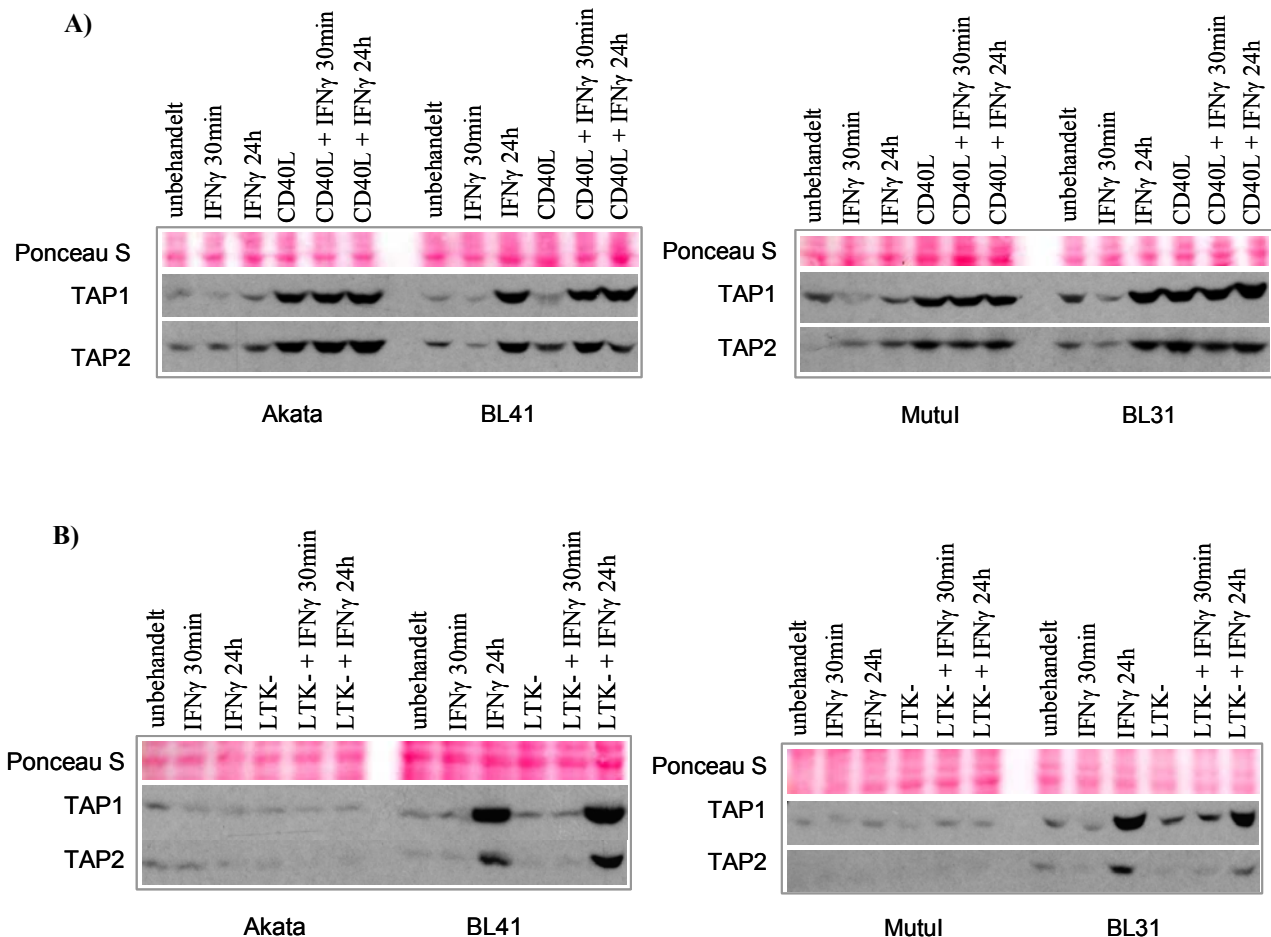


Abbildung 22: Unterschiedliche Regulation der Expression des TAP-Transporters

A) Die Behandlung der Zellen erfolgte wie bereits beschrieben (Abbildung 20). Mit Hilfe der Western-Blot-Methode wurde die Expression der TAP-Untereinheiten TAP1 und TAP2 analysiert.

In den untersuchten EBV-positiven Latenz I-Linien war eine Hochregulation der Expression erst nach CD40-Ligation festzustellen. Eine vergleichbare Hochregulation von TAP1 und TAP2 wurde in EBV-negativen Linien auch nach IFN γ -Gabe beobachtet.

B) Die Behandlung der Zellen erfolgte wie unter A) beschrieben. LTK-Zellen dienen als Negativkontrolle für die CD40L-exprimierenden Zellen. Hier war nur in EBV-negativen BL-Linien eine Hochregulation nach IFN γ -Behandlung zu beobachten. Die Expression beider Untereinheiten blieb in EBV-positiven BL-Linien vergleichbar zu unbehandelten Zellen.

Ponceau S (Ladekontrolle), TAP1 und TAP2 (Untereinheiten des TAP-Transporters)

Akata, MutuI (EBV-positiv BL im Latenz I-Phänotyp), BL41, BL31 (EBV-negative BL).

Zur Kontrolle der erfolgten Stimulation mit IFN γ wurde bei allen Experimenten die Phosphorylierung von STAT1 an Tyrosin 701 überprüft. Dabei zeigte sich, dass die EBV-negativen Zelllinien wie bereits beschrieben gegenüber IFN γ sensitiv waren und mit einer Phosphorylierung antworteten. Hingegen war in EBV-positiven BL keine Aktivierung des

IFN γ -Signalwegs zu sehen (Abbildung 23A). Das gleiche ist zu beobachten nach Kokultivierung der BL-Zellen mit LTK⁻-Zellen (Abbildung 23B). Auch hier war nur in EBV-negativen Linien die Phosphorylierung von STAT1 nachzuweisen. Bemerkenswerterweise führte die CD40-Ligation auch ohne STAT1-Aktivierung durch Y701-Phosphorylierung zur Induktion von TAP1 und TAP2 (Abbildung 22).

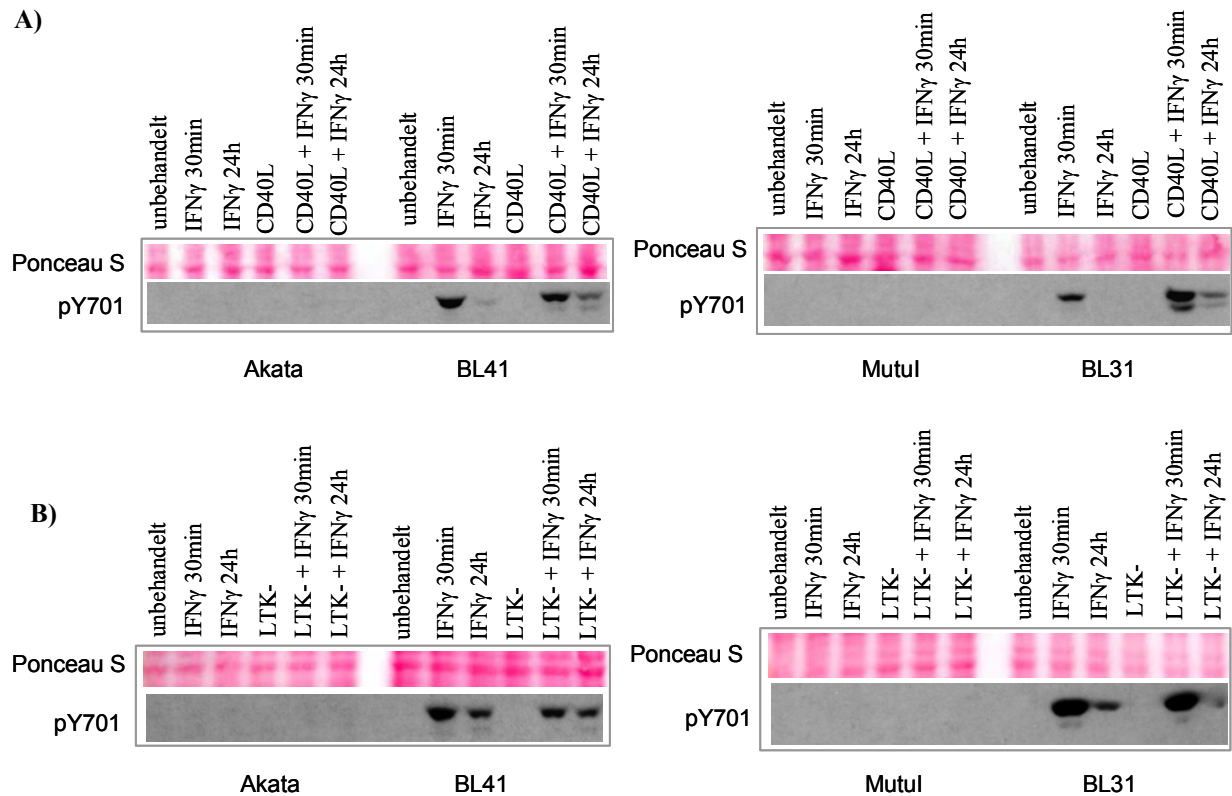


Abbildung 23: Phosphorylierung von STAT1

A) Es wurden jeweils $2,5 \times 10^6$ Zellen eingesetzt, die entweder unbehandelt gelassen wurden, für die angegebenen Zeitpunkte mit IFN γ behandelt oder zusätzlich für 36 h mit CD40L-exprimierenden Fibroblasten kokultiviert. Nach den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Ernte der Zellen und die Herstellung von Zelllysaten. Die Wirkung von IFN γ wurde anhand der Phosphorylierung von STAT1 im Western-Blot überprüft. Die Phosphorylierung von STAT1 an Tyrosin 701 war nur in EBV-negativen BL-Linien zu beobachten.

B) Die Behandlung der Zellen erfolgte wie unter A) beschrieben. LTK⁻-Zellen dienen als Negativkontrolle für die CD40L-exprimierenden Fibroblasten. Auch hier war eine Phosphorylierung von STAT1 nur in EBV-negativen Linien nachzuweisen.

Ponceau S (Ladekontrolle), pY701 (phosphoryliertes Tyrosin 701 von STAT1)

Akata, MutuI (EBV-positive BL im Latenz I-Phänotyp), BL41, BL31 (EBV-negative BL).

3. Diskussion

3.1 Evaluierung des Phänomens der IFN γ -Resistenz in EBV-positiven Latenz I Burkitt Lymphom-Zellen

Im Rahmen der Untersuchungen des Einflusses von c-Myc auf Interferon-Signalwege in Burkitt Lymphomzellen konnte die überraschende Beobachtung gemacht werden, dass EBV-positive BL-Linien, die in Kultur den Phänotyp des Tumors *in vivo* beibehalten haben, nicht mehr in der Lage sind, auf IFN γ zu antworten. Die Tyrosin 701-Phosphorylierung von STAT1 diene als Indikator für eine Interferon-Antwort. Im Gegensatz zu EBV-positiven BL antworteten EBV-negative BL-Zellen normal auf IFN γ . Die Behandlung mit IFN β zeigte keine Unterschiede zwischen EBV-positiven und EBV-negativen BL-Linien; IFN β induzierte eine Phosphorylierung von STAT1 unabhängig vom EBV-Status der Zellen. Anhand der Untersuchung vieler EBV-positiver BL-Zelllinien mit Latenz I-Phänotyp und EBV-negativer BL-Linien wurde diese Beobachtung weiter evaluiert. Insgesamt wurden zehn EBV-positive BL-Linien mit einem Latenz I-Phänotyp analysiert. Bis auf eine Ausnahme (CHEP-BL) zeigten alle eine IFN γ -Resistenz. Die Phosphorylierung von STAT1 an Tyrosin 701 wurde nach 30-minütiger und 24-stündiger Behandlung mit dem jeweiligen IFN analysiert. Die Phosphorylierung war nach 30 Minuten bereits stark ausgeprägt und nahm danach wieder ab. Bei EBV-negativen BL wurde beobachtet, dass die Phosphorylierung von STAT1 nach Behandlung mit Typ I IFN erheblich stärker war als nach IFN γ -Behandlung. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass JAK2 in Zellen mit einer c-Myc Translokation niedriger exprimiert wird (Hummel et al., 2006).

3.2 Einfluss von EBV auf den Mechanismus der IFN γ -Resistenz

Von vielen Viren ist bekannt, dass sie Genprodukte produzieren, die die antivirale zelluläre Antwort außer Kraft setzen. Deshalb drängte sich als erstes die Frage auf, ob die beobachteten Unterschiede in der Resistenz versus Suszeptibilität gegenüber IFN γ zwischen EBV-positiven und EBV-negativen BL-Zellen auf die Aktivität eines viralen Genprodukts in EBV-positiven Linien zurückgeführt werden können. Bislang gibt es keine Erkenntnisse darüber, wie und aufgrund welcher virusbedingter zellulärer Veränderungen EBV zur Entstehung des Burkitt Lymphoms beiträgt. Ob ein virales Genprodukt an der IFN γ -Resistenz beteiligt ist, wurde mit Hilfe verschiedener ursprünglich EBV-positiver BL-Zelllinien getestet, die *in vitro* das virale Genom verloren haben (sogenannte EBV-Verlust-Mutanten) (Kitagawa et al., 2000; Nanbo et

al., 2002; Shimizu et al., 1994) und nun einen EBV-negativen Phänotyp zeigen. Insgesamt standen drei solcher EBV-Verlust-Mutanten inklusive der EBV-positiven Ursprungszelllinien zur Verfügung, die auf die Aktivität der TypI und TypII IFN-Signalwege nach Behandlung mit dem jeweiligen IFN untersucht wurden. Wie ihre EBV-positiven Ursprungszellen erwiesen sich diese Mutanten ebenfalls als resistent gegenüber IFN γ , antworteten jedoch normal auf IFN β . Durch eine Infektion dieser Mutanten mit rekombinantem EBV wurden von Takada und Mitarbeitern wieder EBV-positive BL-Zellen mit Latenz I-Phänotyp generiert (Komano et al., 1999). Diese Zellen wurden ebenfalls mit IFN γ und IFN β inkubiert und die Aktivierung der Signalwege untersucht. Auch hier wurde eine IFN γ -Resistenz beobachtet. Neben diesen Linien standen noch weitere Mutanten von ursprünglich EBV-negativen BL-Zelllinien zur Verfügung, die mit einem transformierenden und einem nicht-transformierenden Virusstamm infiziert worden waren (sogenannte Konvertanten) (Calender et al., 1987). Ebenso wie ihre EBV-negativen Ursprungszellen zeigten sie eine Aktivierung beider Signalwege nach Behandlung mit dem jeweiligen IFN. Wäre ein Genprodukt von EBV an der Resistenz gegenüber IFN γ beteiligt, so würde man für die EBV-Verlust-Mutanten eine Reaktion auf IFN γ erwarten und für die Konvertanten eine Resistenz. Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass kein virales Genprodukt an dem Phänomen der IFN γ -Resistenz in EBV-positiven Latenz I-BL beteiligt ist. Diese Schlussfolgerung steht mit der Beobachtung im Einklang, dass EBV-immortalisierte Zellen und BL-Zellen mit Latenz III-Phänotyp auf IFN γ mit einer Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 antworten.

