

Aus dem Institut für Virologie und Immunologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Immunologie
Vorstand: Professor Dr. T. Hünig

**Einfluß von Blimp-1 auf die
Interferonproduktion und Virusvermehrung**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
zu Würzburg

vorgelegt von
Evelin Schneider
aus Darmstadt

Würzburg, Januar 2004

Referentin: Prof. Dr. A. Schimpl

Korreferent: Prof. Dr. med. H.-P. Tony

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2004

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Immunsystem	1
1.2.	Das Interferonsystem	2
1.2.1.	Einteilung und Wirkungen der Interferone	2
1.2.2.	Wirkungsmechanismus der Typ-I-Interferone	4
1.2.3.	Induktion der Typ-I-Interferone	7
1.3.	B-Zell-Reifung	9
1.4.	Der Einfluß von Blimp-1 auf Interferonsystem und B-Zell-Reifung	11
1.4.1.	Blimp-1 und verwandte Proteine	11
1.4.2.	Funktionelle Bedeutung von Blimp-1/PRDI-BF1	12
1.4.3.	Wirkungsmechanismus von Blimp-1/PRDI-BF1	14
1.4.4.	Fragestellung	15
2.	Material	17
2.1.	Zellen	17
2.1.1.	Primäre Hühnerembryofibroblasten (CEF)	17
2.1.2.	L929-Zellen	17
2.1.3.	293T-Zellen	17
2.2.	Viren	17
2.3.	Interferone	17
2.3.1.	Hühner-Interferon	17
2.3.2.	Maus-Interferon	17
2.4.	Kulturmedien	18
2.5.	Lösungen und Puffer	18
2.6.	Radioaktivität	20
2.7.	Kits	20
2.8.	Reagenzien	20

3.	Methoden	22
3.1.	Zelluläre Methoden	22
3.1.1.	Gewebekultur	22
3.1.1.1.	Primärkultur von Hühnerembryofibroblasten	22
3.1.1.2.	Kultur permanenter L929-Zellen	22
3.1.1.3.	Kultur von 293T-Zellen	22
3.1.2.	Passagieren von Zellen	23
3.1.3.	Analyse der Zellproliferation	23
3.1.3.1.	³ H-Thymidin-Test	23
3.1.3.2.	CFSE-Färbung	24
3.1.4.	Flußzytometrie	24
3.1.4.1.	Zellanalyse mit dem FACScan	24
3.1.4.1.	Zellsortierung mit dem FACS-Vantage	25
3.1.5.	Infektion von L929-Zellen mit Virus und Plaquetest	25
3.1.5.1.	Infektion von L929-Zellen mit VSV und Sindbis-Virus	25
3.1.5.2.	Bestimmung des Virusgehalts der gewonnenen Überstände im Plaquetest	26
3.2.	DNA-Techniken	26
3.2.1.	Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA	26
3.2.2.	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen in einer Maxipräparation	27
3.2.3.	Transfektion von 293T-Zellen zur Gewinnung von Retrovirus-haltigen Überständen	28
3.2.4.	Transduktion von L929-Zellen	28
3.2.5.	Selektion der Transduktanten	29

3.3.	RNA-Techniken	29
3.3.1.	Isolation der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	29
3.3.2.	RNase Protection Assay	30
3.3.2.1.	Synthese der [³² P]-markierten RNA-Probe	30
3.3.2.2.	RNA-Hybridisierung	31
3.3.2.3.	Entfernung von Einzelstrang-RNA durch RNase	31
3.3.2.4.	Auftrennung der Proben im Polyacrylamidgel	32
4.	Ergebnisse	33
4.1.	Der Einfluß von Interferon auf die Zellproliferation von primären Hühnerembryofibroblasten (CEF) und L929-Zellen	33
4.1.1.	Versuch mit primären Hühnerembryofibroblasten	33
4.1.2.	Versuch mit L929-Zellen	34
4.2.	Transfektion von L929-Zellen und Makrophagen mit Blimp-1-Gen tragenden Retroviren	36
4.3.	Einfluß von Blimp-1 auf die Interferonproduktion in L929-Zellen	39
4.3.1.	Infektion der Zellen	39
4.3.2.	RNase Protection Assay	42
4.4.	Einfluß von Blimp-1 auf die Virusvermehrung in L929-Zellen	43
4.4.1.	Infektion der Zellen	43
4.4.2.	Plaquetest	44
5.	Diskussion	48
6.	Zusammenfassung	52
7.	Literatur	54

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Alle lebenden Organismen besitzen in einem gewissen Rahmen die Möglichkeit, sich gegen schädigende Einflüsse aus der Umwelt zu schützen. Die angewandten Schutzmechanismen haben im Laufe der Evolution stark an Komplexität zugenommen und reichen von der Phagozytose und Verdauung mikrobieller Krankheitserreger durch Einzeller über schützende Hüllen, Häute oder Panzer höherentwickelter Invertebraten bis zu einem eigenständig organisierten Immunsystem, wie es bei den Vertebraten auftritt.

Aufgabe des Immunsystems ist die Abwehr belebter und unbelebter Schadstoffe (Toxine, Viren, Bakterien, Pilze) sowie die Elimination transformierter körpereigener Zellen.

Man unterscheidet zwischen einer angeborenen, unspezifischen und einer erworbenen, spezifischen Immunantwort.

Die angeborene Immunantwort folgt einer Noxe mit geringer Latenzzeit und richtet sich gegen verschiedene Antigene. Sie wird durch Phagozyten (Makrophagen, neutrophile Granulozyten), natürliche Killerzellen und verschiedene Effektormoleküle wie Lysozym, Faktoren des Komplementsystems, Akute-Phase-Proteine und Interferone vermittelt.

Die erworbene Immunantwort richtet sich spezifisch gegen jeweils ein bestimmtes Antigen und ist durch Gedächtnisbildung, also eine schnellere und effektivere Antwort bei wiederholtem Einwirken desselben Antigens, und durch die Fähigkeit zur Selbst-Fremd-Unterscheidung gekennzeichnet. Beteiligte Zellen sind B- und T-Lymphozyten; die humorale Antwort erfolgt durch spezifische Antikörper.

Die enorme Mehrproduktion von Effektormolekülen und immunkompetenten Zellen, mit der das Immunsystem auf Antigenexposition reagiert, unterliegt komplexen Regulationsmechanismen, die bis heute in ihrer Gesamtheit bei weitem nicht verstanden sind.

In dieser Arbeit soll die Funktion des Transkriptionsfaktors Blimp-1 in der Regulation der Interferonexpression untersucht werden. Da bisher insbesondere der Einfluß von Blimp-1 auf die späte B-Zell-Differenzierung Gegenstand intensiver Forschung war, soll auf diese beiden Teilaspekte der Immunantwort kurz eingegangen werden.

1.2. Das Interferonsystem

1.2.1. Einteilung und Wirkungen der Interferone

Die Interferone gehören ebenso wie Kolonie stimulierende Faktoren, Interleukine, die Tumornekrosefaktoren α und β und eine Reihe weiterer Faktoren zur Familie der Zytokine, die an der Zell-Zell-Interaktion beteiligt sind. Durch Zytokine beeinflussen sich Zellen gegenseitig in ihrer Proliferation, Differenzierung, Funktion und Transkriptionsregulation.

Isaacs und Lindemann beschrieben 1957 erstmals die Interferone als aus virusinfizierten Zellen freigesetzte Faktoren, die in homologen, nicht infizierten Zellen virale Interferenz, also Virusresistenz induzieren (Isaacs und Lindemann, 1957).

Es handelt sich bei den Interferonen um eine Gruppe auto- oder parakrin wirkender, zum Teil glycosylierter Polypeptide mit hoher spezifischer Aktivität. Bereits in einer Konzentration von $<10^{-13}$ M wirken sie antiviral, im Bereich von 10^{-13} M bis 10^{-11} M antiproliferativ und bei 10^{-12} M bis 10^{-10} M immunmodulatorisch (Bode und Hauser, 1990), wobei möglicherweise unterschiedliche Signaltransduktionswege involviert sind.

Interferone sind im Serum gesunder Menschen in der Regel nicht nachweisbar, sondern treten erst infolge einer Virusinfektion auf, in deren Verlauf sie durch Makrophagen, Lymphozyten, natürliche Killerzellen, infizierte Fibroblasten oder Endothelzellen produziert werden.

Man unterscheidet Typ-I-Interferone (α - und β -Interferon) von Typ-II-Interferon (γ -Interferon).

Die Typ-I-Interferone Interferon- α und Interferon- β weisen auf Proteinebene 40-50% Homologie auf und sind beim Menschen auf einem intronfreien Abschnitt von Chromosom 9 kodiert (Pitha 1995). Sie können von nahezu allen Zellen sezerniert werden und binden an die gleichen Rezeptoren der Zielzellen. Weitere Gemeinsamkeiten sind die Ausbildung für die biologische Wirkung essentieller Disulfidbrücken sowie die charakteristische Säurestabilität bei pH2.

Die α -Interferone stellen eine Gruppe vornehmlich von Leukozyten gebildeter, nicht glykosylierter Polypeptide mit Molekulargewichten zwischen 19 und 26 kDa dar, die zu 80% homolog sind und hauptsächlich antiviral und antiproliferativ wirken. Die Subtypen werden bei Mensch und Maus je nach Zelltyp in unterschiedlicher Quantität gebildet (Pitha 1995).

Der antivirale Effekt erfolgt speziesspezifisch, richtet sich jedoch gegen fast alle Viren. Die replikationshemmende Wirkung ist bei lytischen RNA-Viren stärker als bei transformierenden RNA-Viren und DNA-Viren, wobei insbesondere doppelsträngige RNA (dsRNA) als starker Induktor wirkt. Der Angriffspunkt kann in verschiedenen Stadien der Virusvermehrung liegen. Beim Herpes-simplex-Virus wird beispielsweise die Bildung der frühen β -Proteine gehemmt, bei Retroviren die als „budding“ bezeichnete Ausschleusung der neugebildeten Virione aus der Wirtszelle.

Der einzige Vertreter des Interferon- β ist ein ca. 166 Aminosäuren umfassendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 23 kDa, das hauptsächlich von Fibroblasten gebildet wird. Interferon- β besitzt ebenfalls antivirale Wirkung und wird zur Therapie der Virusenzephalitis, des generalisierten Herpes zoster und der schubförmig remittierenden multiplen Sklerose eingesetzt.

Als weitere Typ-I-Interferone wurden Interferon- δ in Schweinen, Interferon- τ in Schafen und Rindern und Interferon- ω in Rindern sowie im Menschen beschrieben (Bogdan 2000).

Das aus T_H1 -Zellen und natürlichen Killerzellen stammende γ -Interferon besitzt als Typ II-Interferon keine Homologie mit Interferon- α oder - β und bindet an

zwei andere Rezeptoren. Das auf Chromosom 12 lokalisierte zugehörige Gen wird durch drei Introns unterbrochen und kodiert für ein 166 Aminosäuren langes Vorläufermolekül, von dem eine 23 Aminosäuren umfassende Signalsequenz abgespalten wird. Die beiden anhand ihrer Glykosylierung zu unterscheidenden aktiven Formen von Interferon- γ besitzen Molekulargewichte von 20 bzw. 25 kDa und sind säurelabil.

Das früher als Immuninterferon bezeichnete Interferon- γ stimuliert die zelluläre Immunantwort durch Erhöhung der Lymphokinproduktion und Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten, Verstärkung der zytolytischen Funktion von natürlichen Killerzellen und Stimulation von Makrophagen. Diese Stimulation beinhaltet eine gesteigerte Zytotoxizität und Fähigkeit zur Phagozytose durch Hochregulation von F_c-Rezeptoren sowie zur Antigenpräsentation durch vermehrte Expression von MHC-Klasse-II-Proteinen. Auch die Präsentation von Virusantigenen auf infizierten Zellen wird durch Induktion von MHC-Klasse-I-Proteinen stimuliert. Gleichzeitig wirkt Interferon- γ antagonistisch zu Interleukin 4 und hemmt die durch T_H2-Zellen gesteuerte Synthese von IgG₁- und IgE im Rahmen der humoralen Immunantwort.

1.2.2. Wirkungsmechanismus der Typ-I-Interferone

Interferon- α und - β entfalten ihre auto- und parakrine Wirkung durch Bindung an die gleichen Oberflächenrezeptoren der Zielzellen und induzieren die Transkription von ISG (interferon stimulated genes) über den Signaltransduktionsweg der Jak/STAT-Kette.

Die Besonderheit der Jak/STAT-Kette liegt in der Tatsache, daß alle beteiligten Proteine konstitutiv im Zytoplasma vorliegen und nach Interferonbindung an den Rezeptor nur noch durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert werden. Sie können somit ohne Beteiligung von Second Messenger-Mechanismen sehr rasch ihre transkriptionsmodulierende Wirkung im Zellkern entfalten (Levy and Darnell 1990).

Die beteiligten Januskinasen (Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2) sind als hochmolekulare Tyrosinkinassen in jeweils unterschiedlicher Kombination mit den zytoplasmatischen Domänen von Zytokinrezeptoren assoziiert. Trotz der Bindung von Interferon- α und - β an die gleichen Rezeptoren bestehen jedoch insbesondere quantitative Differenzen in deren antiviraler Wirksamkeit (Imada 2000), die auf Unterschieden in der STAT-Aktivierung oder der Aktivierung von Regulationsfaktoren außerhalb der Jak/STAT-Kette beruhen könnten (Bogdan 2000).

Die beiden Untereinheiten des Interferon- α/β -Rezeptors, IFNAR1 und IFNAR2 sind an ihren zytoplasmatischen Domänen mit den Janus-Tyrosinkinassen Tyk2 und Jak1 (Novick 1994) assoziiert, IFNAR2 außerdem mit STAT2 (signal transducer and activator of transcription 2), wobei Unterschiede in der für STATs charakteristischen SH2-Domäne deren selektive Bindung an bestimmte Zytokinrezeptoren bedingen (Imada 2000). Nach Interferonbindung an den Rezeptor dimerisieren die beiden Rezeptoruntereinheiten und ermöglichen die Aktivierung von Tyk2 und Jak1 durch Transphosphorylierung. Tyk2 phosphoryliert wiederum einen Tyrosinrest von IFNAR1, woraufhin STAT2 über seine SH2-Domäne an dieser Stelle bindet und ebenfalls durch Tyk2 phosphoryliert wird. Gleiches gilt für STAT1 nach Bindung über die SH2-Domäne an das phosphorylierte Tyrosin von STAT2. Der entstehende phosphorylierte STAT1-/STAT2-Komplex ist also durch doppelte Interaktion jeweils zwischen der SH2-Domäne des einen und dem phosphorylierten Tyrosinrest des anderen STAT stabilisiert. Das Heterodimer dissoziiert vom Rezeptor, gelangt in den Zellkern und bildet dort ein als ISGF3 bezeichnetes Heterotrimer mit p48, einem Protein, das an die Promotoren der durch Interferon stimulierbaren Gene ISG bindet (Kessler 1988, Kessler 1990, Levy 1990, Fu 1990).

Die Signaltransduktion kann auch über die Bildung von STAT1-Homodimeren verlaufen, jedoch ist dieser Mechanismus eher typisch für Interferon- γ und im Falle der Typ-I-Interferone nicht vollständig geklärt.

Neben p48, das mit IRF-9 (interferon regulatory factor-9) identisch ist, können an die Promotoren auch andere Mitglieder der IRF-Familie wie IRF-1, IRF-2,

IRF-3, IRF-4, IRF-5, IRF-6, IRF-7 und IRF-8/ICSBP (interferon consensus sequence binding protein) binden, wobei diese Faktoren zum Teil wie die STATs durch Tyrosinphosphorylierung und Komplexbildung aktiviert werden (Sharf 1997).

Die Bindung erfolgt an bestimmten, als ISRE (interferon stimulated response elements) bezeichneten DNA-Abschnitten (Levy 1988, Kessler 1990, Kerr and Stark 1991), die in den Promotoren der über 30 verschiedenen ISG (interferon stimulated genes) in ähnlicher Form vorkommen und durch GAAAN(N)GAAA-Sequenzen gekennzeichnet sind.

Die antiviralen und antiproliferativen Effekte der Typ-I-Interferone werden schließlich durch die induzierten, ISG-kodierten Proteine vermittelt (Levy 1990), von denen die dsRNA-abhängige Proteinkinase R (PKR), das 2'-5'-Oligoadenylatsynthetasesystem (Lengyel 1993) und die Mx-Proteine am besten bekannt sind.

Die Serin-Threonin-Kinase PKR wird durch Bindung von mindestens 50 Basenpaaren langer dsRNA an eine aminoterminal gelegene Regulationsdomäne aktiviert. Durch Bindung von zwei PKR-Molekülen an eine dsRNA dimerisieren diese und phosphorylieren sich gegenseitig. Das aktive Dimer hemmt die Translation viraler und zellulärer mRNA durch Phosphorylierung der α -Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF2, was die Bildung von Initiationskomplexen unmöglich macht (De Benedetti 1983). Phosphoryliertes eIF2 α bindet fest an eIF2B und verhindert dadurch den durch eIF2B katalysierten Austausch von eIF2-gebundenem GDP gegen GTP, eine Reaktion, die Voraussetzung für eine erneute Translationsinitiation durch eIF2 ist. Zusätzlich beeinflusst PKR die Aktivität von STAT1 und IRF-1, aktiviert NF- κ B und vermittelt Apoptose.

Die ebenfalls durch dsRNA aktivierte 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (OASE) synthetisiert zwei bis zehn Nukleotide lange Oligoadenylate (Kerr 1978), die an die konstitutiv vorliegende RNaseL binden und diese durch Dimerisierung aktivieren. Die RNaseL degradiert virale und zelluläre mRNA, wobei die

Präferenz viraler mRNA durch lokale Aktivierung und Wirksamkeit der OASE/RNaseL an Orten erhöhter dsRNA-Konzentrationen gewährleistet wird (Gribaudo 1991). An der Suppression der viralen Proteinsynthese sind jedoch noch weitere Mechanismen beteiligt (Degen 1992).