3.3 Untersuchungen zum Mechanismus der IFN γ -Resistenz

Um Unterschiede zwischen IFN γ -resistenten BL-Linien mit Latenz I-Phänotyp und IFN γ -suszeptiblen EBV-negativen Linien zu identifizieren, wurden die einzelnen Komponenten des IFN γ -Signalwegs untersucht. Dazu gehören die beiden Tyrosinkinasen JAK1 und JAK2, die Rezeptorketten α und β und STAT1.

STAT1 und JAK1 spielen ebenfalls im TypI IFN-Signalweg eine Rolle. Da dieser Signalweg in allen getesteten Zelllinien aktiv ist, sind Veränderungen dieser Komponenten, die nur einen der beiden Signalwege kompromittieren würden, sehr unwahrscheinlich. Für STAT1 wurde gezeigt, dass es in allen Linien exprimiert wird und nach IFN β -Gabe an Tyrosin 701 phosphoryliert wird. Eine grundsätzlich fehlende Phosphorylierbarkeit an diesem wichtigen Tyrosinrest kann damit als Grund für die Resistenz ausgeschlossen werden. Ebenso konnte die Expression der unphosphorylierten Form von STAT1 nachgewiesen werden, die unabhängig von einer IFN γ -Resistenz ist. Durch den Nachweis der Expression von JAK1 in

allen untersuchten Zelllinien und der Suszeptibilität gegenüber IFN β kann eine fehlende Expression dieser Kinase ebenfalls als Ursache ausgeschlossen werden.

FACS-Analysen zeigten, dass die α -Kette des IFN γ -Rezeptors auf der Zelloberfläche aller resistenter Linien exprimiert wird. Da die α -Kette eine funktionstüchtige β -Kette benötigt, um an die Oberfläche gebracht zu werden (Farrar & Schreiber, 1993), kann die Beobachtung der Anwesenheit der α -Kette als indirekter Beweis für die Expression der β -Kette angesehen werden. Zusätzlich dazu wurde die Expression beider Rezeptorketten auf mRNA-Ebene gezeigt. Unterschiede wurden jedoch bei der Analyse der Expression von JAK2, der Tyrosinkinase, die nicht im TypI-Signalweg aktiv ist, gefunden. Dabei zeigte sich, dass alle IFN γ -resistenten Linien eine starke Reduktion auf mRNA-Ebene aufwiesen und dass in der Mehrzahl dieser Linien ebenfalls keine Expression auf Proteinebene nachzuweisen war. Vier der zehn hier getesteten Linien wiesen eine Expression von JAK2 auf, wobei nur eine einzige dieser Zelllinien eine vergleichbare Menge zu sensitiven Linien exprimiert. Für die anderen drei JAK2-exprimierenden Linien konnte eine stark reduzierte, gerade noch wahrnehmbare Expression beobachtet werden.

Um nachzuweisen, dass die fehlende JAK2-Expression für die IFN γ -Resistenz in EBV-positiven BL-Linien verantwortlich ist, wurden einige IFN γ -resistente Linien mit einem Expressionsplasmid für JAK2 transfiziert, die JAK2-positiven Zellen sortiert und mit IFN γ behandelt. Es wurden drei IFN γ -resistente Linien analysiert, die keine JAK2-Expression zeigten sowie eine resistente Linie (Rael), die eine geringe Expression von JAK2 aufwies. Nach der Transfektion konnte in allen transfizierten Zelllinien eine deutliche Expression von JAK2 nachgewiesen werden, ebenso wie die Phosphorylierung von STAT1, also die Aktivierung des IFN γ -Signalwegs nach Behandlung der transfizierten Zellen mit IFN γ . Somit ist nachgewiesen, dass die fehlende JAK2-Expression tatsächlich verantwortlich für die gezeigte IFN γ -Resistenz ist. Die in Rael gemachten Beobachtungen lassen vermuten, dass die Menge an endogen exprimiertem JAK2 nicht ausreichend ist, um die Signalweiterleitung zu ermöglichen. Ob Mutationen im *jak2*-Gen die fehlende Expression und Kinaseaktivität beeinträchtigen und so eine Signalweiterleitung verhindern, bleibt an dieser Stelle offen. Aufgrund der sehr geringen Transfektionseffizienz gelang es bei drei der resistenten, JAK2-exprimierenden Linien nicht, die IFN γ -Suszeptibilität durch JAK2-Expression zu rekonstituieren.

3.4 Untersuchungen zur Ursache der fehlenden JAK2-Expression

Durch die Wiederherstellung der Signalweiterleitung nach Einbringen von JAK2 in ursprünglich resistente Linien konnte gezeigt werden, dass die fehlende JAK2-Expression für die Resistenz verantwortlich ist. Aus diesen Ergebnissen ging jedoch nicht hervor, ob genetische oder epigenetische Veränderungen der fehlenden JAK2-Expression zugrunde liegen. Um zu testen, ob genetische Ursachen (wie Mutationen oder Deletionen im *jak2*-Gen) vorliegen, wurde die Antwort auf IFN γ von EBV-positiven BL mit einem Latenz I- und einem Latenz III-Phänotyp verglichen. Alle getesteten Latenz III-Linien zeigten eine Phosphorylierung von STAT1 nach IFN γ -Behandlung und exprimierten JAK2. Da allgemein anerkannt ist, dass Latenz III-Zelllinien in Kultur aus Latenz I-Linien hervorgegangen sind, sind genetische Veränderungen als Ursache für die fehlende JAK2-Expression und IFN γ -Resistenz unwahrscheinlich. Deletionen oder Mutationen im *jak2*-Gen müssten sonst auch in BL-Linien mit einem Latenz III-Phänotyp nachweisbar sein und die JAK2-Expression bzw. Aktivität verhindern. Durch die Untersuchung der Zelllinie Mutu, die sowohl in einem Latenz I- als auch in einem Latenz III-Phänotyp vorlag, konnte diese Aussage verifiziert werden. Um den gemeinsamen genetischen Ursprung von MutuI und MutuIII Zellen zu überprüfen, wurde die Rekombination der V-, D- und J-Segmente der Immunglobulin-Ketten (VDJ-Rekombination) mittels PCR und anschließender Sequenzierung analysiert. Während der B-Zellentwicklung werden die variablen Regionen der Immunglobulin-Ketten durch somatische Rekombinationen zusammengesetzt. Die schwere Kette der V-Region setzt sich aus drei Gensegmenten V_H, D_H und J_H zusammen, die leichte Kette aus V- und J-Segmenten. Im Menschen gibt es viele verschiedene Gene für die unterschiedlichen Segmente und somit eine große Diversität in der Zusammensetzung der Immunglobulin-Ketten. Durch diese hohe Diversität der V-Regionene besitzt jede reife B-Zelle einen individuellen B-Zell-Rezeptor. Daher sind Marker für V-Regionen ideal zur Analyse von Verwandtschaftsverhältnissen von B-Zellen.

Durch die VDJ-Rekombinationsanalyse konnte gezeigt werden, dass MutuI und MutuIII in der Tat dieselbe Ursprungszelle haben. Aufgrund der Tatsache, dass MutuIII aus einer MutuI-Linie hervorgegangen ist und MutuIII-Zellen gegenüber IFN γ -sensitiv sind, ist eine genetische Ursache für die fehlende JAK2-Expression zumindest in dieser Zelllinie sehr unwahrscheinlich. Da die Verfügbarkeit einer Zelllinie sowohl in der Latenz I als auch Latenz III auf die Linie Mutu beschränkt war, kann diese Aussage in dieser Stringenz nur für diese BL-Linie getroffen werden. Da aber alle BL-Latenz III-Linien aus Latenz I-Linien entstanden sind und alle BL-Latenz III-Linien JAK2 exprimieren und auf IFN γ antworten, drängt sich die

Schlussfolgerung auf, dass auch für andere Zelllinien ein epigenetischer Mechanismus vorliegt. Dies schließt jedoch genetische Ursachen in einer geringen Zahl von Zelllinien nicht aus.

Da bekannt ist, dass in Latenz I-Linien des Burkitt Lymphoms die Expression aller viralen Antigene mit Ausnahme von EBNA1 durch Methylierung verhindert wird (Masucci et al., 1989), lag die Annahme nahe, dass ein ähnlicher Mechanismus auch für die fehlende JAK2-Expression verantwortlich ist. Ob der fehlenden Expression von JAK2 ebenfalls eine Methylierung des Promotors zugrunde liegt, wurde mit Hilfe des demethylierenden Agens 5'-Azacytidin (AZA) untersucht. Hierbei handelt es sich um ein Cytidin-Analogon, das die Aktivität von Methyltransferasen inhibiert. Zwei resistente EBV-positive Latenz I-Linien (Akata und MutuI) wurden mit AZA für unterschiedliche Zeiten inkubiert und die Expression von JAK2 und die Phosphorylierung von STAT1 nach IFN γ Behandlung analysiert. Die Expression von EBNA2 diente dabei als Indikator und Positivkontrolle für die Aktivität von AZA. In beiden Zelllinien konnte nach 72 h eine Expression von EBNA2 in etwa vergleichbarer Menge zu der in BL Latenz III- und EBV-immortalisierten Zelllinien nachgewiesen werden. Jedoch konnte keine Expression von JAK2 und somit auch keine Phosphorylierung von STAT1 nach IFN γ -Behandlung beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die fehlende Expression von JAK2 nicht auf Methylierung des Promotors zurückzuführen ist.

In den letzten Jahren ist ein immer größer werdendes Feld der epigenetischen Veränderung in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt: die mikroRNAs (miRNAs). Diese Gruppe kleiner RNA-Moleküle (ca. 20 Nukleotide) ist an der Regulation der Genexpression vieler verschiedener biologischer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Transkriptionsregulation beteiligt. miRNAs werden in den meisten eukaryontischen Zellen exprimiert und entfalten ihre Aktivität durch die Bindung an die 3'-untranslatierte Region von mRNA-Molekülen. Der Mechanismus der Erkennung der mRNA durch miRNAs ist noch nicht vollständig verstanden. Es konnte gezeigt werden, dass eine bestimmte Region („seed-region“) in der miRNA an eine komplementäre Sequenz in der mRNA bindet (Brennecke et al., 2005). miRNAs führen zu einer verlangsamten Translations-Rate und/oder einer erhöhten Degradationsrate der gebundenen mRNA (Bagga et al., 2005; Pillai et al., 2005). Bislang wurden über 400 solcher miRNAs beschrieben. Es wird jedoch spekuliert, dass bis zu 1000 dieser Moleküle im menschlichen Genom kodiert werden (Cowland et al., 2007). Die Aktivität von miRNAs könnte eine Ursache für die fehlende JAK2-Expression sein. Bisher

sind mehr als 17 miRNAs für das *jak2*-Gen bekannt (miR Base (<http://microrna.sanger.ac.uk>)).

3.5 Beobachtungen zur IFN γ -Resistenz *ex vivo*

Durch die Analyse von Zelllinien *in vitro* konnte keine Aussage über die *in vivo*-Situation des Burkitt Lymphoms gemacht werden. Um einen Einblick zu bekommen, ob BL-Zellen auch *in vivo* gegen IFN γ resistent sind, wurden Zellen aus sieben EBV-positiven Biopsien des Burkitt Lymphoms analysiert. Diese Zellen wurden *ex vivo* mit TypI und TypII IFN behandelt und die Phosphorylierung von STAT1 analysiert. Allerdings mussten aufgrund der Tatsache, dass Zellen von Biopsie-Material nach dem Auftauen sehr schnell sterben, die Inkubationszeiten verkürzt werden. Aus den *in vitro*-Experimenten an etablierten Zelllinien war hervorgegangen, dass bereits nach 30 Minuten ein deutliches Signal für die Phosphorylierung von STAT1 nachgewiesen werden kann. Deshalb wurden diese Bedingungen für die *ex vivo*-Analyse von BL Biopsie-Zellen gewählt. Zellen aus drei der sieben Biopsien zeigten eine deutliche Aktivität beider Signalwege und exprimierten JAK2. Bei zwei Biopsien war die Anzahl an lebenden Zellen zu gering für eine Auswertung. In Zellen von zwei Biopsien wurde eine Resistenz gegenüber IFN γ beobachtet (Sav und Silva). In Silva Biopsie-Zellen wurde eine Expression von JAK2 auf Proteinebene beobachtet, Sav Biopsie-Zellen zeigten keine Expression von JAK2. Interessanterweise konnten bisher nur aus Zellen der Biopsien Sav und Silva Zelllinien in Kultur etabliert werden. Bei den anderen untersuchten Biopsien waren die Versuche, stabile Zelllinien in Kultur zu etablieren, vergeblich. Die Zelllinie Sav-BL hat einen stabilen Latenz I-Phänotyp und zeigte eine IFN γ -Resistenz. Die Zelllinie Silva entwickelt keinen stabilen Phänotyp und bildet nach dem Auftauen sehr schnell einen Latenz III-Phänotyp aus, weswegen an diesen Zellen keine Analyse vorgenommen wurde. Die Beobachtung, dass die Zellen der zwei Biopsien, die eine IFN γ -Resistenz zeigen, auch als Zelllinie *in vitro* vorliegen, könnte darauf hindeuten, dass IFN γ -resistente Zellen einen Vorteil gegenüber IFN γ -sensitiven Zellen haben und deswegen in Kultur leichter zu Zelllinien heranwachsen.

3.6 IFN γ -Resistenz und Immunevasion

Ein wichtiger Ansatzpunkt für diese Arbeit war die Untersuchung eines möglichen Einflusses der beobachteten IFN γ -Resistenz auf die Immunevasion des Burkitt Lymphoms. In diesem Zusammenhang wurde die Erkennung und das Abtöten von EBV-positiven und -negativen BL-Linien durch antigenspezifische zytotoxische T-Zellen untersucht und die Bedeutung der IFN γ -Resistenz bzw. -Suszeptibilität für die Immunerkennung studiert. Es ist bereits bekannt,

dass EBV-positive BL-Linien trotz der Expression von Fremdanigen vom Immunsystem nicht erkannt werden (Lee et al., 2004; Rooney et al., 1985). Diese Linien weisen dabei Defekte in der Prozessierung und Präsentation viraler Antigene auf. Es konnte demonstriert werden, dass *c-myc* als Proto-Onkogen maßgeblich an diesem Prozess beteiligt ist, indem es unter anderem den Interferon- und den NF κ B-Signalweg negativ beeinflusst (Schlee et al 2007). Die durch die Aktivierung des Proto-Onkogens *c-myc* beobachtete Suppression der Interferon-Induktion könnte eine rationale Basis für einen neuen, viel versprechenden Ansatz in der Tumorthherapie liefern, nämlich den Einsatz von onkolytischen Viren. Dabei macht man sich zunutze, dass die Interferonantwort in vielen Arten von Tumorzellen beeinträchtigt ist, was zu einer selektiven Virusvermehrung in Tumorzellen und Destruktion der Tumorzellen führt. Normale Zellen sind gegen Virusausbreitung und Zellyse durch ein funktionierendes Interferonsystem geschützt (Parato et al., 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum Phänomen der IFN γ -Resistenz in EBV-positiven BL-Linien zeigen, dass es neben der Wirkung von c-Myc auf das Interferon- und NF- κ B System eine weitere Ebene der Komplexität geben könnte und dass mit der beobachteten IFN γ -Resistenz ein weiterer, möglicherweise noch wichtigerer Mechanismus der Immunevasion zum Tragen kommt. Demnach würde die Präsentation viraler Antigene zwar in den Tumorzellen durch die Überexpression von c-Myc abgeschwächt oder unterbunden, die IFN γ -Resistenz würde aber die Tumorzellen zusätzlich vor einem Angriff von antigenspezifischen T-Zellen schützen, wenn es durch die Phagozytose von toten Tumorzellen durch Makrophagen zu einer Kreuzpräsentation viraler Antigene gekommen ist. Makrophagen, die tote Tumorzellen phagozytieren sind ein typisches Merkmal des Burkitt Lymphoms, sie bilden den sogenannten „Sternenhimmel“.