Mx-Proteine sind GTPasen, die die Vermehrungszyklen bestimmter RNA-Viren wie Influenzaviren durch Inhibierung viraler Polymerasen behindern.

Neben der Jak/STAT-Kette werden durch G-Proteine vermittelte Second Messenger-Mechanismen wie Diacylglycerol/Inositoltriphosphat (Yap 1986) sowie Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Klein 1990), Aktivierung der Proteinkinase C (Pfeffer 1990, Reich and Pfeffer 1990) oder der Proteinkinase A (Hannigan 1991) als Signaltransduktionswege der Interferone diskutiert. Weitere Mechanismen sind die ISRE-unabhängige Induktion der Expression von Matrixmetalloproteasen (Sciavolino 1994) und von IRF-1 durch einen Inverted-Repeat-Binding-Factor (Haque 1994) sowie die Transmission eines antiproliferativen Effekts in T-Zellen über die Tyrosinphosphatase CD45 und die Tyrosinkinasen Lck und ZAP-70 (Petricoin 1997).

1.2.3. Induktion der Typ-I-Interferone

Die Interferonproduktion wird durch konstitutiv zytoplasmatisch vorliegende Transkriptionsfaktoren reguliert, welche unter Einwirkung bestimmter Stimuli spezifisch an die Promotoren der jeweiligen Gene binden.

Stimuli für die Produktion von Typ-I-Interferonen sind Viren, insbesondere doppelsträngige RNA, virale Hüllproteine, LPS (Lipopolysaccharide) und Zytokine wie Interleukin 1, Tumornekrosefaktor α , PDGF (platelet derived growth factor) oder M-CSF (macrophage-colony stimulating factor). Typ-II-Interferone werden durch Antigene, Mitogene oder Enterotoxine induziert.

Der Interferon- β -Promotor besitzt drei für die Transkriptionsregulation wichtige purinreiche Domänen, die sich in dem 5'-wärts zum Transkriptionsstart gelegenen VRE (virus responsive element) befinden (Fujita 1985, Dinter 1987). Die synergistische Wirkung der beiden positiv regulatorischen Domänen PRDI und

PRDII wird durch die negativ regulatorische Domäne NRDI inhibiert, deren Einfluß erst durch Virusinduktion aufgehoben wird, woraufhin das VRE positiv auf die Transkription wirkt. Durch Bindung von Transkriptionsfaktoren an PRDI oder II wird diese Wirkung moduliert.

Innerhalb der PRDI finden sich Variationen der für die ISRE (interferon stimulated reponse elements) charakteristischen GAAAGT- und AAGTGA-Hexamere (Fujita 1985, Kuhl 1987). Daraus erklärt sich die Tatsache, daß interferonregulatorische Faktoren wie IRF-1 und IRF-2 nicht nur durch Bindung an die ISRE die Transkription der interferonstimulierten Gene induzieren, sondern gleichzeitig durch Bindung an PRDI die Interferon- β -Produktion mitregulieren.

Die an die PRD bindenden Regulationsfaktoren liegen konstitutiv im Zytoplasma vor, müssen jedoch zum Teil erst aktiviert werden (Watanabe 1991). Einer der Aktivierungsmechanismen des an PRDII bindenden positiv regulatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B sei hier beispielhaft erläutert.

NF- κ B liegt im Ruhezustand als zytoplasmatischer Komplex mit dem Inhibitormolekül I- κ B vor. Oben genannte Stimuli aktivieren einen I- κ B-Kinase-Komplex (IKK-Komplex), was die Phosphorylierung und anschließende Ubiquitynylierung von I- κ B durch eine Ubiquitin-Ligase zur Folge hat. Als zell-eigenes, ubiquitinmarkiertes Protein wird I- κ B nun durch Proteasomen abgebaut. Das freigesetzte NF- κ B gelangt nach Komplexbildung mit weiteren zytoplasmatischen Faktoren in den Zellkern und aktiviert nach Bindung an PRDII den Interferon- β -Promotor (Lenardo 1989).

Neben NF- κ B existieren zahlreiche weitere induzierend oder reprimierend wirkende Transkriptionsfaktoren wie die an PRDI bindenden Faktoren IRF-1 (interferon regulatory factor 1), IRF-2 und PRDI-BF1 (positive regulatory domain I-binding factor 1) sowie PRDII-BF1, ein an die PRDII bindender Faktor (Miyamoto 1988, Harada 1989).

Die Interferon- α -Promotoren unterscheiden sich von denen der Interferon- β -Gene, besitzen jedoch eine als IE (inducible element) bezeichnete Promotor-

region mit PRDI-ähnlichen GAAAGT-Elementen. Der murine Interferon- α 4-Promotor ist durch die für die Virusinduzierbarkeit essentielle Sequenz GTAAAGAAAGT gekennzeichnet (Pitha 1995). Während bei Mäusen IRF-1 und IRF-2 hier binden können, ist die Bindung von NF- κ B an Promotoren der Interferon- α -Gene nicht möglich (MacDonald 1990). Die quantitativen Differenzen in der Expression der einzelnen Subtypen von Interferon- α beruhen auf Unterschieden in den Enhancern sowie dem Einfluß negativ regulatorischer DNA-Abschnitte. In murinen L-Zellen wird nach viraler Stimulation hauptsächlich Interferon- α 4, dagegen kaum Interferon- α 1 exprimiert. Die Hochregulation von Interferon- α 4 erfolgt durch Bindung von IRF-1 sowie des AF-1-Komplexes an überlappende Promotorregionen. Nach der virusinduzierten Formation des AF-1-Komplexes aus zwei DNA-bindenden Proteinen und einem weiteren, akzessorischen Protein im Zellkern bindet dieser spezifisch an die GTAAAGAAAGT-Sequenz des Promotors (Pitha 1995).

Die Stimulation von Zellen durch Interferon- β ist an der Regulation der Interferon- α -Produktion beteiligt, was sich darin zeigt, daß in Embryofibroblasten von Mäusen nach Entfernung der Gene für Interferon- β die Interferon- α -Produktion nicht mehr induzierbar ist (Erlandsson 1998). Möglicherweise führt die durch Interferon- β verstärkte Synthese von IRF-7 zu einer Induktion der Gene für Interferon- α (Au 1998, Marie 1998).

Der vollständige Signaltransduktionsweg von der Virusinfektion der Zelle bis zur Induktion der Interferon- α -Gene ist bislang nicht bekannt.

1.3. B-Zell-Reifung

Die B-Zell-Reifung findet beim Säuger postnatal im Knochenmark unter dem Einfluß eines speziellen Mikromilieus statt. Die stadienhafte Entwicklung von den Stammzellen über Pro-B-Zellen, frühe und späte Prä-B-Zellen und unreife B-Zellen bis hin zu reifen immunkompetenten Zellen sowie die Entstehung Immunglobulin-produzierender Plasmazellen in den sekundären lymphatischen

Organen ist durch die Expression stadienspezifischer Oberflächenproteine und regulatorischer Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet (Henderson 1998).

Die Transkriptionsfaktoren PU.1 und Ikaros sind an der Entwicklung von Stammzellen zu Pro-B-Zellen mit den charakteristischen Oberflächenproteinen AA4.1, B220 und CD43 beteiligt.

In der frühen B-Zell-Entwicklung kommt es zur Umlagerung der DJ-, danach der VDJ-Segmente der Gene für schwere Immunglobulinketten, deren Genprodukte zusammen mit den Surrogatleichtketten ($V_{\text{prä}\beta}$ und $V_{\lambda 5}$) als Prä-B-Zell-Rezeptor exprimiert werden. Über diesen Rezeptor empfangen Prä-B-Zellen Signale, die ihr Überleben sichern. Nach Umlagerung der Gensegmente für die leichten Ketten in späten Prä-B-Zellen werden komplette IgM auf der Zelloberfläche unreifer B-Zellen exprimiert, die mit den signaltransduzierenden Molekülen $Ig\alpha$ (mb-1) und $Ig\beta$ (B-29) assoziiert sind. Auf reifen immunkompetenten B-Zellen wird zusätzlich IgD exprimiert (Henderson 1998). Diese Vorgänge stehen unter dem Einfluß von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, E2A, EBF (early B cell factor) und BSAP (B cell specific activator protein) (Reya 1998).

Die Transkriptionsregulation durch Blimp-1 kommt erst bei der späten Differenzierung reifer B-Zellen zu Plasmazellen nach Antigenkontakt in der Peripherie zum Tragen. Mit Blimp-1 transfizierte B-Lymphomzellen zeigen einen Anstieg der Immunglobulinsekretion, der Expression von J-Ketten und Syndecan-1, der Zellgröße und Granularität (Turner 1994). Auch die durch Blimp-1 verursachten Verschiebungen im System der Transkriptionsfaktoren myc, max und mad spiegeln den Übergang von proliferativen Stadien in ein terminales Differenzierungsstadium wider. So ist der durch Blimp-1 hochregulierte mad/max-Komplex für seine Rolle in der Zelldifferenzierung, der unter Blimp-1-Einfluß vermindert exprimierte myc/max-Komplex für eine Begünstigung der Zellproliferation bekannt (Knödel 1999).

1.4. Der Einfluß von Blimp-1/PRDI-BF1 auf Interferonsystem und B-Zell-Reifung

1.4.1. Blimp-1 und verwandte Proteine

Blimp-1 (B lymphocyte induced maturation protein-1) und sein humanes Äquivalent PRDI-BF1 (positive regulatory domain I-binding factor 1) leisten als reprimierende Transkriptionsfaktoren einen Beitrag zu den komplexen Regulationsmechanismen der Interferonproduktion und der Differenzierung von B-Zellen und myeloischen Zellen.

Blimp-1 wurde zunächst in späten B-Zellen und Plasmazellen von Mäusen untersucht. Inzwischen wurden analoge Transkriptionsfaktoren jedoch auch in anderen Zelltypen und Organismen gefunden, so etwa in myeloischen Zellen (Tunyaplin 2000). Bei der Untersuchung der Blimp-1-Expression in Mäuseembryonen verschiedener Entwicklungsstadien zeigte sich ein komplexes, dynamisches Expressionsmuster von Blimp-1 in Zellen ektodermaler, mesodermaler und endodermaler Herkunft (Chang 2002), was eine Beteiligung von Blimp-1 an Differenzierungsprozessen all dieser Zelltypen nahe legt.

Blimp-1 ist in seiner Aminosäuresequenz zu 90% identisch mit PRDI-BF1, abgesehen von 67 aminoterminalen Aminosäuren, die nur bei Blimp-1 vorkommen (Huang 1994). Das Molekulargewicht von Blimp-1 (98 kDa) ist um 10 kDa höher als das von PRDI-BF1 (88 kDa). Beide Proteine besitzen fünf Zinkfingerdomänen vom Krüppel-Typ (Keller und Maniatis 1991), wobei für PRDI-BF1 nachgewiesen wurde, daß die beiden ersten Zinkfinger für die spezifische DNA-Bindung verantwortlich sind (Keller und Maniatis 1992). Neben den zu 98% identischen Zinkfingerdomänen besitzen die beiden Proteine einen weiteren, als PR-Domäne bezeichneten, hochkonservierten Abschnitt mit 95% Identität.

Ein weiteres verwandtes Protein ist RIZ 1, ein Transkriptionsrepressor, der acht Zinkfinger motive und die PR-Domäne enthält (Xie 1997). RIZ 1 spielt eine Rolle bei der Transkriptionsregulation während der neuronalen Differenzierung und bei der Pathogenese des Retinoblastoms, wobei der an das Retinoblastomprotein bindende Abschnitt von RIZ identifiziert werden konnte (Buyse 1995).

1.4.2. Funktionelle Bedeutung von Blimp-1/PRDI-BF1

PRDI-BF1 wurde erstmals 1991 von A.D.Keller und T.Maniatis als spezifisch an die PRDI (positive regulatory domain I) bindender Repressor des Promotors für das Interferon- β -Gen beschrieben. Da der infolge Virusexposition beschriebene rasche Abfall der Interferon- β -Produktion nach Erreichen eines Maximalwerts mit einer Akkumulation von PRDI-BF1 mRNA einherging, wurde PRDI-BF1 die Funktion der Interferonrepression im Anschluß an eine Virusinduktion zugeschrieben (Keller und Maniatis 1991).

Blimp-1 dagegen wurde seit seiner Erstbeschreibung 1994 vor allem bezüglich seiner komplexen Funktion in der späten Differenzierungsphase von B-Zellen untersucht.

Die Folgen der durch Interleukin 2 und Interleukin 5 stimulierbaren Expression von Blimp-1 ist hierbei vom Differenzierungsstadium der Zelle abhängig. In frühen Entwicklungsstadien induziert Blimp-1 Apoptose, während es in späten Stadien die Differenzierung von B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen bewirkt (Messika 1998). Dies wurde durch in vivo-Untersuchungen an murinen wie auch an humanen primären und sekundären lymphatischen Geweben bestätigt. Die Entstehung von Plasmazellen in lymphatischen Keimzentren ist somit Blimp-1-abhängig, während in B-Gedächtniszellen Blimp-1 nicht nachgewiesen werden konnte (Angelin-Duclos 2000). Der Transkriptionsfaktor BCL-6 (B cell lymphoma-6) inhibiert die Stimulation der Transkription von Blimp-1 durch AP-1-Faktoren (Vasanwala 2002). Er verhindert dementsprechend den Übergang später B-Zellen von der Proliferationsphase zur Differenzierungsphase (Reljic 2000) und ist somit maßgeblich an der Entstehung von B-Zell-Lymphomen beteiligt.

Im einzelnen zeigt sich der oben genannte Effekt in verschiedenen phänotypischen Veränderungen, die den Übergang von einem späten B-Zell- in ein frühes Plasmazellstadium charakterisieren, in vermehrter Expression von J-Ketten und sekretorischen Immunglobulinen, Hochregulation von Syndecan-1 sowie gesteigerter Zellgröße und Granularität (Turner 1994). In LPS/anti mF(ab')₂-

kostimulierten B-Zellen, die infolge der Ligation des B-Zell-Rezeptors durch anti mF(ab')₂ die Fähigkeit zur IgM-Sekretion verloren haben, ließ sich diese Fähigkeit durch Interleukin 2 und 5-induzierte Blimp-1-Expression oder durch Überexpression von Blimp-1 nach Transfektion wiederherstellen (D.E.Schliephake und A.Schimpl 1996).

Blimp-1 interagiert außerdem mit zahlreichen weiteren Regulationsfaktoren. So beeinflusst Blimp-1 die Expression der Transkriptionsfaktoren myc, max und mad. Während die Transkription von c-myc durch Blimp-1 reprimiert wird (Lin 1997), steigt der mRNA-Level von mad4 drastisch an (Knödel 1999). Da myc/max-Komplexe in B-Zellen eher Proliferation, mad/max-Komplexe dagegen Zelldifferenzierung bewirken, weist der beschriebene Effekt von Blimp-1 auf einen Übergang von der Proliferation früher B-Zell-Stadien zur terminalen Differenzierung hin (Knödel 1999).

Genauere Erkenntnisse über den Einfluß von Blimp-1 in frühen Stadien der B-Zell-Reifung wurden an murinen WEHI 231-B-Lymphomzellen gewonnen. Diese Zellen erlangen durch Blimp-1 zunächst den Status kurzlebiger IgM-produzierender Zellen, werden dann jedoch apoptotisch, was mit einer reduzierten Expression des antiapoptotischen Proteins A1, einem Mitglied der bcl-2-Familie, einhergeht. Da die Wiedereinführung von A1 in solche Zellen durch retrovirale Transduktion deren Lebenszeit verlängert und die IgM-Sekretion aufrechterhält, ist ein direkter Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Wirkungen von Blimp-1 in frühen bzw. späten B-Zell-Stadien und dem A1-Gehalt der Zellen wahrscheinlich (Knödel 1999).

Neben B-Zellen stehen auch myeloische Zellen unter dem regulatorischen Einfluß von Blimp-1. Blimp-1 ist an der Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen des Knochenmarks zu Makrophagen unter dem Einfluß von M-CSF beteiligt und ist in Granulozyten und Monozyten des peripheren Blutes vorhanden. Auch bei der Differenzierung myeloischer Zellen bewirkt Blimp-1 die Repression des c-myc-Promotors (Chang 2000).

Obwohl die Funktion des humanen Transkriptionsfaktors PRDI-BF1 bisher hauptsächlich in bezug auf die Interferonexpression, die des murinen Blimp-1 dagegen im Zusammenhang mit Zelldifferenzierungsvorgängen untersucht wurde, werden die beiden Faktoren aufgrund ihrer gemeinsamen Struktur als homolog bezeichnet (Huang 1994). Die Frage, ob auch tatsächlich eine funktionelle Äquivalenz besteht, ist bislang ungeklärt.

1.4.3. Wirkungsmechanismus von Blimp-1/PRDI-BF1

Die transkriptionsreprimierende Wirkung von PRDI-BF1 beruht auf einem aktiven Repressionsmechanismus, der unter Mitwirkung von Korepressoren aus der Familie der Groucho-Proteine, hGrg, TLE1 und TLE2, vermittelt wird. Eine in PRDI-BF1 identifizierte Repressionsdomäne ermöglicht dessen spezifische Bindung an die Groucho-Proteine und die anschließende DNA-Bindung von PRDI-BF1 in Form eines Proteinkomplexes mit den genannten Korepressoren (Ren 1999). Ob dieser Wirkungsmechanismus auch für Blimp-1 zutrifft, wie aufgrund der strukturellen Übereinstimmungen mit PRDI-BF1 angenommen wurde, ist bislang nicht bewiesen.

Dagegen konnte für die Repression des c-myc-Promotors durch Blimp-1 die Beteiligung einer Histondeacetylase nachgewiesen werden, für die zwei unabhängige Bindungsregionen am Blimp-1 existieren. Nach Bindung an Blimp-1 und Überführung in den Zellkern bewirkt dieses Enzym die Deacetylierung des Histons H3, das mit dem c-myc-Promotor assoziiert ist. Diese Wirkung von Blimp-1 funktioniert unabhängig von dem gleichzeitig am Promotor gebundenen Aktivator YY1 und kann durch den Histondeacetylase-Inhibitor Tricostatin A inhibiert werden (Yu 2000).