Die Analyse zur Erkennung und Abtötung der BL-Linien durch antigenspezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) wurde mit zwei EBV-positiven und zwei EBV-negativen BL-Linien durchgeführt (EBV-negative Linien dienten als Positivkontrolle). Die Beladung dieser Zellen mit Peptiden, die keine Prozessierung für die Präsentation an der Oberfläche benötigen, zeigte, dass die eingesetzten CTL spezifisch für diese Peptide waren und die Zellen effektiv töten konnten. In den Zellen, die durch die Infektion mit rekombinanten Vakzinia-Viren zur Expression von viralen Antigenen gebracht wurden, war kein solcher Effekt zu beobachten. Jedoch war die fehlende Erkennung der BL-Zellen nach IFN γ -Behandlung, wie es der Hypothese der Rolle der IFN γ -Resistenz in der Immunevasion EBV-positiver BL-Zellen entsprechen würde, nicht auf EBV-positive BL-Linien beschränkt. Vielmehr wurden auch EBV-negative BL-Zelllinien nach Expression von Fremdanigenen und IFN γ -

Behandlung nicht erkannt und getötet. Jedoch wurden die Zellen von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen erkannt, wenn sie mit dem entsprechenden Peptid beladen wurden. Da aktivierte T-Zellen nicht nur IFN γ , sondern auch den CD40-Liganden (CD40L) auf der Oberfläche exprimieren, wurde als nächstes geprüft, ob IFN γ und CD40-Ligation synergistisch auf die Antigenpräsentation wirken. Als Maß für die Wirkung von IFN γ und des CD40L wurde die Expression der Peptidtransporter-Untereinheiten TAP1 und TAP2 sowie einer Reihe von Aktivierungsmarkern und kostimulatorischen Molekülen gemessen. Dabei zeigte sich überraschenderweise kein Synergismus. IFN γ und CD40L induzierten in EBV-negativen BL-Zellen im gleichen Maße unabhängig voneinander die Expression von TAP1 und TAP2, die Kombination beider Stimuli sorgte jedoch nicht für eine höhere TAP1 und TAP2 Expression. Die Induktion der Peptidtransporter-Untereinheiten durch CD40L war dabei unabhängig vom IFN γ -Signalweg. Auch bei der Expression der Oberflächenmarker war kein Synergismus von IFN γ und CD40-Ligation zu beobachten. Vielmehr erwiesen sich sowohl EBV-negative als auch EBV-positive BL-Zellen, was die Induktion der Oberflächenmarker anbetrifft, weitgehend resistent sowohl gegenüber IFN γ als auch CD40L. Diese letzten Ergebnisse zur fehlenden Erkennung von Fremdantigen-exprimierenden EBV-negativen BL-Zellen durch zytotoxische T-Zellen, zur Kooperation von IFN γ und CD40L in EBV-negativen Zelllinien und zur IFN γ -Suszeptibilität versus -Resistenz von EBV-positiven BL-Biopsie-Zellen stellen die Bedeutung der an BL-Zelllinien beobachteten selektiven IFN γ -Resistenz von EBV-positiven BL-Zellen wieder etwas in Frage. Sie deuten vielmehr darauf hin, dass in allen BL-Zellen, EBV-negativen BL-Zellen miteingeschlossen, die Antigenprozessierung und Immunerkennung massiv beeinträchtigt ist. Die allgemeine Beeinträchtigung der Immunerkennung und die Fixierung einer geringen Stimulierbarkeit durch IFN γ ist vermutlich noch wichtiger als die IFN γ -Resistenz EBV-positiver BL-Zellen per se. Es ist in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, dass die niedrige Expression von JAK2, die ja auch das zentrale Thema dieser Arbeit ist, ein wesentliches Merkmal einer molekularen BL-Signatur unabhängig vom EBV-Status des Tumors ist (Dave et al., 2006; Hummel et al., 2006).

3.7 Wirkung von TypI und TypII Interferonen auf die Proliferation von BL-Zellen

Um den Einfluss von TypI und TypII IFN auf die Proliferation von Zellen in Kultur zu testen, wurden jeweils zwei Linien der unterschiedlichen Phänotypen herangezogen (Latenz I, Latenz III und EBV-negativ). Die Behandlung mit TypI IFN zeigte einen Effekt bei einer der

untersuchten EBV-negativen BL. Für die restlichen Linien konnte kein Einfluss festgestellt werden. Die Proliferation nach IFN γ -Behandlung ist nicht von unbehandelten Zellen zu unterscheiden. Demnach hat TypI IFN nur einen geringen Einfluss auf die Proliferation der Zellen, TypII IFN keinen.

3.8 Ausblick

Für den Mechanismus der beobachteten IFN γ -Resistenz in EBV-positiven BL-Linien konnte noch nicht geklärt werden, ob die exprimierte Tyrosin-Kinase JAK2, die in vier der resistenten Zelllinien nachgewiesen werden konnte, eine Mutation aufweist oder ob die Menge an endogen exprimiertem Protein nicht ausreicht, um den Signalweg zu aktivieren. Hierzu bietet sich an, die RNA einiger resistenter Zelllinien zu gewinnen, die JAK2 exprimieren. Aus dieser RNA kann das *jak2*-Gen amplifiziert werden und die Sequenz auf das Auftreten möglicher Mutationen untersucht werden. Sollten keine Mutationen vorhanden sein, kann davon ausgegangen werden, dass die Menge an produziertem Protein für eine Signalweiterleitung nicht ausreicht. Ob die Signalweiterleitung nach Transfektion von JAK2 wieder hergestellt werden kann, soll mit Hilfe von Einzelzellklonen geklärt werden, die aus resistenten Linien etabliert werden. Die Transfektionseffizienz von Burkitt Lymphom-Zellen ist generell gering, was dazu führte, dass für einige Linien keine Ergebnisse nach transientscher Transfektion mit einem JAK2-Expressionsplasmid erzielt werden konnten. Durch die Etablierung von Einzelzellklonen kann sichergestellt werden, dass genug Protein produziert wird, um die Signalweiterleitung zu ermöglichen. Die Aktivität von miRNAs als mögliche Ursache für die epigenetische Stilllegung des *jak2*-Gens könnte durch eine Genexpression-Analyse von sensitiven und resistenten BL-Linien untersucht werden. Dabei könnten durch Mikro-Arrays Unterschiede in der Expression von miRNAs in diesen Linien studiert werden, die dann weiter verfolgt werden könnten.

Ob in EBV-positiven BL-Zellen zusätzlich noch ein weiterer Mechanismus der Immunevasion durch Selektion auf IFN γ -Resistenz *in vivo* zum Tragen kommt, wie die Untersuchungen an EBV-positiven BL-Zelllinien nahe gelegt haben, kann nur durch Untersuchung einer viel größeren Zahl an EBV-positiven Biopsien beantwortet werden.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Reagenzien

Tabelle 3: Eingesetzte Materialien

ABgene, UK	PCR-Reaktionsgefäße
BectonDickinson (BD) GmbH, Heidelberg, Deutschland	Plastik-Reaktionsgefäße 15 und 50 ml, 6-, 12-, 24-, 48-, 96-Loch-Platten, Antikörper für Western-Blots und FACS
BioRad, Hercules, USA	Gene Pulser Küvette, 0,4 cm Elektrode, Elektroporator, Power-Supply für Western-Blots
Biosource, USA	Antikörper für Western-Blots
Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland	Antikörper für Western-Blots
Costar, Corning Incorporate, Schiphol-Rijk, Niederlande	Reagent Reservoir 50 ml aus Polysteryol
Christiansen GmbH, Planegg, Deutschland	Hyperfilm-ECL Cawomat 2000 IR Tiscentwicklermaschine
Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Tischzentrifuge 5415 Reaktionsgefäße verschiedener Größe BioPhotometer
Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland	Restriktionsenzyme Proteinmarker 1 kb DNA-Marker
Fluka, Steinheim, Deutschland	Trypanblau
GE Healthcare, Freiburg, Deutschland	ECL-Western Blotting Reagenzien Hyperfilm-ECL Hybond-ECL Nitrozellulose Membran Hybond-P PVDF-Membran
Genomed, Bad Oeyenhausen, Deutschland	Maxi-Preparations-Kit für Plasmid-Isolation (Jetstar)
Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland	L-Glutamin, Natrium-Pyruvat, Penicillin/Streptavidin, Trypsin-EDTA (1x), Fungizone, RPMI 1640, DMEM, Optimem
Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	Zellkulturflaschen
Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf, Deutschland	Zytoperm Inkubator, Laminar flow clean Sterilbank Zentrifuge

Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, USA	Mighty Small II Gel Elektrophorese Einheit
Invitrogen Life Technologies, USA	pre-stained Proteinmarker
Jackson ImmunResearch, UK	Antikörper
Metabion, Martinsried, Deutschland	Oligonukleotide
Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland	Ziege-anti-Maus-Beads, MS-Säulen MACS-Separator
Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland	Cryotubes 3 ml, Zellkulturschalen
PAA Laboratories, Pasching, Deutschland	Fötale Kälberserum
PBL Biomedical Laboratories, USA	Antikörper für Western-Blot
Promega	Antikörper für Western-Blot
Qiagen, Hilden, Deutschland	QIAquick Gel Extraktions-Kit, RNeasyMini Kit
Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	Protease Inhibitor, 1st strand cDNA-Synthese-Kit für RT-PCR, LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green1, LightCycler Kapillaren für RT-PCR, LightCycler Gerät
Roth, Karlsruhe, Deutschland	Acrylamid, Milchpulver, Tween 20 für Elektrophorese
Strathmann Biotec, Hamburg, Deutschland	humanes Interferon γ humanes Interferon β

Alle hier nicht aufgeführten Geräte oder Chemikalien werden im Methodenteil erwähnt oder wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma (München, Deutschland) erhalten.

4.1.2 Antikörper für Western-Blot

Tabelle 4: Antikörper für Western-Blot

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Puffer	Bezugsquelle
α -EBNA2	Ratte	1:2 (Überstand)	PBS, 5% Milchpulver	E. Kremmer
α -JAK1	Kaninchen	1:1000	TBS-0,2% Tween, 5%BSA	Cell Signaling
α -JAK2	Kaninchen	1:1000	TBS-0,2% Tween, 5% BSA	Cell Signaling
α -STAT1	Maus	1:1000	TBS-0,2% Tween, 5% BSA	Cell Signaling
α -phospho- STAT1 (Tyr701)	Kaninchen	1:1000	TBS-0,2% Tween, 5% BSA	Cell Signaling
α -phospho- STAT1 (Ser727)	Kaninchen	1:1000	TBS-0,2% Tween, 5% BSA	Upstate Biotechnology

α -TAP1	Maus	1:5 (Überstand)	TBS-0,2% Tween, 5% Milch	R.Tampé
α -TAP2	Maus	1:5 (Überstand)	TBS-0,2% Tween, 5% Milch	R.Tampé
α -Kaninchen HRP	Ziege	1:3000 oder 1:10000	TBS-0,2% Tween, 5% Milchpulver	Biosource
α -Maus HRP	Ziege	1:5000	TBS-0,2% Tween, 5% Milchpulver	Promega

4.1.3 Plasmide

p141CAG-3SIP (von Timm Schröder, gsf)

CMV-Plasmid, kodierende Sequenzen für JAK2 wurden inseriert. Das Plasmid wurde in der Arbeit als pCAG-JAK2 bezeichnet. Es wurde generiert, um JAK2-stabil exprimierende Klone von IFN γ -resistenten Linien etablieren zu können.

pINCO (von Josef Mautner, gsf)

Dieses Plasmid kodiert für den verkürzten humanen Nerve Growth Factor Receptor (Δ NGFR). Es wurde zur späteren MACS-Separation der Zellen mit MIGR-1 kotransfiziert.

MIGR-1 (von Carsten Spiekermann, gsf)

Retrovirales Konstrukt, das für GFP und JAK2 kodiert. Es wurde eingesetzt, um den IFN γ -Signalweg in einigen resistenten BL-Linien wiederherzustellen.

4.1.4 Bakterienstamm

Es wurde folgender *Escherichia coli*-Stamm verwendet:

XL-1blue (Stratagene, USA)

recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10(Tet^r)]

4.1.5 Zelllinien

Alle hier aufgeführten Zelllinien wurden wie unter 4.4.1 beschrieben kultiviert.

Latenz III

EBV-positive BL-Linien in der Latenz III exprimieren ein bestimmtes Set an viralen Proteinen. Eine genaue Beschreibung ist im Abschnitt 1.1.3 zu finden.

Tabelle 5: Liste der LatenzIII-Linien

Name	Latenz	Translokation
BL16	III	t(8;14) endemisch
BL18	III	t(8;14) Nordafrika
Mutu III	III	t(8;14) endemisch
MAK-BL	III	t(8;14) endemisch
BL72	III	t(8;14) endemisch
BL74	III	t(8;14) sporadisch
BL99	III	t(8;22) sporadisch
BL90	III	t(8;22) Nordafrika
BL89	III	t(8;22) Nordafrika
Maku	III	t(8;22) endemisch
KK124	III	t(8;22) sporadisch
PA 682	III	t(8;22) sporadisch
L660	III	t(8;22) sporadisch
Akuba	III	t(8;22) endemisch
BL137	III	t(2;8) sporadisch
BL37	III	t(8;22) sporadisch
BL60	III	t(8;22) Nordafrika
BL61	III	t(2;8) Nordafrika
BL7	III	t(2;8) Nordafrika
JBL2	III	t(2;8) sporadisch
Jijoye	III	t(8;14) endemisch
P3HR1/HH514	III	t(8;14) endemisch
HH543	III	t(8;14) endemisch
Namalwa	III	t(8;14) endemisch
Awia-BL (cl.20)	III	t(8;14) endemisch

Latenz I

BL-Linien mit einem Latenz I-Phänotyp exprimieren nur ein virales Protein, EBNA1, zusätzlich werden kleine nicht polyadenylierte RNAs (EBER1 und 2) exprimiert. Auch hier ist eine genaue Beschreibung des Phänotyps unter 1.1.3 nachzulesen.

Tabelle 6: Liste der LatenzI-Linien

Name	Latenz	Translokation
CHEP-BL	I	t(8;14) endemisch
Daudi	I	t(8;14) endemisch
Elijah	I	t(8;14) endemisch
Rael	I	t(8;14) endemisch
WW2	I	t(8;14) endemisch
WAN-BL	I	t(8;14) endemisch
Akata	I	t(8;14) endemisch
Mutu I	I	t(8;14) endemisch
BL29	I	t(8;14) endemisch
Sav-BL	I	t(8;14) endemisch

EBV-negativ

Diese Linien zeigen die charakteristische Chromosomentranslokation des Burkitt Lymphom, sind jedoch nicht mit dem Epstein-Barr Virus infiziert.