Daneben inhibiert Blimp-1 die Promotoren einer ganzen Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren, die bei frühen Entwicklungs- und Proliferationsstadien von B-Zellen in Keimzentren eine Rolle spielen. Zu nennen sind BSAP (B-cell lineage-specific activator-protein), ein Transkriptionsfaktor, der für das Eintreten von Stammzellen in die B-Zell-Reihe bedeutsam ist, Spi-B und Id3, die die

Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors regulieren, sowie AID, Ku70, Ku86, DNA-PKcs und STAT6, die beim Wechsel der Immunglobulin-Isotypen im Rahmen der Gedächtniszellbildung bedeutsam sind. Eine geringere Anzahl von typischen Plasmazellgenen wie XBP-1 wird dagegen unter Mitwirkung von Blimp-1 induziert (Lin 2002, Shaffer 2002).

1.4.4. Fragestellung

Wie in der Einleitung beschrieben, ist die Frage nach der funktionellen Übereinstimmung von Blimp-1 und PRDI-BF1 bisher weitgehend offen. Es wurde daher in dieser Arbeit untersucht, inwieweit die für PRDI-BF1 beschriebene Repression der Interferonexpression auch auf Blimp-1 zutrifft. Hierfür schien die Untersuchung der Blimp-1-abhängigen Transkription von Interferon- β in L929-Zellen, einer permanenten Zelllinie von Mausfibroblasten, geeignet.

Außerdem wurde der Einfluß von Blimp-1 auf die Vermehrung von Sindbis-Virus und Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV) in L929-Zellen mit Hilfe des Plaquetests untersucht, da eine verminderte Expression von Interferon- β in Blimp-1-exprimierenden Zellen eine effektivere Virusreplikation in solchen Zellen erwarten ließe.

Zur Durchführung dieser Versuche wurden L929-Zellen benötigt, die Blimp-1, ein fluoreszierendes Markerprotein und ein Antibiotikaresistenzprotein für die Selektion der Transduktanten exprimierten, sowie eine Kontrollpopulation ohne Blimp-1. Die Gewinnung dieser Zellen erfolgte durch retrovirale Transduktion. Für die Herstellung der Retroviren wurde die Plasmid-DNA mit den oben genannten Genen sowie einem weiteren Gen für die retroviralen Oberflächenproteine in E.coli vermehrt und in einer Maxipräparation isoliert. Die Retroviren wurden durch Transfektion von 293T-Zellen gewonnen. Anschließend wurden die L929-Zellen transduziert, wobei die Effizienz der Transduktion beim Einsatz verschiedener Retroviren und Transduktionsmethoden verglichen wurde. Die transduzierten Zellen wurden durch Zugabe von Antibiotika selektioniert und anschließend mit Virus infiziert.

Die virusinduzierte Interferonexpression in Blimp-1-transduzierten Zellen sowie in der Kontrollpopulation wurde auf mRNA-Ebene mit Hilfe des RNase Protection Assay untersucht.

In einem weiteren Versuch wurde die Virusvermehrung in beiden Zellpopulationen im Plaquetest verglichen.

In einem Vorversuch wurde außerdem der Einfluß von Interferon auf die Proliferation von primären Hühnerembryofibroblasten und L929-Zellen untersucht, um die Frage zu klären, ob der für Interferon beschriebene antiproliferative Effekt auch in diesen Zellen zu beobachten sei. Als Methoden zur Quantifizierung der Zellproliferation wurden die Zellfärbung mit CFSE und der ³H-Thymidin-Test gewählt.

2. Material

2.1. Zellen

2.1.1. Primäre Hühnerembryofibroblasten (CEF)

Kulturen primärer Hühnerembryofibroblasten wurden nach Protokoll 3.1.1.1. aus elf Tage alten, bebrüteten Hühnereiern angelegt.

2.1.2. L929-Zellen

Bei L929-Zellen handelt es sich um eine permanente Zelllinie von Mausfibroblasten, die nach Protokoll 3.1.1.2. kultiviert wurden.

2.1.3. 293T-Zellen

293T-Zellen sind eine permanente Zelllinie von Mammakarzinomzellen. Sie wurden nach Protokoll 3.1.1.3. kultiviert.

2.2. Viren

Sindbis-Virus

Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV)

Newcastle-Disease-Virus (NDV)

2.3. Interferone

2.3.1. Hühner-Interferon

Zur Interferonbehandlung primärer Hühnerembryofibroblasten wurde Hühner-Interferon eingesetzt.

2.3.2. Maus-Interferon

Maus-Interferon wurde bei Experimenten mit L929-Zellen verwendet.

2.4. Kulturmedien

Minimal Essential Medium (MEM) (Eagle, 1959)

Das verwendete MEM wurde mit 5% fötalem Kälberserum (FCS) und $2 \cdot 10^5$ I.E./l Penicillin und Streptomycin versetzt. Der pH-Wert von 7,2-7,4 wurde mit 5,6% Natriumhydrogencarbonat gegen Phenolrot als Indikator eingestellt.

Dublecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) (Dublecco und Freeman, 1959)

DMEM mit 10% FCS und PS wurde für die Kultur von 293T-Zellen verwendet.

RPMI⁺

RPMI 1640 supplementiert mit

- 1% Natrium-Pyruvat
- 0,07% Glutamin
- 5% FCS (hitzeinaktiviert: 30 min, 56°C)
- β -Mercaptoethanol ($5 \cdot 10^{-5}$ M)
- 0,025% Penicillin
- 0,025% Streptomycin

LB-Medium (Luria Bertani-Medium)

- 1% Bactotryptan
- 0,5% Bacto-yeast extract
- 1% NaCl
- NaOH zum Einstellen von pH7

2.5. Lösungen und Puffer

- | | |
|--------------------|-------------------|
| <u>FACS-Puffer</u> | PBS |
| | 0,1% BSA |
| | 0,02% Natriumazid |

ATV

- 8% NaCl
- 4% KCl
- 10% D-(+)-Glukose
- 5% NaHCO₃
- 5% Trypsin (Difco 1:250)
- 2% Na₂-Ethylendiamintetraacetat

PBS (pH 7,2)

- 0,8% NaCl
- 0,02% KCl
- 0,115% NaH₂PO₄ * H₂O
- 0,02% KH₂PO₄
- 0,0167% CaCl₂ * 4 H₂O
- 0,01% MgCl₂ * 6 H₂O

BSS (balanced salt solution) BSS 1 (auf 1 l Wasser)

- 10 g Glucose
- 0,6 g KH₂PO₄
- 2,3 g Na₂HPO₄*H₂O
- 0,1 g Phenolrot
- 1,86 g CaCl₂*H₂O

BSS 2 (auf 1 l Wasser)

- 4,0 g KCl
- 80,0 g NaCl
- 2,0 g MgCl₂*6H₂O
- 2,0 g MgSO₄*7H₂O

Gebrauchslösung : 8/10 H₂O + 1/10 BSS 1 + 1/10 BSS 2

10*TBE

- 108g Tris
- 55g H₃BO₃
- 8,3g EDTA, 1l H₂O

Puffer für die Maxipräparation

P1 (Resuspensionspuffer): Lagerung bei 4°C	50 mM Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A
P2 (Lysepuffer):	200 mM NaOH
	1% SDS
P3 (Neutralisationspuffer):	3,0 M Potassiumacetat, pH5,5
QBT (Äquilibrierungspuffer):	750 mM NaCl
	50 mM MOPS, pH 7,0
	15% Ethanol
	0,15% Triton-X-100
QC (Waschpuffer):	1,0 M NaCl
	50 mM MOPS, pH 7,0
	15% Ethanol
QF (Elutionspuffer):	1,25 M NaCl
	50 mM Tris-HCl, pH 8,5
	15% Ethanol

2.6. Radioaktivität

[$\alpha^{32}\text{P}$]UTP	Amersham
^3H -Thymidin (6,7 Ci/mM)	NEN

2.7. Kits

Maxipräparation	QIAGEN
RNase Protection Assay	PHARMINGEN

2.8. Reagenzien

Acrylamid
Agar

Ammoniumpersulfat
CFSE
Chloroform
Ethanol
Fötale Kälberserum (FCS)
Gentamycin (G 418)
Harnstoff
Isopropanol
MEM
Neutralrot
Polybren
Röntgenfilme (Kodak)
Röntgenfilmentwickler (Kodak)
Seaplaque-Agarose
TEMED
Trizol
Zeocin

Die Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Boehringer, Mannheim
Gibco, Europe
Merck, Darmstadt
Roth, Karlsruhe
Serva, Heidelberg
Sigma, Deisenhofen