Tabelle 7: Liste der EBV-negativen Linien

Name	Translokation
BL31	t(8;14) sporadisch
BL40	t(8;14) sporadisch
BL41	t(8;14) sporadisch
DG 75	t(8;14) sporadisch
BL33	t(8;22) sporadisch
BL49	t(8;22) sporadisch
Ramos	t(8;14) sporadisch
Louckes	t(8;14) sporadisch
CA46	t(8;14) sporadisch
BL2	t(8;22) sporadisch
Awia-BL cl.5e10	t(8;14) endemisch

BL-Linien Konvertanten

Diese Zelllinien wurden durch Infektion von EBV-negativen BL mit rekombinantem EBV generiert (Calender et al., 1987)

Tabelle 8: Liste der Konvertanten

Konvertanten	Translokation
BL31/B95-8	t(8;14) sporadisch
BL31/P3HR1	t(8;14) sporadisch
BL40/B95-8	t(8;14) sporadisch
BL40/P3HR1	t(8;14) sporadisch

EBV-Verlust-Mutanten

Es konnte bei drei Latenz I BL-Linien beobachtet werden, dass einige Zellen in Kultur das EBV-Genom verlieren. Diese Zellen wurden ausplattiert und weiter kultiviert. Sie behalten den entwickelten EBV-negativen Phänotyp (Kitagawa et al., 2000; Nanbo et al., 2002; Shimizu et al., 1994).

Tabelle 9: Liste der EBV-Verlust-Mutanten

EBV-Verlust-Mutanten	Translokation
Akata	t(8;14) endemisch
Daudi	t(8;14) endemisch
Mutu	t(8;14) endemisch

EBV-Reinfektions-Mutanten

Die oben beschriebenen Verlust-Mutanten wurden wieder mit rekombinantem EBV infiziert (Komano et al., 1999).

Tabelle 10: Liste der Reinfektionsmutanten

Reinfektionsmutanten	Translokation
Akata EBV/GFP	t(8;14) endemisch
Mutu EBV/GFP	t(8;14) endemisch
Daudi EBV/GFP	t(8;14) endemisch

Lymphoblastoide Zelllinien (LCL)

Wie ebenfalls in Abschnitt 1.1.3 beschrieben kann EBV *in vitro* jede B-Zelle infizieren und zur Proliferation anregen. Diese Zellen werden als Lymphoblastoide Zellen (LCL) bezeichnet.

Tabelle 11: Liste der LCL

LCL	Translokation
LCL-JM	t(8;14) endemisch
IARC 304	t(8;14) endemisch
IARC 171	t(8;14) endemisch
IARC 522	t(8;14) endemisch
EBV 1.25	t(8;14) endemisch
EBV 1.11	t(8;14) endemisch
Awia-LCL	t(8;14) endemisch
Sal tr-LCL	t(8;14) endemisch
Oku tr-LCL	t(8;14) endemisch
Ava trLCL	t(8;14) endemisch

Biopsien von Burkitt Lymphomen

Biopsie-Material wurde aus dem Patienten entnommen und schockgefroren.

Tabelle 12: Liste der Biopsien

Biopsie	Translokation
Onziru	t(8;14) endemisch
Sav	t(8;14) endemisch
Tamule	t(8;14) endemisch
Silva	t(8;14) endemisch
Emuikia	t(8;14) endemisch
Glor	t(8;14) endemisch
Yume	t(8;14) endemisch

CD40L

Maus-Fibroblasten L-Zelllinie, die nach Transfektion humanen CD40-Liganden exprimieren und adhärent wachsen (Garrone et al., 1995).

LTK- (von Bettina Kempkes, gsf)

Kontrollzelllinie zu den CD40L-exprimierenden Zellen, ebenfalls Fibroblasten.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 DNA-Präparation und Analyse

4.2.1.1 Isolation von DNA aus Burkitt Lymphom-Zellen

Für die Isolierung von DNA aus Zellen wurden ca. 3×10^6 Zellen für 4 min bei 1400 rpm sedimentiert und mit PBS gewaschen. DNA wurde mittels des QiaAMP-Extraktions-Kit (Qiagen, Hilden) aus den Zellen präpariert. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

4.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe dieser Methode lassen sich spezifisch DNA-Fragmente amplifizieren. Für die Reaktion benötigt man eine DNA-Matrize, zwei Primer-Oligonukleotide, die die zu amplifizierende Sequenz auf den komplementären Strängen flankieren, freie Nukleotide und hitzebeständige DNA-Polymerase. Ein Inkubationsprogramm aus mehreren Zyklen von DNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung und DNA-Synthese sorgt für die Amplifizierung des DNA-Fragments.

Als Negativkontrolle wurde parallel zu jeder PCR-Reaktion das gleiche Reaktionsgemisch ohne Matrizen-DNA angesetzt. So konnte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass die Amplifikation des erhaltenen Fragments auf eine Verunreinigung mit Fremd-DNA zurückzuführen war. Die PCR-Produkte wurden bei 4°C gelagert.

Die benutzten Primer-Oligonukleotide wurden von Metabion (München) bezogen und sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Je nach Notwendigkeit kann zwischen verschiedenen DNA-Polymerasen gewählt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Klonierung von JAK2 in den Vektor p141CAG-3SIP die SAWADY Pwo-DNA-Polymerase (PeqLab, Erlangen) benutzt.

Für die PCR-Reaktion wurde folgendes Reaktionsgemisch angesetzt:

Matrizen-DNA	1 µg
je Primer 100 pmol/µl	0,4 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
Pwo-Polymerase (10 U/µl)	1,5 µl
10x Puffer	2,5 µl

DMSO	0,5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	4 µl
H ₂ O auffüllen auf	50 µl

Die PCR-Reaktion vollzog sich in einer PCR-Maschine (Biometra) mit folgender Temperaturabfolge bei 33 Zyklen:

Start	95°C	für 5 min
zyklische Denaturierung	94°C	für 45 s
zyklische Anlagerung	55°C	für 45 s
zyklische Verlängerung	72°C	für 5 min
finale Verlängerung	72°C	für 10 min

Tabelle 13: Oligonukleotide zur Amplifizierung von JAK2

Name	Sequenz 5'-3'	Anlagerungstemperatur
hJAK2 fw	GAT CCA ATT GCC ATG GGA ATG GCC TGC CTT AC	61°C
hJAK2 rv	GTA CCA GCT AGC TCA TCC AGC CAT GTT ATC CCT	61°C

4.2.1.3 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte in 1-1,5% Agarosegelen in 1x TAE-Puffer. Zur späteren Erkennung von DNA-Banden wurde der verflüssigten Agarose Ethidiumbromid (0,05 µg/ml) zugesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1x DNA-Probenpuffer versetzt, die Laufspannung lag bei etwa 80 V. Nach der Auftrennung wurden die Banden über einen UV-Illuminator detektiert und das Gel mit einer CCD-Kamera (Kappa, Gleichen) fotografiert.

1x TAE: 2 M Tris/HCl; 0,57% Eisessig; 50 mM EDTA; pH 8,0

6x DNA-Probenpuffer 30% Glycerin; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol

4.2.1.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA wurde in dem vom Hersteller des Enzyms empfohlenen Puffer durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl. Für die Spaltung wurden 1-5 U Enzym pro µg DNA eingesetzt. Der Ansatz wurde mindestens 1 h bei 37°C inkubiert.

4.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden dephosphorylierte Plasmid-DNA und Insert-DNA in einem 1%-Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Banden auf einem UV-Illuminator (Herolab) aus dem Gel präpariert. Anschließend wurde die DNA aus den Gelstücken mittels eines Gelextraktions-Kits von Qiagen präpariert. Die DNA-Mengen wurden mit Hilfe des verwendeten DNA-Markers (Promega, Mannheim) abgeschätzt. Im Ligationsansatz wurde ein etwa dreifacher molarer Überschuss an Insert gegenüber Vektor eingesetzt. Es wurde die T4-DNA-Ligase mit dem vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlenen Puffer verwendet. Der Reaktionsansatz wurde für mindestens 2 h bei RT inkubiert.

4.2.1.6 Transformation von Bakterien

Zur Transformation wurden 100 µl der auf Eis aufgetauten Bakterien mit 10 µl des Ligationsansatzes 30 min auf Eis und 2 min bei 42°C (Hitzeschock) inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium erfolgte zur Regeneration der Bakterien eine 45-minütige Inkubation bei 37°C. Die Bakterien wurden 2 min bei 7000 rpm abzentrifugiert und in 50 µl LB-Medium auf eine LB-Platte (LB-Medium mit 1,2% Agar und geeignetem Antibiotikum) ausgestrichen. Diese Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.1.7 Plasmidaufarbeitung

Die präparative Miniplasmidaufarbeitung erfolgte mittels des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Zur Präparation größerer Mengen an DNA wurde das JetStar-Kit (JetStar) herangezogen. Auch hier wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

4.2.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde fotometrisch über Messung der OD₂₆₀ bestimmt. Hierbei entsprechen 50 µg Doppelstrang-DNA einer OD₂₆₀ von 1 (Sambrook et al., 1989).

4.2.2 VDJ-Rekombination

Der Verwandtschaftsnachweis der Zelllinie Mutu in der Latenz I und Latenz III erfolgte über eine PCR, bei der die Rekombination der V-,D- und J-Gene beider Zelllinien überprüft wurde. Es wurden jeweils ca. 6×10^6 Zellen von MutuI und MutuIII eingesetzt und daraus mit Hilfe des QiaAmp-Extraktions-Kit DNA isoliert und in 200 μ l AE-Puffer aufgefangen. Dies erfolgte mit dem Protokoll für Blood and Body Fluid von Quiagen. Für die PCR wurde ein Mix von V_H -Primern und J_H -Primern eingesetzt, der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

DNA	15 μ l (von obigem Extrakt)
10x Puffer	5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	3,5 μ l
dNTPs (10 mM)	1 μ l
V_{H1-6} (2,5 pmol/ μ l)	je 2,5 μ l
5' J_H -Mix	2,5 μ l
H ₂ O	auf 50 μ l auffüllen
Denaturierung für 2 min bei 95°C	
Hinzufügen von Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	1 μ l

Die PCR-Reaktion vollzog sich in einer PCR-Maschine (Biometra, Göttingen) mit folgender Temperaturabfolge bei 45 Zyklen:

95°C	50 s
61°C	30 s
72°C	45 s
finale Anlagerung 72°C	10 min

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel wie unter 4.2.1.5 beschrieben präpariert. Anschließend wurden die Stücke sequenziert und über das Programm Chromas analysiert. Mit Hilfe von Blast konnte geprüft werden, ob die getesteten Linien die gleiche Ursprungszelle besitzen.

Tabelle 14: Oligonukleotide für die VDJ-Rekombination

Name	Sequenz 5'-3'	Anlagerungstemperatur
VH1	CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG A	61°C
VH2	GTC CTR CGC TGG TGA AAC CCA CAC A	61°C
VH3	GGG GTC CCT GAG ACT CTC CTG TGC AG	61°C
VH4	GAC CCT GTC CCT CAC CTG CRC TGT C	61°C
VH5	AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG ARG A	61°C
VH6	ACC TGT GCC ATC TCC GGG GAC AGT G	61°C
JH1	ACC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT	61°C
JH2	ACC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT	61°C
JH3	ACC TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT	61°C
JH4	ACC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT	61°C
JH5	ACC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT	61°C
JH6	ACC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT	61°C

4.2.3 Techniken zur Isolation und Analyse von RNA

4.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung humaner Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini-Kits (Qiagen, Hilden), dabei wurde gemäß des vorgeschriebenen Protokolls vorgegangen.

Es wurden in der Regel 3×10^6 Zellen eingesetzt; die eluierte RNA wurde in 30-50 µl RNase-freiem H₂O aufgefangen und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Kontrolle der Qualität der RNA wurde eine Gelelektrophorese mit einem 1%-Agarosegel (1x MOPS, 5% Formaldehyd) durchgeführt. Die Konzentration der RNA wurde in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Das Verhältnis von 260 zu 280 nm gibt die Reinheit der RNA wieder.

4.2.3.2 Herstellung von cDNA

RNA kann mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) mittels ihrer RNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität in cDNA transkribiert werden. Zur Synthese der cDNA wurde 1µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des 1st Strand cDNA-Syntheset-Kit (Roche, Mannheim). Die hier enthaltenen Oligo(dT)₁₅-Primer dienten der spezifischen Umschreibung der mRNA-Moleküle. Der Reaktionsansatz wurde zur Anlagerung der Primer für 10 min bei 25°C inkubiert. Anschließend erfolgte die reverse

Transkription bei 42°C für 1 h. Die Inaktivierung der RT erfolgte durch Erhitzen auf 99°C für 5 min. Die erhaltenen cDNA-Moleküle wurden bei -20°C gelagert und in die quantitativen RT-PCR-Reaktionen eingesetzt.

Der Reaktionsansatz für eine cDNA-Synthese setzte sich wie folgt zusammen:

RNA	1 µg
10x Puffer	2 µl
dNTP-Mix	4 µl
Oligo-p(dT) ₁₅ Primer	2 µl
RNase Inhibitor	1 µl
AMV Reverse Transkriptase	0,8 µl
H ₂ O	auf 20 µl auffüllen

4.2.3.3 Quantitative RT-PCR

Die quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) mit der LightCycler-Methode nach Roche ist eine PCR-Reaktion, die mit einer Faststart Taq DNA-Polymerase und dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green 1 arbeitet, der spezifisch an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet. Die Taq-Polymerase ist mit hitzelabilen Blockgruppen modifiziert und somit bei Raumtemperatur inaktiv. Durch Erhitzen auf 95°C wird die Reaktion gestartet. SYBR Green 1 ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der sich spezifisch an die kleine Furche der dsDNA anlagert und dessen Fluoreszenz durch diese Bindung um das 100-fache gesteigert wird. Die Intensität des Fluoreszenz-Signals ist somit direkt proportional zur Menge an amplifizierter dsDNA. Das emittierte Fluoreszenzsignal wird nach jedem Zyklusende (nach Beendigung der Elongationsphase) gemessen. Dies ermöglicht, die Amplifikation der DNA in Echtzeit am Monitor zu beobachten. Anhand der Menge der amplifizierten DNA können Rückschlüsse auf die Menge der cDNA, die sich zu Beginn in der untersuchten Probe befand und spezifisch von den Primern erkannt wurde, gezogen werden. Zur Überprüfung der Spezifität wird das amplifizierte Produkt aufgeschmolzen, woraus sich eine spezifische Schmelztemperatur ergibt. Die Schmelzkurve spiegelt die Basenzusammensetzung eines bestimmten DNA-Produktes wider und lässt die Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Amplifikationsprodukten zu. Zusätzlich kann das Produkt mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und seine Spezifität anhand der Größe ermittelt werden.

Für die LightCycler-Reaktion wurden Primer eingesetzt, die -soweit möglich- exonübergreifend waren, um zu vermeiden, dass eventuelle Verunreinigungen mit

genomischer DNA Amplifikationsprodukte bilden. Die benutzten Primer-Oligonukleotide wurden bei Metabion (München) bezogen.

Die PCR-Reaktionen wurden in Glaskapillaren (Roche) in einem LightCycler (Roche) mit folgender Temperaturabfolge in 55 Zyklen durchgeführt:

Denaturierung der DNA

und Aktivierung der Polymerase	95°C	für 10 min
Zyklische Denaturierung	95°C	für 1 s
Zyklische Anlagerung	59-67°C	für 10 s
Zyklische Verlängerung	72°C	für 4 s pro 100 bp
Aufschmelzen	70°C bis 97°C	in 10 s
Abkühlen	40°C	für 15 s

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

cDNA-Matrize (1:10)	1 µl
Roche-Mix	1 µl
25 mM MgCl ₂	0,8 µl
je Primer (10 mM)	0,5 µl
H ₂ O	6,7 µl

Tabelle 15: Oligonukleotide für qRT-PCR

Name	Sequenz 5'-3'	Anlagerungstemperatur
hJAK1fw	TGC ACA GGC ATG CCG TAT CTC TC	65°C
hJAK1rv	TCC AGT GAG CTG GCA TCA AGG AG	65°C
hJAK2fw	ACA GGG ATC TGG CAA CGA GA	59°C
hJAK2rv	TCT GGG CAT CCA TCT GGT CT	59°C
hIFN _γ RIfw	GAT TCA GTG CCA GTT AGC GAT TCC AG	67°C
hIFN _γ RIrv	AAA TGG CTG GTA TGA CGT GAT GAG TG	67°C
hIFN _γ RIIfw	GCT GCT GCT GCT CGG AGT CTT C	67°C
hIFN _γ RIIrv	TGG CGG CAG TGA AGT CAC ACT C	67°C
hCD19fw	CTC CTT CTC CAA CGC TGA GT	65°C
hCD19rv	TGG AAG TGT CAC TGG CAT GT	65°C

Die entstandenen PCR-Produkte wurden zur Erstellung einer Eichgerade seriell verdünnt, um später die Effizienz dieser PCR-Reaktion errechnen zu können. Folgende Verdünnungsserie wurde erstellt: 10^{-3} ; 10^{-5} ; 10^{-7} ; 10^{-9} , Wasser diente als Negativkontrolle. Während der Amplifikation nimmt die Fluoreszenz des Reaktionsansatzes mit steigender Zykluszahl zu. Diese Fluoreszenz-Zunahme wird von dem LightCycler gemessen und in einem Graphen dargestellt (Abbildung 24A). Das LightCycler-Programm ermittelt aus dieser Amplifikationskurve den Crossing Point (Cp), der die Anzahl der Zyklen angibt, die nötig sind um eine definierte Menge an PCR-Produkt zu erzeugen.

Durch das Auftragen des Logarithmus der Konzentration gegen die Anzahl der Zyklen, die nötig waren, den Cp zu erreichen erhält man die Eichgerade (Abbildung 24B). Die Effizienz (E) der Reaktion errechnet sich mit Hilfe der Steigung (m) der Eichgeraden mit folgender Formel:

$$E = 10^{-1/m}$$

Um die Menge an Zieltranskript quantifizieren zu können, wurde die relative Quantifizierungsmethode angewendet, die auf der relativen mRNA-Expression eines Zielgens im Vergleich zu einem Referenzgen basiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Gene auf CD19 standardisiert.

Wenn nun K die Anzahl der PCR-Produkte darstellt, die am Cp präsent sind, T_0 die Ausgangskonzentration der Probe und Cp die Anzahl der Zyklen, die nötig sind um die definierte Menge an PCR-Produkt zu erhalten, dann ergibt sich folgende Gleichung:

$$K = T_0 (E)^{Cp}$$

Da die Menge an PCR-Produkt am Cp für alle Proben gleich ist, ergibt sich:

$$T_{0\text{gesucht}} \times (E_{\text{gesucht}})^{Cp_{\text{gesucht}}} = T_{0\text{Referenzgen}} \times (E_{\text{Referenzgen}})^{Cp_{\text{Referenzgen}}}$$

Im Falle der Kopienzahlbestimmung ist T_0 des Referenzgens bekanntermaßen 1 oder 2 je nach Geschlecht, da es sich um den genomischen Locus von HPRT handelt. Setzt man dies in die Formel ein und löst nach der gesuchten Ausgangskopienzahl auf, ergibt sich folgendes:

$$T_{0\text{gesucht}} = (x^2)$$

Zur Ermittlung der relativen mRNA-Expression wurde T_0 des Referenzgens gleich 100% gesetzt, so dass sich folgende Formel ergibt:

$$T_{0\text{gesucht}} = 100 \times (E_{\text{Referenzgen}})^{Cp_{\text{Referenzgen}}} / (E_{\text{gesucht}})^{Cp_{\text{gesucht}}}$$

Die Auswertung wurde mithilfe der Excel-Software (Microsoft) durchgeführt.

A)

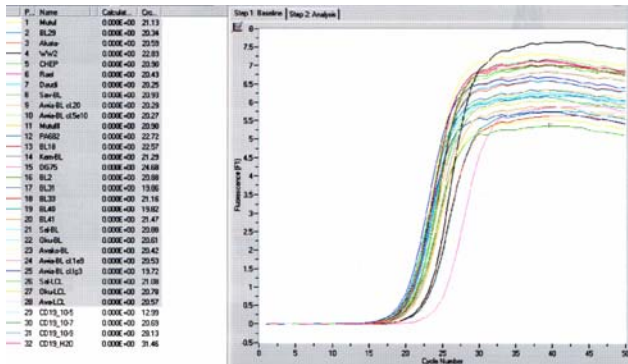
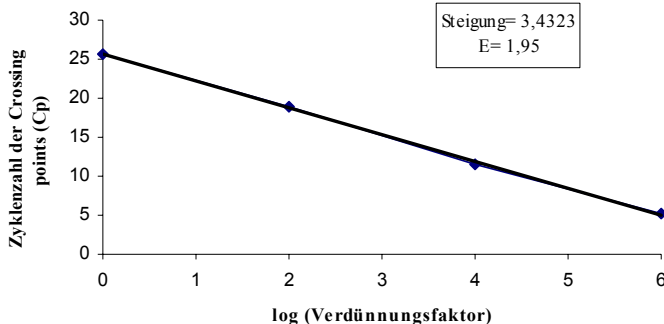


Abbildung 24: qRT-PCR Effizienz und Standardisierung auf CD19

A) Das Diagramm zeigt die Fluoreszenzkurven, die während der PCR in „Real Time“ gemessen werden für das Transkript von CD19 an. Die Kurven geben die markierten Proben auf der linken Seite wieder. Am Crossing Point (Cp) überschreitet das Fluoreszenz-Signal das Hintergrund-Signal. Ein beinahe simultaner Anstieg der Kurven und die sehr ähnlichen Cps deuten auf eine gleiche Ausgangsmenge des Zieltranskripts in allen Proben hin.

B)



B) Für jeden LightCycler-Lauf wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} und 10^{-9}) mitgeführt, um die Effizienz der Reaktion zu bestimmen. Die Crossing Points (Cp) wurden gegen den Verdünnungsfaktor (logarithmiert) aufgetragen und die Steigung der Gerade in die Berechnung der Effizienz wie folgt einbezogen: $E = 10^{(1/m)}$ m (Steigung)

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Isolation und Aufbereitung von Proteinen aus Zellen

Für die Isolierung von Proteinen wurden mindestens 1×10^6 Zellen für 4 min bei 1400 rpm sedimentiert und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in $20 \mu\text{l}$ 2x Laemmli pro 10^6 Zellen lysiert und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben mit Ultraschall (20 Stöße pro Probe) behandelt, um die zelluläre DNA zu zerkleinern.

Falls erforderlich wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2x Laemmli-Probenpuffer: 4% SDS; 20% Glycerin; 250 mM Tris pH 6,8; 5% β -Mercaptoethanol; 0,01% Bromphenolblau

4.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE. Dafür wurden 10-15% SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gele hergestellt und mit 10-15 µl der Protein-Lysate beladen. Das Gießen und der Lauf der Gele erfolgte in einem Gelsystem von Amersham. Als Größenstandard diente ein Proteinstandard (Fermentas), dessen Proteine kovalent an einen Farbstoff gebunden sind, um sie sichtbar zu machen (Abbildung 26). Vor der Auftragung auf das Gel wurden die mit 2x Laemmli-versetzten Proben für 5 min aufgeköcht.

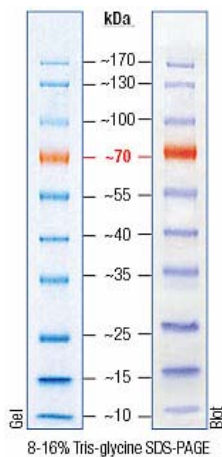


Abbildung 25: Proteinstandard

Die Proteine sind kovalent an einen Farbstoff gebunden, um sie sichtbar zu machen.

Laufpuffer: 25 mM Tris; 1% SDS; 192 mM Glycin

Sammelgel: 250 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 5% Acrylamid/Bisacrylamid (Roth)

10%iges Trenngel: 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 10% Acrylamid/Bisacrylamid (Roth)

4.3.3 Western-Blot

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)- oder Nitrozellulose-Membran (beide GE Healthcare, Freiburg) transferiert. Der Transfer erfolgte in einem Tanksystem („Nass-Blot“) von GE-Healthcare, in dem die gesamte Blotvorrichtung mit Puffer gefüllt ist. Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer equilibriert. Die Nitrozellulose-Membran wurde nur in Puffer equilibriert. Die Membran wurde auf zwei in Transferpuffer getränkte Gelblotting-Papiere (Whatman) gelegt. Das Acrylamidgel wurde auf die Membran gelegt, anschließend wurden erneut zwei in Transferpuffer getränkte Gelblotting-Papiere darauf platziert. Dieser Aufbau wurde so zwischen Anode und Kathode angeordnet, dass die negativ geladenen Proteine in Richtung Membran wandern können.

Es wurde für 1,5 h unter ständigem Rühren ein elektrisches Feld von 450 mA angelegt. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran anschließend mit 1x Ponceau S (Sigma, München) gefärbt. Für die weitere Analyse wurde die Ponceau S-Färbung mit 1x TBS entfernt.

Transferpuffer: 250 mM Tris; 1,92 mM Glycin; 10% Methanol

10x TBS: 5 M NaCl; 1 M Tris/HCl pH 7,5

4.3.4 Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörper

Proteine konnten durch Bindung spezifischer Antikörper (AK) sichtbar gemacht werden. Der Proteinnachweis erfolgte über zwei Antikörper. Der Primärantikörper erkennt das gewünschte Protein und bindet daran; zur Detektion wird ein sekundärer AK eingesetzt, der spezifisch den Primärantikörper erkennt und bindet. An diesen sekundären AK ist das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) gekoppelt. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol und setzt dadurch eine Chemolumineszenzreaktion frei. Das hierdurch emittierte Licht kann durch die Exposition eines lichtsensitiven Films (Hyperfilm ECL, GE-Healthcare) nachgewiesen werden.

Zur Absättigung freier Bindungsstellen der Membranen wurden sie bei Raumtemperatur mit 20% Milchpulver (Roth) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in TBST-5% BSA über Nacht bei 4°C. Bevor die Membran mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert wurde, wurde sie dreimal 5 min mit TBST gewaschen, um schlecht oder nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Der gleiche Waschschritt erfolgte nach der Inkubation mit dem sekundären AK. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe des ECL-Kits bzw. des ECL Advance™ Western Blotting Detection Kits (beide GE-Healthcare). Die für die Immundetektion benutzten Antikörper und ihre Verdünnungen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

4.3.5 Strippen von Antikörper-beladenen Membranen

Während des sogenannten Strippens der Membran wird nicht elektrotransferiertes, auf der Membran befindliches Protein (Block-Proteine, Antikörper) entfernt. Die mit Proteinen und Antikörpern beladene Membran wurde hierfür 30 min bei 55°C in „Stripping-Puffer“ im Schüttelinkubator behandelt und anschließend dreimal 15 min in TBST gewaschen. Danach konnte erneut wie in 1.3.4 beschrieben eine immunologische Detektion durchgeführt werden.

Stripping-Puffer: 100 mM β -Mercaptoethanol; 2% SDS; 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7

4.4 Zellkultur

4.4.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Umluft-Sterilbank (Heraeus, Düsseldorf) durchgeführt. Falls nicht anders beschrieben wurden die Zellen bei Zentrifugationsschritten bei 1400 rpm für 4 min zentrifugiert. Die Waschschrte wurden mit sterilem PBS oder RPMI, 10% FKS durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus, Düsseldorf) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden zweimal in der Woche gefüttert bzw. gesplittet.

Vollmedium für Burkitt Lymphom-Zellen:

500 ml RPMI 1640 Medium (Gibco, Paisley, Schottland)

57 ml FKS (PAA, Pasching, Österreich)

5,7 ml Penicillin/Streptomycin (100x) (Gibco)

5,7 ml Glutamin (100x) (Gibco)

5,7 ml Natrium-Pyruvat (100x) (Gibco)

50 µM α-Thioglycerat (TG)

Die Selektion der stabil transfizierten BL-Linien erfolgte durch Zugabe von 0,4 µg/ml Puromycin zum Medium.

4.4.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte lichtmikroskopisch mit Hilfe von Neubauer-Zählkammern (Marienfeld, Lauda-Königshofen), wobei 4 x 16 Kleinquadrate unter dem Mikroskop (Zeiss, Jena) ausgezählt und deren Mittelwert bestimmt wurde. Der Kammerfaktor zur Berechnung der Zelldichte (Zellen/ml) beträgt 10⁴, da das Volumen von 16 Kleinquadraten 0,1 µl umfasst.

4.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen in Einzelzellsuspension gebracht, zentrifugiert und in kaltem Einfriermedium (40% Medium, 10% DMSO, 40% FKS) resuspendiert. Die Zellen im Einfriermedium wurden in Einfrier-Röhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) überführt und zunächst bei -80°C eingefroren. Nach einigen Tagen wurden sie zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Um ein zu schnelles Einfrieren der Zellen zu verhindern was zur Lyse der Zellen führt, wurden die Röhrchen dick in Zellstoff eingepackt. Zum Auftauen wurden die Zellen zum Auswaschen des DMSO einmal mit 37°C-warmem Medium gewaschen und anschließend in neuem Medium aufgenommen.

4.4.4 Stimulation der BL-Linien und Biopsien mit IFN γ und IFN β

BL-Linien

Die zu testenden Zellen wurden einen Tag vor der Behandlung mit frischem Medium gefüttert. Je nach Zelldichte wurden zwischen $1-5 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz eingesetzt. Die Ausplattierung der Zellen erfolgte in sterilen Lochplatten (Becton Dickinson, Heidelberg), die Stimulation mit 300 U/ml IFN γ bzw. IFN β für 30 min und 24 h bei 37°C. Dieselbe Anzahl an Zellen wurde als Negativkontrolle unbehandelt belassen. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen in Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt und wie unter 4.3.1 beschrieben für die Analyse durch die Western-Blot-Methode aufbereitet.

Biopsien

Die getesteten Biopsiesuspensionszellen wurden in einer Zelldichte von ca. 4×10^6 ebenfalls mit 300 U/ml IFN γ bzw. IFN β bei 37°C stimuliert. Auch hier wurde ein Teil der Zellen als Kontrolle unbehandelt belassen. Da Zellen aus Biopsien sehr schnell sterben, konnten die Zellen nur für 30 min und 2-6 h mit den Zytokinen inkubiert werden. Die Aufbereitung für die Western-Blot-Methode erfolgte ebenso wie unter 4.3.1 beschrieben.