3. Methoden

3.1. Zelluläre Methoden

3.1.1. Gewebekultur

3.1.1.1. Primärkultur von Hühnerembryofibroblasten

Zur Gewinnung primärer Hühnerembryofibroblasten wurden die elf Tage lang bebrüteten Eier zunächst durchleuchtet, um die Unversehrtheit der Embryonen zu überprüfen. Dann wurden die Eier nach Desinfektion mit Mikrocid am stumpfen Ende aufgeklopft und die Schale vorsichtig nach außen entfernt. Die Embryonen wurden mit einer Pinzette entnommen und in eiskaltem PBS abgetötet. Kopf, innere Organe und Extremitäten wurden als unerwünschte Gewebeanteile entfernt. Das restliche Gewebe wurde zur Homogenisierung durch eine 50 ml Spritze in einen Erlenmeyerkolben mit Magnetührer gepreßt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Gewinnung von Einzelzellen erfolgte durch Zusatz von 5 ml 0,25% Trypsin pro Embryo und dreißigminütiges Rühren bei 37°C. Anschließend wurden 25 ml MEM in ein Zentrifugenglas gegeben und die Zellsuspension durch einen achtlagigen, mit MEM benetzten Gazefilter hineinfltriert, was eine weitere Zellschädigung durch Trypsin verhindert. Nach fünfzehnminütiger Zentrifugation bei 1200 Upm wurden die Zellen in MEM resuspendiert, auf maximal 100 ml aufgefüllt und durch einen zweiten Gazefilter in einen 100 ml Meßzylinder fltriert. Die Zellzahl wurde über eine 1:100 Verdünnung in der Zählkammer bestimmt.

Die Zellen wurden in Rouxflaschen oder Petrischalen ausgesät und bei 37°C kultiviert.

3.1.1.2. Kultur permanenter L929-Zellen

Bei L929-Zellen handelt es sich um permanente Mausfibroblasten, die in MEM mit 5% FCS kultiviert werden. Zum Ablösen der Zellen wurde 0,5% Trypsin verwendet.

3.1.1.3. Kultur von 293T-Zellen

293T-Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS kultiviert und mit ATV abgelöst.

3.1.2. Passagieren von Zellen

Zum Passagieren von Zellen wurde das Kulturmedium abgegossen und der konfluente Zellrasen zweimal mit 0,5% Trypsin gespült, wobei die Zellen von Trypsin benetzt bleiben. Nach ein bis zwei Minuten im Brutschrank löst sich der Zellrasen ab. Die Zellen wurden in MEM suspendiert und ihre Konzentration in der Zählkammer bestimmt. Die gewünschten Mengen wurden in neue Gefäße umgesetzt und mit MEM aufgefüllt.

3.1.3. Analyse der Zellproliferation

3.1.3.1. ³H-Thymidin-Test

Im ³H-Thymidintest wird die Zellproliferation über die Einbaurrate von Tritium (³H)-markiertem Thymidin in die zelluläre DNA bestimmt. Diese ist proportional zur DNA-Synthese bzw. zur Zellproliferation. Aussagen auf Einzelzellniveau sind nicht möglich, da die Thymidineinbaurrate aller Zellen eines Napfes insgesamt gemessen wird, die beispielsweise auch von der Zellzahl abhängt.

Die verwendete ³H-Thymidinlösung wurde aus der Stocklösung (spezifische Aktivität 6,7 Ci/mmol, 1mCi/ml in RPMI⁺ ohne FCS) durch 1:100-Verdünnung mit RPMI⁺ ohne FCS hergestellt (10μCi/ml). Die Zellen wurden auf eine 96-Napf-Flachbodenplatte pipettiert und nach Behandlung (Interferonzugabe) über den jeweils gewünschten Zeitraum im Brutschrank kultiviert. Die radioaktive Markierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von je 25 μl ³H-Thymidinlösung. Nach weiteren 16 Stunden im Brutschrank erfolgte die Analyse. Dazu wurden die Zellen durch ein Zellerntegerät mit Wasser aus den Nöpfen auf einen Glasfaserfilter gesaugt, der genomische DNA auffängt, während nicht eingebautes ³H-Thymidin weggespült wird. Der Filter wurde getrocknet, mit Szintillationsflüssigkeit getränkt und in Plastikfolie eingeschweißt. Die Szintillationszählung erfolgte im Beta-Counter über 60 Sekunden für jeden Wert.

3.1.3.2. CFSE-Färbung

Die Methode der CFSE-Färbung erlaubt die Analyse der Zellproliferation auf Einzelzellniveau. Der in geringer, nicht zytotoxischer Konzentration anzuwendende Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) bindet kovalent an zytoplasmatische Proteine. Bei jeder Zellteilung verteilt sich der Farbstoff auf beide Tochterzellen, so daß sich die Fluoreszenzintensität jeweils halbiert. Der Referenzwert für ungeteilte Zellen ist für jede Messung neu festzulegen, da die Fluoreszenz auch in sich nicht teilenden Zellen langsam abnimmt.

Die Fluoreszenzintensität kann am FACScan in der ersten (Grün-) Fluoreszenz quantitativ bestimmt werden und gibt Aufschluß über die bis zum Zeitpunkt der Messung abgelaufenen Teilungszyklen.

Die Zellen wurden für die Färbung mit Trypsin (0,5%) abgelöst, in MEM mit 5% FCS resuspendiert und zehn Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert. Es wurde zweimal mit 20 ml BSS gewaschen, um eine vollständige Entfernung des FCS zu erreichen, da sonst eine Bindung des CFSE an die enthaltenen Proteine erfolgt wäre. Die Zellen wurden in 10 ml BSS aufgenommen und auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilt. Ein Ansatz wurde mit CFSE (5 µl auf 5 ml Zellsuspension) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, der andere als Kontrollansatz weitergeführt. Anschließend wurde mit MEM (5% FCS) auf 50 ml aufgefüllt, erneut zentrifugiert, in MEM resuspendiert und die Zellen bis zur Analyse im FACScan dünn ausgesät.

3.1.4. Flußzytometrie

3.1.4.1. Zellanalyse mit dem FACScan

Die Zellanalyse mit dem FACScan (Fluorescence Activated Cell Scan) beruht auf dem Prinzip, daß die Zellen im Analysegerät einzeln einen Laserstrahl passieren, der sie zur Fluoreszenz anregt. Das hierbei emittierte Licht spezifischer Wellenlänge wird von unterschiedlichen Detektoren registriert, wobei außer der Fluoreszenzintensität die Zellgröße durch den „forward scatter“ und die

Granularität durch den „side scatter“ ermittelt wird. Mit dem verwendeten Gerät konnten Lichtemissionen in drei Wellenlängenbereichen detektiert werden, die durch die Fluoreszenzfarbstoffe FITC (Fluorescein; 1. Fluoreszenz), PE (R-Phycoerythrin; 2. Fluoreszenz) und RED 670 (PE-Cy 5, Cychrom ; 3. Fluoreszenz) repräsentiert werden.

Für die Analyse wurden die Zellen mit 0,5% Trypsin abgelöst, 10 Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert, in FACS-Puffer aufgenommen und in spezielle FACS-Röhrchen überführt.

3.1.4.2. Zellsortierung mit dem FACS-Vantage

Neben der Messung der Fluoreszenzintensität besteht die Möglichkeit, fluoreszierende Zellen gegenüber nicht fluoreszierenden Zellen anzureichern.

Hierfür wurden die Zellen trypsiniert und in Medium ohne FCS aufgenommen. Die Sortierung und Aufbewahrung der Zellen im Sortiergerät erfolgte in MEM mit 5% FCS. Nach der Sortierung wurden die Zellen zweimal mit MEM gewaschen, um eine Kontamination der Probe zu vermeiden.

3.1.5. Infektion von L929-Zellen mit Virus und Plaquetest

3.1.5.1. Infektion von L929-Zellen mit VSV und Sindbis-Virus

Für die Infektion wurden je $2 \cdot 10^5$ L929-Zellen auf 12-Napf-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurde die Zellzahl pro Napf bestimmt und anschließend die einzusetzende Virusmenge für eine Infektion mit 10 bzw. 30 PFU errechnet. In PBS wurde eine Virussuspension der erforderlichen Konzentration hergestellt.

Dann wurde das Medium von den Zellen abgenommen, zweimal mit 1 ml PBS gespült und 150 µl der entsprechenden Virussuspension zugegeben. Die Adsorption erfolgte für die Dauer von einer Stunde im Brutschrank, wobei alle 15 Minuten die Virussuspension durch vorsichtiges Schwenken neu verteilt wurde. Die Virussuspension wurde entfernt und nach zweimaligem Spülen mit PBS wurden je 1,5 ml Medium zu den Zellen gegeben. Nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten wurden die Überstände mit den darin enthaltenen Viren abgenommen und bei -70°C aufbewahrt.