4.4.5 Behandlung von Akata und MutuI mit 5'-Azacytidin

Um eine mögliche Methylierung des JAK2-Promotors zu testen wurden zwei EBV-positive Latenz I-Linien (Akata und MutuI) mit 5'-Azacytidin (AZA) behandelt. AZA ist ein Cytidin-Analogon, das während der Replikation der Zelle in die DNA oder RNA eingebaut wird. Durch diesen Einbau werden Methyltransferasen gehemmt, was zu einer Demethylierung der betroffenen Sequenz führt.

Es wurden 3×10^5 Zellen pro Loch in eine 12-Loch-Platte ausplattiert und mit 10 μ M 5'-AZA für verschiedene Zeitpunkte behandelt. Zur Kontrolle blieb auch bei dieser Analyse ein Teil der Zellen unbehandelt. Die Ernte und Herstellung von Zelllysaten erfolgte wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben. .

4.4.6 Generierung JAK2 -exprimierender BL-Linien

4.4.6.1 Transiente Transfektion von BL-Zellen

Durch Elektroporation konnte DNA in verschiedene Burkitt Lymphom-Zelllinien eingebracht werden. Es wurden fast immer dieselben Transfektionsbedingungen verwendet (Tab. 6). Pro Transfektionsansatz wurden 2×10^7 Zellen eingesetzt, die am Tag zuvor gefüttert wurden, um eine optimale Proliferation zu erreichen. Die Zellen wurden zentrifugiert, in 300 μ l Opti-MEM (Gibco, Paisley, Schottland) aufgenommen und in eine 4 mm breite „Gene Pulser“-Küvette (Biorad, USA) überführt. Die Transfektion erfolgte mit 10-15 μ g DNA. Direkt nach

der Transfektion wurden 500 µl FKS zu den Zellen gegeben und dieses Gemisch in Vollmedium überführt. Anschließend wurden die Zellen wie üblich bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Mit Hilfe dieser Methode wurden die Plasmide pINCO-NGFR und MIGR1 in die Zellen gebracht.

Tabelle 16: Transfektionsbedingungen der einzelnen Zelllinien

Zelllinie	Medium	Volumen [µl]	µF	Volt
MutuI	Opti-MEM	300	850	250
Akata	Opti-MEM	300	850	250
Elijah	Opti-MEM	300	850	250
Rael	Opti-MEM	300	950	250
BL29	Opti-MEM	300	850	250
WAN	Opti-MEM	300	850	250
WW2	Opti-MEM	300	850	250

4.4.6.2 Isolierung von JAK2-exprimierenden Zellen nach transienter Transfektion

Anfangs lag JAK2 in einem Vektor ohne Selektionsmarker vor. Um nach erfolgter Transfektion die Zellen isolieren zu können, die das Protein exprimieren, wurde das JAK2-Expressionsplasmid MIGR1 mit einem pINCO-Plasmid kotransfiziert. Dieser Vektor enthält eine Sequenz für den humanen NGF-Rezeptor. Mit Hilfe des MACS (Magnetic Associated Cell Sorting)-Systems von Milteny (Bergisch-Gladbach, Deutschland) konnten die JAK2-exprimierenden Zellen über den NGF-Rezeptor isoliert werden, dies geschah nach Angaben des Herstellers. NGFR-positive Zellen wurden mit Hilfe eines Hybridom-Überstandes (Elisabeth Kremmer, GSF, München) detektiert. Die Detektion dieses Erstantikörpers und die Bindung der positiven Zellen erfolgte mittels Microbeads (kleine metallene Kügelchen), die mit Ziege-anti-Maus-Antikörpern gekoppelt waren. So markierte Zellen konnten anschließend über eine Säule isoliert werden. Die Ausbeute an positiven Zellen lag je nach Zelllinie bei 50-70%.

4.4.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Hierfür wurden ca. 5×10^5 Zellen eingesetzt und einmal mit PBS, 0,5% BSA gewaschen. Dieser Schritt erfolgte, um mögliche unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Für die Färbung wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper (PE oder FITC) für mindestens 15 min bei RT inkubiert. Der Antikörper wurde 1:20 in PBS, 0,5% BSA verdünnt. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen wurden die Zellen nach

der Inkubation mit PBS, 0,5% BSA gewaschen und in 100 µl PBS mit 1 µg/ml Propidiumiodid (PI) aufgenommen, um die toten Zellen anzufärben.

Alle Analysen wurden mit einem Durchflusszytometer (Becton Dickinson (BD), Heidelberg) durchgeführt und die Resultate mit der CELLQuestTM-Software ausgewertet. Je Färbung wurden zwischen 1×10^5 und 3×10^5 Zellen aufgenommen.

Tabelle 17: Antikörper für FACS-Analysen

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
NGFR-PE	1:10	BD
CD10-PE	1:20	BD
CD38-PE	1:20	BD
CD80-FITC	1:20	BD
CD86-PE	1:20	BD
HLA-A,B,C	1:20	BD
HLA-DQ,DR, DP	1:20	BD

4.4.8 Kultivierung von LTK⁻- und CD40L-exprimierenden Zellen

LTK⁻- und CD40L-exprimierende Zellen sind adhärente Zellen, die zur späteren Kokultivierung mit Burkitt Lymphom-Zellen in Vollmedium gehalten wurden. Zur Bestimmung der Zelldichte oder zum Splitten mussten die Zellen als Einzelsuspension vorliegen. Zur Vermeidung des proteolytischen Verdaus der Oberflächenmoleküle wurden die Zellen mit Versen (nicht mit Trypsin) vom Boden der Zellkulturschalen gelöst. Der Erhalt der Oberflächenmoleküle war für die spätere Kokultivierung nötig.

Zunächst wurden die Zellen in der Kulturschale (Nunc, Roskilde, Dänemark) nach Abnahme des Mediums mit sterilem PBS gewaschen, bevor sie mit 3 ml Versen versetzt wurden. Nach dreiminütiger Inkubation im Brutschrank, Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 10 ml Medium und durch Klopfen am Kulturschalenboden unterstütztem Loslösen der Zellen, konnten diese in 50 ml Falcons überführt werden. Das Zellpellet wurde nach einmaligem Waschen mit Zellkulturmedium in einem definierten Volumen Medium aufgenommen und verdünnt weiterkultiviert, eingefroren oder zur Kokultivierung eingesetzt.

4.4.8.1 Kokultivierung von Burkitt Lymphom-Zellen mit LTK⁻- und CD40L-exprimierenden Zellen

Zur Kokultivierung wurden 1×10^5 CD40L und 2×10^5 LTK⁻- Zellen pro Loch in eine 6-Well-Platte gegeben. Nach ca. drei Tagen wurden sie zur Vermeidung einer weiteren Expansion mit 7.500 Rad für ca. 120 min bestrahlt. Anschließend wurden $2,5 \times 10^6$ BL-Zellen in 5 ml Vollmedium dazugegeben und kultiviert. Die Kokultivierung erfolgte für 36 h, nach 12 h wurde zu einem Teil der Zellen IFN γ für 24 h zugegeben; ein Teil der Zellen wurde unbehandelt belassen, ein dritter Teil wurde nach 35,5 h für 30 min mit IFN γ behandelt. Anschließend daran wurden die Zellen zur weiteren Analyse behandelt.

4.4.9 ⁵¹Cr-Freisetzungsmessung

Die Zytotoxizität EBV-spezifischer T-Zellen wurde mit Hilfe einer ⁵¹Cr-Freisetzungsmessung ermittelt. Hierbei wird die Freisetzung von Chrom aus den antigen-präsentierenden Zellen als Zeichen der Lyse durch spezifische zytotoxische T-Zellen gewertet. Die Berechnung der spezifischen Lyse erfolgte mit Hilfe der Gleichung:

$$[(E-S)/(T-S)] \times 100$$

Hierbei ist E die Chrom-Freisetzung im Experiment, S die spontane Freisetzung bei Kultivierung der Zellen in Medium und T die maximale Freisetzung nach Zugabe von SDS.

Zytotoxische T-Zellen wurden zu den BL-Zellen im Verhältnis 1:1 eingesetzt.

Vor der Beladung der Zellen mit Chrom wurden Burkitt Lymphom-Zellen mit 300 U/ml IFN γ für 48 h inkubiert und zur Antigenpräsentation mit rekombinanten Vakzinia-Viren über Nacht infiziert. Diese Viren exprimieren verschiedene lytische EBV-Antigene, die von den infizierten Zellen dann an ihrer Oberfläche präsentiert werden können. Als Kontrolle für die Funktionalität der T-Zellen wurden dieselben BL-Zellen zusätzlich mit spezifischen Peptiden für 2 h beladen. Diese Peptide haben den Vorteil, dass sie zur Präsentation nicht prozessiert werden müssen, sondern gleich auf die Zelloberflächen geladen werden. Als Negativkontrolle für die Peptide diente entweder DMSO oder die Peptide gegenseitig. Anschließend wurden die BL-Zellen mit ⁵¹Cr beladen und mit ihren spezifischen zytotoxischen T-Zellen für 5 h inkubiert.

Die Messung der Chrom-Freisetzung erfolgte in einem Packard Cobra Gamma Counter (GMI, USA).

5. Zusammenfassung

Das Burkitt-Lymphom (BL) ist ein sehr aggressiver B-Zell-Tumor, der vor allem in der Kindheit auftritt. Es gibt drei Formen dieses Tumors, die sich durch den geographischen Ursprung und die Assoziation mit einer EBV-Infektion unterscheiden. Wie und ob EBV zu Entstehung und/oder Pathogenese des Tumors beiträgt, ist noch völlig unklar.

Charakteristisch für Burkitt Lymphome - unabhängig ihres geographischen Ursprungs - ist eine Chromosomentranslokation, die zur konstitutiven Überexpression des Proto-Onkogens *c-myc* führt. Sein Genprodukt c-Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der eine große Anzahl biologischer Prozesse reguliert. Bei der Untersuchung des Einflusses von c-Myc auf die Immunerkennung und die Interferon-Signalwege, die die Immunerkennung steuern, konnte die Beobachtung gemacht werden, dass EBV-positive BL-Linien auf IFN γ nicht mit einer Phosphorylierung von STAT1 antworten. In EBV-negativen BL-Linien wird STAT1 dagegen durch IFN γ -Behandlung an Tyrosin 701 phosphoryliert. In dieser Arbeit wurde das Auftreten der IFN γ -Resistenz in EBV-positiven BL-Linien evaluiert. Diese Resistenz wird durch die Abwesenheit der JAK2-Tyrosinkinase des IFN γ -Signalwegs hervorgerufen, die jedoch nicht wie anfangs vermutet durch ein virales Genprodukt verursacht wird. Durch die exogene Expression von JAK2 konnte die Signalweiterleitung wiederhergestellt werden. Studien zur IFN γ -Resistenz von Biopsie-Material lieferten kein klares Bild der *ex vivo*-Situation des Tumors. So zeigen einige Biopsien ebenfalls eine Resistenz, andere aber eine Antwort.

Trotz der Expression von Fremdantigenen werden EBV-positive BL-Zellen nicht vom Immunsystem erkannt. Die IFN γ -Resistenz könnte einer der Mechanismen für die Immunevasion der Tumorzellen sein, da wichtige Gene für die Immunantwort durch IFN γ stimuliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Erkennung und Tötung von EBV-positiven und -negativen BL-Linien durch antigenspezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) untersucht und die Bedeutung der IFN γ -Resistenz für die Immunerkennung studiert. Alle getesteten BL-Linien -unabhängig von ihrem EBV-Status- wurden von den CTL nicht erkannt. Dies kann so interpretiert werden, dass die bereits in EBV-negativen Linien reduzierte Antwort auf IFN γ -wahrscheinlich bedingt durch die reduzierte Expression von JAK2- die Antigenpräsentation bereits so zu beeinträchtigen scheint, dass keine CTL-vermittelte Zelltötung beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die in EBV-positiven BL-Linien fehlende und in EBV-negativen BL reduzierte JAK2-Expression und die darauf beruhende mitunter massive Beeinträchtigung des IFN γ -Signalwegs einen Beitrag zur Immunevasion des Burkitt-Lymphoms leisten könnte.

6. Literaturverzeichnis

- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**, 783-801.
- Allday, M.J., Crawford, D.H. and Griffin, B.E. (1989) Epstein-Barr virus latent gene expression during the initiation of B cell immortalization. *J Gen Virol*, **70** (Pt 7), 1755-1764.
- Andrejeva, J., Childs, K.S., Young, D.F., Carlos, T.S., Stock, N., Goodbourn, S. and Randall, R.E. (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 17264-17269.
- Arora, T., Liu, B., He, H., Kim, J., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Modlin, R.L. and Shuai, K. (2003) PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem*, **278**, 21327-21330.
- Babcock, G.J., Decker, L.L., Volk, M. and Thorley-Lawson, D.A. (1998) EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*, **9**, 395-404.
- Bach, E.A., Aguet, M. and Schreiber, R.D. (1997) The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*, **15**, 563-591.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R. and Pasquinelli, A.E. (2005) Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*, **122**, 553-563.
- Basler, C.F., Mikulasova, A., Martinez-Sobrido, L., Paragas, J., Muhlberger, E., Bray, M., Klenk, H.D., Palese, P. and Garcia-Sastre, A. (2003) The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol*, **77**, 7945-7956.
- Beaufils, P., Choquet, D., Mamoun, R.Z. and Malissen, B. (1993) The (YXXL/I)2 signalling motif found in the cytoplasmic segments of the bovine leukaemia virus envelope protein and Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A can elicit early and late lymphocyte activation events. *EMBO J*, **12**, 5105-5112.
- Bhatia, K.G., Gutierrez, M.I., Huppi, K., Siwarski, D. and Magrath, I.T. (1992) The pattern of p53 mutations in Burkitt's lymphoma differs from that of solid tumors. *Cancer Res*, **52**, 4273-4276.
- Bode, J.G., Ludwig, S., Ehrhardt, C., Albrecht, U., Erhardt, A., Schaper, F., Heinrich, P.C. and Haussinger, D. (2003) IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J*, **17**, 488-490.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. and Howard, J.C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, **15**, 749-795.
- Borza, C.M. and Hutt-Fletcher, L.M. (2002) Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med*, **8**, 594-599.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B. and Cohen, S.M. (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, **3**, e85.
- Brzozka, K., Finke, S. and Conzelmann, K.K. (2005) Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Virol*, **79**, 7673-7681.
- Burkitt, D. (1958) A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg*, **46**, 218-223.
- Cai, X., Schafer, A., Lu, S., Bilello, J.P., Desrosiers, R.C., Edwards, R., Raab-Traub, N. and Cullen, B.R. (2006) Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog*, **2**, e23.
- Calender, A., Billaud, M., Aubry, J.P., Banchereau, J., Vuillaume, M. and Lenoir, G.M. (1987) Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in