3.1.5.2. Bestimmung des Virusgehalts der gewonnenen Überstände im Plaquetest

Der Plaquetest wurde auf konfluent wachsenden L929-Zellen in Petrischalen durchgeführt. Die aufgetauten Virusüberstände wurden je nach zu erwartendem Virusgehalt zwischen $1:10^{-2}$ und $1:10^{-7}$ in PBS verdünnt. Von den vorbereiteten Petrischalen wurde das Medium abgenommen, zweimal mit PBS gespült und 0,5 ml der Virusverdünnung einpipettiert. Die Adsorption erfolgte wiederum für eine Stunde im Brutschrank unter gelegentlichem Schwenken. In dieser Zeit wurde eine 1:1-Mischung aus 3%iger Seaplaque-Agarose und doppeltem MEM vorbereitet. Nach der Adsorption wurde der Virusüberstand entfernt und je 4 ml Agar-Overlay auf die Zellen gegeben. Die Petrischalen wurden bis zum Erstarren der Agarose lichtgeschützt in einen kühlen Raum gestellt und dann wieder im Brutschrank aufbewahrt.

Nach 24 Stunden wurden weitere 2 ml Agar-Overlay mit 2 ml Neutralrot auf 30 ml Agarosemischung dazugegeben. Da durch Neutralrot nur intakte Zellen angefärbt werden, ließen sich nach weiteren 24 Stunden die durch die adsorbierten Viren zerstörten Zellen in Form von farblosen Plaques im rot gefärbten Zellrasen erkennen. Aus der Anzahl der Plaques wurde der Virusgehalt der ursprünglichen Virusüberstände berechnet.

3.2.DNA-Techniken

3.2.1. Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA

50 µl kompetente Bakterien des E.coli-Stamms TopF wurden nach dem Auftauen mit 0,5 µl der jeweiligen DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 90 Sekunden in einem auf 42°C temperierten Wasserbad und weiteren 2 Minuten auf Eis wurden die Bakterien in Reagenzgläser mit 10 ml LB überführt und 1 Stunde bei 37°C und 200 Upm im Inkubator geschüttelt. Anschließend wurden sie auf LB-Agar-Platten mit Antibiotikazusatz ausgestrichen. Während der Inkubation der Platten über Nacht im Brutschrank erfolgte eine Anreicherung der transformierten Bakterien unter Ausnutzung der übertragenen Antibiotikaresistenz.

3.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen in einer Maxipräparation

Die Amplifikation der Plasmid-DNA erfolgte durch Beimpfung von 200ml LB-Medium mit 50 µl einer dichtgewachsenen Flüssigvorkultur. Das inokulierte Medium wurde bei 37°C für 12 Stunden auf einem Inkubator bei 200 UpM geschüttelt.

Für die Zellernte wurde die Zellsuspension in 500 ml-Zentrifugenbecher überführt und 15 Minuten bei 4°C und 6000 UpM im GS3-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 10 ml P1 resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte in einem 30 ml-Zentrifugenröhrchen durch Zugabe von 10 ml P2, sechsmaliges Invertieren des Röhrchens und fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 10 ml P3 wurden die Röhrchen für 20 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zelltrümmer 30 Minuten bei 4°C und 13000 Upm im SS34-Rotor abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und nochmals 15 Minuten zentrifugiert.

QIAGEN-Säulchen wurden mit 10 ml QBT äquilibrirt und sofort im Anschluß an die Zentrifugation mit dem Überstand beschickt. Anschließend wurde zweimal mit je 30 ml QC gewaschen. Die Elution der in den Säulchen befindlichen Plasmid-DNA erfolgte mit 15 ml QF in neue Zentrifugenröhrchen. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wurde die Plasmid-DNA ausgefällt und 30 Minuten bei 4°C und 13000 UpM abzentrifugiert, in 10ml 70% Ethanol gelöst und nochmal 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstands wurde die Plasmid-DNA bei Raumtemperatur getrocknet und in destilliertem Wasser aufgenommen.

3.2.3. Transfektion von 293T-Zellen zur Gewinnung von Retrovirus-haltigen Überständen

Die Kultivierung von 293T-Zellen erfolgte in DMEM mit 10% FCS, zum Ablösen der Zellen wurde ATV eingesetzt. Für die Transfektion wurden je $2,5 \cdot 10^5$ Zellen auf Petrischalen mit 5 cm Durchmesser pipettiert.

Am nächsten Tag wurde der Transfektionsmix aus 425 μ l sterilem, entionisiertem Wasser, 5 μ l „packaging“ DNA, 7 bis 10 μ l der gewünschten Plasmid-DNA und 65 μ l 2 M CaCl_2 in autoklavierte Eppendorfcaps pipettiert, gevortext, 500 μ l HBS 2*-Puffer dazugegeben und mit der Pipette unter Aufschäumen gemischt. Die 293T-Zellen wurden mit je 4 ml frischem DMEM überschichtet, der Transfektionsmix gleichmäßig über die Zellen verteilt und vorsichtig gemischt. Nach 24 Stunden wurde der Überstand durch frisches DMEM ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium mit den nun darin enthaltenen Retroviren geerntet und zur Stabilisierung mit 0,1% Polybren versetzt.

Zu den 293T-Zellen wurde erneut DMEM gegeben und der Erntevorgang nach 24 und 48 Stunden wiederholt.

3.2.4. Transduktion von L929-Zellen

Für die Transduktion wurden die Zellen mit 0,5% Trypsin abgelöst, in MEM resuspendiert und nach zehnminütiger Zentrifugation bei 1000 U/min mit MEM gewaschen. Die Transduktion wurde mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt.

Im ersten Ansatz wurde jeweils 1 ml der Retrovirussuspension und 0,1 ml der Suspension von L-Zellen ($1,2 \cdot 10^6$ Zellen/ml) in eine 24-Napf-Platte pipettiert. Die Absorption erfolgte über Nacht. Anschließend wurden die Virusüberstände entfernt und durch je 1 ml MEM ersetzt.

Im zweiten Ansatz wurden zu 4 ml der L-Zellen-Suspension 2 ml der Retrovirussuspension pipettiert und der Ansatz für die Absorption drei Stunden bei 30°C und 2000 U/min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurden die

Zellen in 10 ml MEM resuspendiert und je 1 ml auf zehn Nöpfe einer 24-Napf-Platte ausgesät.

3.2.5. Selektion der Transduktanten

Die Selektion der Transduktanten erfolgte anhand eines kotransduzierten Neomycinresistenzgens, welches in eukaryontischen Zellen Resistenz gegen das Zellgift Gentamycin (G418) bewirkt.

Den L929-Zellen wurde G418 in den Konzentrationen 1 mg/ml MEM, 500 µg/ml MEM und 250 µg/ml MEM zugesetzt, ein Kontrollansatz wurde ohne G418 weitergeführt.

3.3.RNA-Techniken

3.3.1. Isolation der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des Trizol-Reagenz (Gibco) nach dem mitgelieferten Protokoll isoliert. Es wurden ausschließlich RNase-freie Plastikwaren und Lösungen eingesetzt.

Die L929-Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, in MEM aufgenommen und abzentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellen in 1 ml Trizol resuspendiert. Durch das Trizol wurden die Zellen lysiert und die Zellproteine aufgrund des enthaltenen Guanidiniumisothiocyanats denaturiert, wodurch ein enzymatischer Abbau der RNA verhindert wurde. Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, mit 200 µl Chloroform versetzt, gut durchmischt und nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur zentrifugiert (15 min, 13000 Upm, 4°C), um klar getrennte Phasen zu erhalten. Die wässrige, RNA enthaltende Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, ohne die organische Phenol/Chloroform-Phase und die das gefällte Protein enthaltende Interphase zu berühren. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde die RNA zehn Minuten bei Raumtemperatur gefällt, sedimentiert (10 min, 13000 Upm, 4°C) und nach vollständigem Absaugen des Überstands mit 75% Ethanol gewaschen (10 min, 13000 Upm, 4°C). Nach erneutem Absau-

gen des Überstands wurde die RNA getrocknet und in 11 µl DEPC-H₂O gelöst. Für die Messung der RNA-Konzentration wurde eine 1:70-Verdünnung (1 µl auf 69 µl H₂O) hergestellt.

3.3.2. RNase Protection Assay

Der RNase Protection Assay ist eine hochsensitive und spezifische Methode zum quantitativen Nachweis von mRNA. Die zu untersuchenden mRNAs, beispielsweise für den Nachweis der virusinduzierten Interferonexpression auf mRNA-Ebene, wurden als Template-Set in Form von Plasmiden geliefert, die neben den interessierenden cDNA-Fragmenten Promotoren des Bakteriophagen T7 enthalten. Mit Hilfe der DNA-abhängigen RNA-Polymerase von T7 wurden die cDNA-Fragmente in radioaktiv markierte antisense RNA-Proben transkribiert. Die RNA-Proben wurden mit der in Lösung befindlichen nachzuweisenden mRNA hybridisiert und verbleibende einzelsträngige RNA durch RNasen abgebaut. Die durch Hybridisierung vor Abbau „geschützte“ mRNA wurde gereinigt und im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Ergebnis wurde durch Filmbelichtung oder im Phosphorimager zur Darstellung gebracht.