- vitro infection of EBV-negative B-lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 8060-8064.
- Casola, S., Otipoby, K.L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J.L., Carroll, M.C. and Rajewsky, K. (2004) B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol*, **5**, 317-327.
- Chee, A.V. and Roizman, B. (2004) Herpes simplex virus 1 gene products occlude the interferon signaling pathway at multiple sites. *J Virol*, **78**, 4185-4196.
- Chen, Y., Wen, R., Yang, S., Schuman, J., Zhang, E.E., Yi, T., Feng, G.S. and Wang, D. (2003) Identification of Shp-2 as a Stat5A phosphatase. *J Biol Chem*, **278**, 16520-16527.
- Chen, Z., Li, Y. and Krug, R.M. (1999) Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J*, **18**, 2273-2283.
- Chene, A., Donati, D., Guerreiro-Cacais, A.O., Levitsky, V., Chen, Q., Falk, K.I., Orem, J., Kironde, F., Wahlgren, M. and Bejarano, M.T. (2007) A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. *PLoS Pathog*, **3**, e80.
- Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. and Shuai, K. (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, **278**, 1803-1805.
- Clemens, M.J. and Elia, A. (1997) The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res*, **17**, 503-524.
- Cohen, J.I. (2000) Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*, **343**, 481-492.
- Cowland, J.B., Hother, C. and Gronbaek, K. (2007) MicroRNAs and cancer. *APMIS*, **115**, 1090-1106.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, **264**, 1415-1421.
- Dauber, B., Heins, G. and Wolff, T. (2004) The influenza B virus nonstructural NS1 protein is essential for efficient viral growth and antagonizes beta interferon induction. *J Virol*, **78**, 1865-1872.
- Dave, S.S., Fu, K., Wright, G.W., Lam, L.T., Kluin, P., Boerma, E.J., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Rosenwald, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K., Gascoyne, R.D., Delabie, J., Rimsza, L.M., Braziel, R.M., Grogan, T.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Dave, B.J., Sanger, W., Bast, M., Vose, J.M., Armitage, J.O., Connors, J.M., Smeland, E.B., Kvaloy, S., Holte, H., Fisher, R.I., Miller, T.P., Montserrat, E., Wilson, W.H., Bahl, M., Zhao, H., Yang, L., Powell, J., Simon, R., Chan, W.C. and Staudt, L.M. (2006) Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med*, **354**, 2431-2442.
- David, M., Chen, H.E., Goelz, S., Lerner, A.C. and Neel, B.G. (1995) Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol*, **15**, 7050-7058.
- Decker, T., Lew, D.J., Mirkovitch, J. and Darnell, J.E., Jr. (1991) Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. *EMBO J*, **10**, 927-932.
- Dong, B. and Silverman, R.H. (1995) 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A. *J Biol Chem*, **270**, 4133-4137.
- Dong, B., Xu, L., Zhou, A., Hassel, B.A., Lee, X., Torrence, P.F. and Silverman, R.H. (1994) Intrinsic molecular activities of the interferon-induced 2-5A-dependent RNase. *J Biol Chem*, **269**, 14153-14158.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Sheehan, K.C., Shankaran, V., Uppaluri, R., Bui, J.D., Diamond, M.S., Koebel, C.M., Arthur, C., White, J.M. and Schreiber, R.D. (2005) A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol*, **6**, 722-729.
- Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T.,

- Fujita, T., Kanakura, Y., Komiya, S. and Yoshimura, A. (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, **387**, 921-924.
- Engels, N., Merchant, M., Pappu, R., Chan, A.C., Longnecker, R. and Wienands, J. (2001) Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) employs the SLP-65 signaling module. *J Exp Med*, **194**, 255-264.
- Epstein, M.A., Achong, B.G. and Barr, Y.M. (1964) Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*, **1**, 702-703.
- Farrar, M.A. and Schreiber, R.D. (1993) The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*, **11**, 571-611.
- Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Ikeda, M., Lemon, S.M. and Gale, M., Jr. (2003) Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*, **300**, 1145-1148.
- Fruehling, S. and Longnecker, R. (1997) The immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Epstein-Barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction. *Virology*, **235**, 241-251.
- Gaidano, G., Ballerini, P., Gong, J.Z., Inghirami, G., Neri, A., Newcomb, E.W., Magrath, I.T., Knowles, D.M. and Dalla-Favera, R. (1991) p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5413-5417.
- Garrone, P., Neidhardt, E.M., Garcia, E., Galibert, L., van Kooten, C. and Banchereau, J. (1995) Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med*, **182**, 1265-1273.
- Gordadze, A.V., Peng, R., Tan, J., Liu, G., Sutton, R., Kempkes, B., Bornkamm, G.W. and Ling, P.D. (2001) Notch1IC partially replaces EBNA2 function in B cells immortalized by Epstein-Barr virus. *J Virol*, **75**, 5899-5912.
- Haller, O., Frese, M. and Kochs, G. (1998) Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Tech*, **17**, 220-230.
- Hofelmayer, H., Strobl, L.J., Marschall, G., Bornkamm, G.W. and Zimmer-Strobl, U. (2001) Activated Notch1 can transiently substitute for EBNA2 in the maintenance of proliferation of LMP1-expressing immortalized B cells. *J Virol*, **75**, 2033-2040.
- Hummel, M., Bentink, S., Berger, H., Klapper, W., Wessendorf, S., Barth, T.F., Bernd, H.W., Cogliatti, S.B., Dierlamm, J., Feller, A.C., Hansmann, M.L., Haralambieva, E., Harder, L., Hasenclever, D., Kuhn, M., Lenze, D., Lichter, P., Martin-Subero, J.I., Moller, P., Muller-Hermelink, H.K., Ott, G., Parwaresch, R.M., Pott, C., Rosenwald, A., Rosolowski, M., Schwaenen, C., Sturzenhofecker, B., Szczepanowski, M., Trautmann, H., Wacker, H.H., Spang, R., Loeffler, M., Trumper, L., Stein, H. and Siebert, R. (2006) A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*, **354**, 2419-2430.
- Ikeda, H., Old, L.J. and Schreiber, R.D. (2002) The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*, **13**, 95-109.
- Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Matsumoto, W., Opavsky, A., Cheng, M., Welstead, G., Griffiths, E., Krawczyk, C., Richardson, C.D., Aitken, K., Iscove, N., Koretzky, G., Johnson, P., Liu, P., Rothstein, D.M. and Penninger, J.M. (2001) CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*, **409**, 349-354.
- Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **147**, 258-267.
- Isaacs, A., Lindenmann, J. and Valentine, R.C. (1957) Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **147**, 268-273.

- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J. and Schreiber, R.D. (1998) Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7556-7561.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O. and Akira, S. (2005) IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*, **6**, 981-988.
- Kelly, G.L. and Rickinson, A.B. (2007) Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, **2007**, 277-284.
- Kempkes, B., Pawlita, M., Zimmer-Strobl, U., Eissner, G., Laux, G. and Bornkamm, G.W. (1995) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-estrogen receptor fusion proteins transactivate viral and cellular genes and interact with RBP-J kappa in a conditional fashion. *Virology*, **214**, 675-679.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M. and Hammerschmidt, W. (1998) Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J*, **17**, 1700-1709.
- Kitagawa, N., Goto, M., Kurozumi, K., Maruo, S., Fukayama, M., Naoe, T., Yasukawa, M., Hino, K., Suzuki, T., Todo, S. and Takada, K. (2000) Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J*, **19**, 6742-6750.
- Klein, G. and Klein, E. (1977) Immune surveillance against virus-induced tumors and nonrejectability of spontaneous tumors: contrasting consequences of host versus tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 2121-2125.
- Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T. and Takada, K. (1999) Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol*, **73**, 9827-9831.
- Krug, R.M., Yuan, W., Noah, D.L. and Latham, A.G. (2003) Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology*, **309**, 181-189.
- Küppers, R. (2003) B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*, **3**, 801-812.
- Lee, S.P., Brooks, J.M., Al-Jarrah, H., Thomas, W.A., Haigh, T.A., Taylor, G.S., Humme, S., Schepers, A., Hammerschmidt, W., Yates, J.L., Rickinson, A.B. and Blake, N.W. (2004) CD8 T cell recognition of endogenously expressed Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *J Exp Med*, **199**, 1409-1420.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G. and Masucci, M.G. (1995) Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature*, **375**, 685-688.
- Liao, J., Fu, Y. and Shuai, K. (2000) Distinct roles of the NH2- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5267-5272.
- Lindstrom, M.S. and Wiman, K.G. (2002) Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol*, **12**, 381-387.
- Liu, B., Gross, M., ten Hoeve, J. and Shuai, K. (2001) A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3203-3207.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D. and Shuai, K. (1998) Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10626-10631.

- Longnecker, R., Druker, B., Roberts, T.M. and Kieff, E. (1991) An Epstein-Barr virus protein associated with cell growth transformation interacts with a tyrosine kinase. *J Virol*, **65**, 3681-3692.
- Lubyova, B., Kellum, M.J., Frisancho, A.J. and Pitha, P.M. (2004) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vIRF-3 stimulates the transcriptional activity of cellular IRF-3 and IRF-7. *J Biol Chem*, **279**, 7643-7654.
- Lubyova, B. and Pitha, P.M. (2000) Characterization of a novel human herpesvirus 8-encoded protein, vIRF-3, that shows homology to viral and cellular interferon regulatory factors. *J Virol*, **74**, 8194-8201.
- Magrath, I., Adde, M., Shad, A., Venzon, D., Seibel, N., Gootenberg, J., Neely, J., Arndt, C., Nieder, M., Jaffe, E., Wittes, R.A. and Horak, I.D. (1996) Adults and children with small non-cleaved-cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen. *J Clin Oncol*, **14**, 925-934.
- Mancao, C. and Hammerschmidt, W. (2007) Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood*, **110**, 3715-3721.
- Masucci, M.G., Contreras-Salazar, B., Ragnar, E., Falk, K., Minarovits, J., Ernberg, I. and Klein, G. (1989) 5-Azacytidine up regulates the expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA-2) through EBNA-6 and latent membrane protein in the Burkitt's lymphoma line rael. *J Virol*, **63**, 3135-3141.
- Miller, C.L., Longnecker, R. and Kieff, E. (1993) Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A blocks calcium mobilization in B lymphocytes. *J Virol*, **67**, 3087-3094.
- Moormann, A.M., Chelimo, K., Sumba, O.P., Lutzke, M.L., Ploutz-Snyder, R., Newton, D., Kazura, J. and Rochford, R. (2005) Exposure to holoendemic malaria results in elevated Epstein-Barr virus loads in children. *J Infect Dis*, **191**, 1233-1238.
- Naka, T., Fujimoto, M. and Kishimoto, T. (1999) Negative regulation of cytokine signaling: STAT-induced STAT inhibitor. *Trends Biochem Sci*, **24**, 394-398.
- Nanbo, A., Inoue, K., Adachi-Takasawa, K. and Takada, K. (2002) Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *EMBO J*, **21**, 954-965.
- Oganesyan, G., Saha, S.K., Guo, B., He, J.Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A. and Cheng, G. (2006) Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*, **439**, 208-211.
- Panniers, R. and Henshaw, E.C. (1983) A GDP/GTP exchange factor essential for eukaryotic initiation factor 2 cycling in Ehrlich ascites tumor cells and its regulation by eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation. *J Biol Chem*, **258**, 7928-7934.
- Parato, K.A., Senger, D., Forsyth, P.A. and Bell, J.C. (2005) Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer*, **5**, 965-976.
- Patterson, J.B. and Samuel, C.E. (1995) Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase. *Mol Cell Biol*, **15**, 5376-5388.
- Patterson, J.B., Thomis, D.C., Hans, S.L. and Samuel, C.E. (1995) Mechanism of interferon action: double-stranded RNA-specific adenosine deaminase from human cells is inducible by alpha and gamma interferons. *Virology*, **210**, 508-511.
- Pestka, S. (1997) The interferon receptors. *Semin Oncol*, **24**, S9-18-S19-40.
- Pestka, S., Krause, C.D. and Walter, M.R. (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*, **202**, 8-32.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C. and Tuschl, T. (2004) Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, **304**, 734-736.

- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E. and Filipowicz, W. (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, **309**, 1573-1576.
- Player, M.R. and Torrence, P.F. (1998) The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol Ther*, **78**, 55-113.
- Precious, B., Young, D.F., Andrejeva, L., Goodbourn, S. and Randall, R.E. (2005) In vitro and in vivo specificity of ubiquitination and degradation of STAT1 and STAT2 by the V proteins of the paramyxoviruses simian virus 5 and human parainfluenza virus type 2. *J Gen Virol*, **86**, 151-158.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R. and Aguet, M. (1999) Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*, **10**, 547-558.
- Rebouillat, D. and Hovanessian, A.G. (1999) The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res*, **19**, 295-308.
- Roberts, R.M., Liu, L., Guo, Q., Leaman, D. and Bixby, J. (1998) The evolution of the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res*, **18**, 805-816.
- Rooney, C., Howe, J.G., Speck, S.H. and Miller, G. (1989) Influence of Burkitt's lymphoma and primary B cells on latent gene expression by the nonimmortalizing P3J-HR-1 strain of Epstein-Barr virus. *J Virol*, **63**, 1531-1539.
- Rooney, C.M., Gregory, C.D., Rowe, M., Finerty, S., Edwards, C., Rupani, H. and Rickinson, A.B. (1986) Endemic Burkitt's lymphoma: phenotypic analysis of tumor biopsy cells and of derived tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst*, **77**, 681-687.
- Rooney, C.M., Rowe, M., Wallace, L.E. and Rickinson, A.B. (1985) Epstein-Barr virus-positive Burkitt's lymphoma cells not recognized by virus-specific T-cell surveillance. *Nature*, **317**, 629-631.
- Rowe, M., Rowe, D.T., Gregory, C.D., Young, L.S., Farrell, P.J., Rupani, H. and Rickinson, A.B. (1987) Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *Embo J*, **6**, 2743-2751.
- Saha, S.K., Pietras, E.M., He, J.Q., Kang, J.R., Liu, S.Y., Oganessian, G., Shahangian, A., Zarnegar, B., Shiba, T.L., Wang, Y. and Cheng, G. (2006) Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J*, **25**, 3257-3263.
- Samuel, C.E. (1991) Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology*, **183**, 1-11.
- Samuel, C.E. (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*, **14**, 778-809, table of contents.
- Sasaki, A., Yasukawa, H., Shouda, T., Kitamura, T., Dikic, I. and Yoshimura, A. (2000) CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem*, **275**, 29338-29347.
- Schaadt, E., Baier, B., Mautner, J., Bornkamm, G.W. and Adler, B. (2005) Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mimics B-cell receptor-dependent virus reactivation. *J Gen Virol*, **86**, 551-559.
- Schlee, M., Holzel, M., Bernard, S., Mailhammer, R., Schuhmacher, M., Reschke, J., Eick, D., Marinkovic, D., Wirth, T., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Eilers, M., Baran-Marszak, F., Fagard, R., Feuillard, J., Laux, G. and Bornkamm, G.W. (2007) C-myc activation impairs the NF-kappaB and the interferon response: implications for the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer*, **120**, 1387-1395.
- Shimizu, N., Tanabe-Tochikura, A., Kuroiwa, Y. and Takada, K. (1994) Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma

- (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV. *J Virol*, **68**, 6069-6073.
- Shuai, K. (2000) Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene*, **19**, 2638-2644.
- Sica, A., Dorman, L., Viggiano, V., Cippitelli, M., Ghosh, P., Rice, N. and Young, H.A. (1997) Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J Biol Chem*, **272**, 30412-30420.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. and Liu, Y.J. (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, **284**, 1835-1837.
- Simon, A., Fah, J., Haller, O. and Staeheli, P. (1991) Interferon-regulated Mx genes are not responsive to interleukin-1, tumor necrosis factor, and other cytokines. *J Virol*, **65**, 968-971.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G. and Glimcher, L.H. (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, **100**, 655-669.
- Takada, K. and Nanbo, A. (2001) The role of EBERs in oncogenesis. *Semin Cancer Biol*, **11**, 461-467.
- Tang, X., Gao, J.S., Guan, Y.J., McLane, K.E., Yuan, Z.L., Ramratnam, B. and Chin, Y.E. (2007) Acetylation-dependent signal transduction for type I interferon receptor. *Cell*, **131**, 93-105.
- Thorley-Lawson, D.A. (2005) EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol*, **116**, 251-261; quiz 262.
- Thorley-Lawson, D.A. and Babcock, G.J. (1999) A model for persistent infection with Epstein-Barr virus: the stealth virus of human B cells. *Life Sci*, **65**, 1433-1453.
- Trinchieri, G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, **3**, 133-146.
- Tsuji-Takayama, K., Aizawa, Y., Okamoto, I., Kojima, H., Koide, K., Takeuchi, M., Ikegami, H., Ohta, T. and Kurimoto, M. (1999) Interleukin-18 induces interferon-gamma production through NF-kappaB and NFAT activation in murine T helper type 1 cells. *Cell Immunol*, **196**, 41-50.
- Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N. and Kikutani, H. (1999) Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science*, **286**, 300-303.
- Unterstab, G., Ludwig, S., Anton, A., Planz, O., Dauber, B., Krappmann, D., Heins, G., Ehrhardt, C. and Wolff, T. (2005) Viral targeting of the interferon- β -inducing Traf family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13640-13645.
- Vyas, J., Elia, A. and Clemens, M.J. (2003) Inhibition of the protein kinase PKR by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus genomic RNA. *RNA*, **9**, 858-870.
- Wagner, R.W., Smith, J.E., Cooperman, B.S. and Nishikura, K. (1989) A double-stranded RNA unwinding activity introduces structural alterations by means of adenosine to inosine conversions in mammalian cells and *Xenopus* eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2647-2651.
- Weissmann, C. and Weber, H. (1986) The interferon genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **33**, 251-300.
- Williams, B.R. (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene*, **18**, 6112-6120.
- Xu, L.G., Wang, Y.Y., Han, K.J., Li, L.Y., Zhai, Z. and Shu, H.B. (2005) VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN- β signaling. *Mol Cell*, **19**, 727-740.

- Xu, Z. and Williams, B.R. (2000) The B56alpha regulatory subunit of protein phosphatase 2A is a target for regulation by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Mol Cell Biol*, **20**, 5285-5299.
- Yokota, S., Yokosawa, N., Okabayashi, T., Suzutani, T., Miura, S., Jimbow, K. and Fujii, N. (2004) Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 contributes to inhibition of the interferon signaling pathway. *J Virol*, **78**, 6282-6286.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A. and Fujita, T. (2005) Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*, **175**, 2851-2858.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. and Fujita, T. (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*, **5**, 730-737.
- Yoshimura, A. (1998) The CIS family: negative regulators of JAK-STAT signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, **9**, 197-204.
- You, M., Yu, D.H. and Feng, G.S. (1999) Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol Cell Biol*, **19**, 2416-2424.
- Young, L.S. and Rickinson, A.B. (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, **4**, 757-768.
- Zimber-Strobl, U., Kempkes, B., Marschall, G., Zeidler, R., Van Kooten, C., Banchereau, J., Bornkamm, G.W. and Hammerschmidt, W. (1996) Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) is not sufficient to maintain proliferation of B cells but both it and activated CD40 can prolong their survival. *EMBO J*, **15**, 7070-7078.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Infektionszyklen von EBV	2
Abbildung 3: JAK-STAT Signalwege	12
Abbildung 4: IFN-Stimulation verschiedener BL-Linien	19
Abbildung 5: IFN-Stimulation von EBV-Verlust-Mutanten (A) und Konvertanten (B).....	20
Abbildung 6: Expression von STAT1 in verschiedenen BL-Linien	21
Abbildung 7: Die Expression des IFN γ -Rezeptors	22
Abbildung 8: Expression der Tyrosin-Kinase JAK1	23
Abbildung 9: Expression der Tyrosin-Kinase JAK2 auf mRNA- und Proteinebene.....	24
Abbildung 10: JAK2-Expression nach transienter Transfektion	25
Abbildung 11: STAT1-Phosphorylierung an Tyrosin 701 nach Transfektion mit JAK2	26
Abbildung 12: Untersuchung zur Methylierung des JAK2-Promotors.....	29
Abbildung 13: Proliferation IFN-behandelter Zellen.....	30
Abbildung 14: MTT-Messung	31
Abbildung 15: IFN-Stimulation von EBV-positiven Biospien.....	32
Abbildung 16: Lyse durch EBV-spezifische CTLs HLA-A2-exprimierender BL-Zelllinien .	35
Abbildung 17: Lyse durch EBV-spezifische CTLs HLA-B32-exprimierender BL-Linien.....	36
Abbildung 18: Regulation der Expression des TAP-Transporters in BL-Linien.....	37
Abbildung 19: Phosphorylierung von MAP-Kinasen	39
Abbildung 20: Regulation der Oberflächenmoleküle nach CD40-Ligation	40
Abbildung 21: Regulation der Oberflächenmoleküle ohne CD40-Ligation	41
Abbildung 22: Unterschiedliche Regulation der Expression des TAP-Transporters.....	42
Abbildung 23: Phosphorylierung von STAT1	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Latenzphasen und die exprimierten viralen Gene	3
Tabelle 2: Zusammenfassung aller getesteter Zelllinien.....	27
Tabelle 3: Eingesetzte Materialien	53
Tabelle 4: Antikörper für Western-Blot	54
Tabelle 5: Liste der LatenzIII-Linien	56
Tabelle 6: Liste der LatenzI-Linien.....	57
Tabelle 7: Liste der EBV-negativen Linien	57
Tabelle 8:Liste der Konvertanten.....	58
Tabelle 9:Liste der EBV-Verlust-Mutanten.....	58
Tabelle 10: Liste der Reinfektionsmutanten	58
Tabelle 11: Liste der LCL	59
Tabelle 12: Liste der Biospien	59
Tabelle 13: Oligonukleotide zur Amplifizierung von JAK2.....	61
Tabelle 14: Oligonukleotide für die VDJ-Rekombination.....	64
Tabelle 15: Oligonukleotide für qRT-PCR	66
Tabelle 16: Transfektionsbedingungen der einzelnen Zelllinien	73
Tabelle 17: Antikörper für FACS-Analysen	74

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Abb.	Abbildung
ADAR	Adenosin-Deaminase
AG	Antigen
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
AZA	5'-Azacytidin
bp	Basenpaar(e)
BCR	B-Zell-Rezeptor („B cell receptor“)
BSA	Rinder-Serum Albumin („bovine serum albumine“)
BL	Burkitt Lymphom
CARD	Caspase-Recruitment and Activation Domain”
CBP	“CREB-binding protein”
CD	“clusters of differentiation”
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	copy-DNA
CFSE	Carboxy-Fuoreszin Diacetat succinimidyl Ester
CIS	“cytokine-inducible SH2-containing protein”
CTL	zytotoxische T-Zelle („cytotoxic T-cell“)
DMEM	Dulbeccos Modifikation des „Eagle“ Mediums
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EBER	nicht-polyadenylierte kleine RNAs des Epstein-Barr-Virus
EBNA	EBV-nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
EC L	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
ELISA	„Enzym linked immuno sorbent assay“
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere („et alii“)
FACS	Fluoreszenz-assoziierte Durchfluss Zytometrie (“fluorescence-activated cell scanning”)
FCS	fötale Kälberserum („fetal calf serum“)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Gramm
x g	x fache Erdbeschleunigung
GAS	„gamma activated sequences“
GFP	grün fluoreszierendes Protein („green fluorescent protein“)
GTP	Guanosin Tri-Phosphat
h	Stunde („hour“)
HL	Hodgkin-Lymphom
HLA	„human leukocyte antigen“
HRP	Meerrettich Peroxidase (“horse-raddish peroxidase”)
i.E.	internationale Einheiten
IFN(s)	Interferon(e)
Ig	Immunglobulin

Abkürzungsverzeichnis

IgH	Immunglobulin der schweren Kette
IgL	Immunglobulin der leichten Kette
IL	Interleukin
IM	Infektiöse Mononucleose
IPS-1	„IFN β promotor stimulator-1“
IRF	„Interferon Regulatory Factor“
ISGF3	„IFN-stimulated gene factor 3“
ISRE	“IFN-stimulated regulatory element”
ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivierungs Motiv „immunereceptor tyrosine activation motif“
JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
ko	deletiertes Gen („knock-out“)
l	Liter
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie („lymphoblastoid cell line“)
LMP	latentes Membran Protein von EBV
λ	Wellenlänge
M	Molar
MACS	„Magnetic associated cell sorting“, Zell-Sortierung nach magnetischer Markierung
MDA 5	„Melanoma Differentiation-Associated Gene 5)
mg	Milligramm
MHC	„Major Histocompatibility Complex“
ml	Milligramm
min	Minute
miRNA	mikroRNA
mM	Millimolar
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ -Kette	eine der schweren Ketten des Immunglobulins
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MyD88	„Myeloid Differentiation primary response gene 88“
mRNA	Boten RNA („messenger RNA“)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N	Amino-Terminus (Protein)
NADH	Nicotinamidadeninucleotidhydrogen
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
NGFR	„Nerve Growth Factor Receptor“
NK	Natürliche Killerzelle
NF κ B	„nuclear factor kappa B“
OAS	2`-5`-Oligoadenylat-Synthetase
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Saline („posphate buffered saline“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PE	R-Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid

Abkürzungsverzeichnis

PIAS	„protein inhibitors of activated STATs“
Primer	Startoligonukleotid für die DNA-Polymerase
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
Puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RIG-I	„Retinoic acid-Inducible Gene I)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
s	Sekunde
SHM	somatische Hypermutation
SOCS	„Suppressor Of Cytokine Signaling“
STAT	„Signal Transducer and Activator of Transcription“
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	„Transporter associated with Antigen Processing“
TBS	Tris-gepufferte Saline („tris buffered saline)
TBST	Tris-gepufferte Saline („tris buffered saline) + Tween
TE	Tris-EDTA
TIR	Toll-IL-1 receptor“
TLR	„Toll Like Receptor“
TNF-R	„tumor necrosis factor receptor“
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
Trif	„TIR domain containing adaptor-inducing IFN)
U	„Units“, Enzym Einheit
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)
wt	Wildtyp
zytotoxische T-Zelle(n)	CTL(s)

Danksagung

Meinen herzlichen Dank an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herr Prof. Georg W. Bornkamm möchte ich für seine Betreuung danken und für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas und des Arbeitsplatzes. Des Weiteren für die ständige Bereitschaft zur Diskussion und der Herstellung der Kontakte mit meinen Kooperationspartnern.

Herr Prof. Dirk Eick danke ich für die Vertretung meiner Arbeit vor der LMU, für die ständige Gesprächsbereitschaft und fachliche Betreuung.

Dr. Gerhard Laux kann ich gar nicht genug danken für all seine Hilfe in und um das Labor.

Dr. Berit Jungnickel für ihre immense Unterstützung. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht beendet worden.

I would like to thank **Prof. Alan B. Rickinson** for his support and help during my visit to his lab in Birmingham. As well as **Dr. Gemma L. Kelly** for everything she has done and is still doing for me in the lab and personally.

Dr. Martin Schlee möchte ich für die Einführung in mein Thema danken. Er hat mir gezeigt, wie man wunderschöne Western-Blots macht und generell die Weichen für meine Arbeit gestellt. Und selbst in Bonn beantwortet er noch bereitwillig meine Fragen.

Dr. Karsten Spiekermann für die Bereitstellung des retroviralen JAK2-Expressionsplasmids.

Dr. Elisabeth Kremmer und **Prof. Robert Tampé** für wunderschön funktionierende Antikörper.

Meiner ehemaligen Diplomandin **Tine Staab** danke ich für viel Freude im Labor und auch darüber hinaus.

Mein Dank auch an alle anderen **KMOLBIs**, die mir meine Zeit im Labor doch sehr erleichtert haben. Zu Beginn sind da natürlich **Hella Kohlhof mit kompletter Familie, Caro Hojer und Stephi Tobollik mit kompletter Familie** zu nennen, die mir nicht nur fachlich immer helfend zur Seite standen, sondern auch mein Privatleben bereichert haben mit Segel-Turns auf dem Ammersee -inklusive unverhoffter Dusche-, leckeren Pizza-Abenden, diversen IKEA-Besuchen und Spaziergängen im Westpark. Generell möchte ich auch den anderen „**Jungnickels**“ danken, die mich bei ihren labmeetings aufgenommen haben und immer sehr aufmerksam waren, obwohl sie so wenig von meiner Arbeit verstanden haben.

Danksagung

Silvie Hiechinger, meine „Leidensgenossin“ im Studium und unverhoffter Neuzugang auf unserem Stockwerk für ihr offenes Ohr und ihre Aufmunterung wenn Not am Mann war.

Dem Rest des 1. Stocks möchte ich auch für die gute Atmosphäre danken und die ständige Bereitschaft zur Hilfe. Und natürlich gar nicht zu vergessen: vielen Dank den „**Lunch Club-Mädels**“ für unglaublich köstliche Donnerstage.

Auch außerhalb des Labors haben einige Leute dazu beigetragen, dass diese Arbeit nun vorliegen kann:

Meinen Eltern und Geschwistern kann ich gar nicht genug danken für die Unterstützung in allen Lebenslagen. Ich bin unglaublich dankbar, dass es euch gibt.

Meiner besten Freundin **Franzi** für ihre Treffsicherheit, was den Zeitpunkt für Postkarten und Aufheiterungspakete angeht. Des Weiteren **Ruth, Geli, Susi, Matze, Andrea** und **Michi** für ihre Freundschaft gerade im letzten Jahr.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die Dissertation von mir selbstständig, ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt worden ist.

München, den 31. Januar 2008

Judith Mergler

Erklärung

Hiermit erkläre ich, das ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, den 31. Januar 2008

Judith Mergler

Lebenslauf

Judith Mergler

geboren am 03.01.1979
in München

Staatsangehörigkeit

deutsch

Schulischer Bildungsweg

1985-1989

Volkschule Pullach
Pullach

1989-1998

Pestalozzi-Gymnasium
München

1998

Abitur

Wissenschaftlicher Werdegang

1998-2004

Studium der Biologie
Ludwig-Maximilians-Universität, München

2003-2004

Diplomarbeit bei Prof. Manfred Schliwa
LMU München
„Funktionelle Studien an vernetztem Kinesin“

seit November 2004

**Doktorarbeit am Helmholtz Zentrum
München- Deutsches Forschungszentrum für
Gesundheit und Umwelt**
München
„Funktionalität des Interferon TypI- und TypII-
Signalwegs in Burkitt-Lymphom-Zellen“

Auslandsaufenthalt

2004

**wissenschaftliche Assistenz bei Prof. Keith R.
Poole**
Queen's University, Kingston
Ontario, Kanada