3.3.2.1. Synthese der [³²P]-markierten RNA-Probe

Für den Versuch wurden ausschließlich RNase-freie Eppendorf-Reaktionsgefäße und Pipetten verwendet. [α -³²P]-UTP, GACU-Nukleotid-Pool, DTT, 5X Transkriptionspuffer und Template-Set wurden auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurde der Reihe nach folgendes in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert: 1 µl RNasin, 1 µl GACU-Nukleotid-Pool, 2 µl DTT, 4 µl 5X Transkriptionspuffer, 1 µl Template-Set, 10 µl [α -³²P]-UTP und 1 µl RNA-Polymerase, die bis kurz vor Gebrauch bei -20°C aufbewahrt wurde. Nach gründlichem Mischen durch Pipettieren und einstündiger Inkubation bei 37°C wurde die cDNA aus dem Template-Set durch Zugabe von 2 µl DNase und halbstündige Inkubation bei 37°C zerstört und somit die Synthese der markierten RNA-Proben beendet.

Nach Zugabe von 26 μl 20 mM EDTA, 50 μl Chloroform und 2 μl Hefe-RNA und gründlichem Emulgieren wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, 50 μl Ammoniumacetat und 250 μl eiskaltes Ethanol (100%) hinzupipettiert und das Gefäß für drei bis vier Minuten auf Trockeneis gestellt. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 4°C wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment mit 100 μl Ethanol (70%) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (fünf Minuten bei 4°C) und Entfernen des Überstands wurde das RNA-Sediment bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 μl Hybridisierungspuffer durch Vortexen gelöst.

An einer Probe von 1 μl wurde die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen, wobei sich Werte von ca. 3×10^6 Cherenkov counts/ μl ergaben. Für die weiteren Schritte war bei zehn bis fünfzehn zu untersuchenden Proben der Einsatz von 3×10^4 counts pro zu erwartender Bande ausreichend.

3.3.2.2. RNA-Hybridisierung

Gleiche Mengen der nach Isolierung und Reinigung in DEPC-H₂O gelösten mRNA-Proben wurden in Eppendorf-Gefäße pipettiert. Die radioaktiv markierte antisense RNA wurde mit Hybridisierungspuffer auf eine geeignete Konzentration verdünnt und jeweils 20 μl zu den vorbereiteten mRNA-Proben gegeben.

Die Eppendorf-Gefäße wurden in einen auf 90°C vorgewärmten Heizblock gestellt, gut abgedeckt und der gesamte Block über Nacht in einem Wärmeschrank mit einer Temperatur von 56°C aufbewahrt, so daß die Hybridisierung erfolgen konnte.

3.3.2.3. Entfernung von Einzelstrang-RNA durch RNase

In einem Eppendorf-Gefäß wurden 6 μl RNase A + T1-Mix mit 2,5 ml RNase-Puffer gemischt. Je 100 μl des RNase-Cocktails wurden zu den RNA-Proben pipettiert und diese für zehn Minuten bei 30°C inkubiert. Dann wurden je 18 μl des Proteinase K-Cocktails (30 μl Proteinase K, 390 μl Proteinase K-Cocktail, 30 μl Hefe-tRNA) hinzupipettiert und 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

Nach Zugabe von 120 µl Chloroform, Vortexen und fünfminütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur wurde die wässrige Phase extrahiert. In einem neuen Eppendorf-Gefäß wurden 120 µl 4 M Ammoniumacetat und 650 µl eiskaltes Ethanol (100%) zugegeben, gevortext und die Gefäße für drei bis vier Minuten auf Trockeneis gestellt. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 4°C wurden die Überstände abgesaugt und die abzentrifugierte RNA mit 100 µl eiskaltem Ethanol (90%) gewaschen. Die RNA wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 5 µl Beladungspuffer gelöst (zwei- bis dreiminütiges Vortexen). Vor dem Laden des Gels wurden die Proben drei Minuten auf 90°C erhitzt.

3.3.2.4. Auftrennung der Proben im Polyacrylamidgel

Die für das Gel verwendeten Glasplatten wurden mit Wasser und Ethanol gereinigt und abgetrocknet.

Zur Herstellung eines 6%igen Polyacrylamidgels wurden 75 ml 40% Acrylamid, 50 ml 10X TBE, 250 g Harnstoff und 200 ml dH₂O mit einem Magnetrührer gerührt bis zur vollständigen Auflösung des Harnstoffs. Pro Gel wurden 40 ml der Mischung verwendet, die nach Zugabe von 300 µl Ammoniumpersulfat (10%) und 40 µl TEMED konstant und unter Vermeidung von Luftblasen zwischen die Glasplatten gegossen wurde. Der eingelegte Kamm konnte nach fünfminütiger Polymerisation des Gels wieder entfernt werden.

Nach einem kurzen Vorlauf mit 1X TBE als Laufpuffer wurde das Gel unter Kontrolle am Geigerzähler mit vergleichbaren Proben beladen. Nach etwa zweistündiger Laufzeit wurde das Gel auf ein Filterpapier übertragen, mit Plastikfolie abgedeckt und zwei Stunden bei 80°C im Vakuumtrockner getrocknet. Anschließend wurde das Gel in die Filmkassette eingelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Der Einfluß von Interferon auf die Zellproliferation von primären Hühnerembryofibroblasten (CEF) und L929-Zellen

Der Einfluß von Interferon auf das Wachstum von CEF und L929-Zellen wurde mit Hilfe des ³H-Thymidin-Tests sowie der FACScan-Analyse nach CFSE-Färbung bestimmt.

4.1.1. Versuch mit primären Hühnerembryofibroblasten

Die Primärkulturen von CEF wurden wie oben beschrieben aus bebrüteten Hühnereiern gewonnen und mit einem Teil der Zellen eine CFSE-Färbung durchgeführt.

Für den ³H-Thymidin-Test wurde je 100 µl Zellsuspension von CFSE-gefärbten und ungefärbten CEF auf die 96-Napf-Platte pipettiert. Es wurde Interferon in den Konzentrationen 200 U/ml, 1000 U/ml und 2000 U/ml eingesetzt und ein Kontrollansatz ohne Interferon weitergeführt. Die Zugabe der ³H-Thymidinlösung erfolgte nach 80 Stunden, die Analyse nach 96 Stunden (vier Tagen). Die folgende Tabelle gibt die Werte in CPM wieder, die am Beta-Counter als Mittelwerte aus jeweils drei Nöpfen mit identischen Ansätzen abzulesen waren.

Tab. 1: Zellproliferation in Abhängigkeit von der Interferonkonzentration

Meßwerte in CPM am Beta-Counter

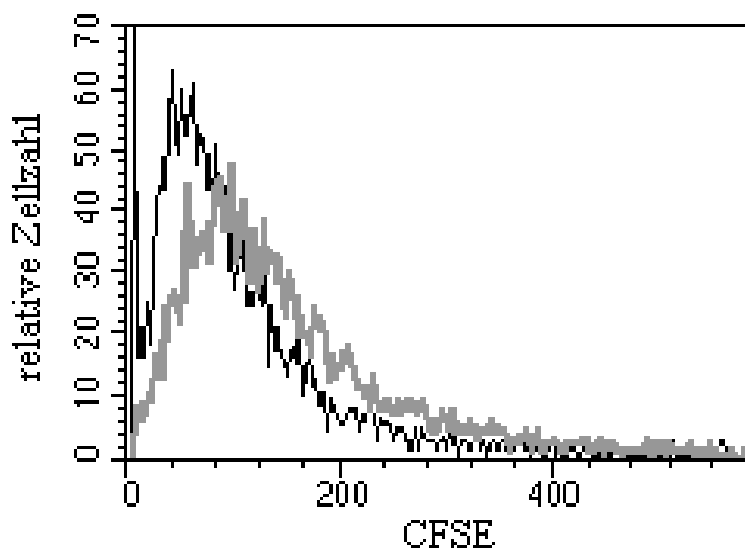
	Ohne IFN	200 U/ml IFN	1000 U/ml IFN	2000 U/ml IFN
Ungefärbte Zellen	2895,7	2118,9	1362,8	1161,8
CSFE-gefärbte Zellen	3545,1	1511,2	1158,6	1128,1

Die Daten zeigen einen konzentrationsabhängigen antiproliferativen Effekt von Interferon an primären Hühnerembryofibroblasten.

Auch die Analyse der CFSE-gefärbten Zellen im FACScan, die ebenfalls nach vier Tagen durchgeführt wurde, ließ diesen Effekt erkennen. Das Diagramm zeigt die FACScan-Analyse von CEF ohne Interferon und CEF mit 2000 U/ml Interferon. Im Ansatz ohne Interferon sind mehr Teilungszyklen abgelaufen, was mit geringeren intrazellulären CFSE-Konzentrationen einhergeht.

Abb. 1: Einfluß von Interferon auf die Proliferation von CEF

Die FACS-Analyse zeigt den antiproliferativen Effekt von Interferon : die Zellen ohne Interferon (schwarze Linie) zeigen aufgrund höherer Teilungsraten geringere CFSE-Konzentrationen als die Zellen mit 2000 U/ml Interferon (graue Linie).



4.1.2. Versuch mit L929-Zellen

In diesem Versuch wurde eine Kinetik durchgeführt, indem die radioaktiv markierten Platten im Abstand von 24 Stunden eingefroren wurden, so daß der Interferoneffekt nach 24, 48 und 72 Stunden festgestellt werden konnte. Als Interferonkonzentrationen wurden 200 U/ml, 1000 U/ml und 5000 U/ml gewählt.

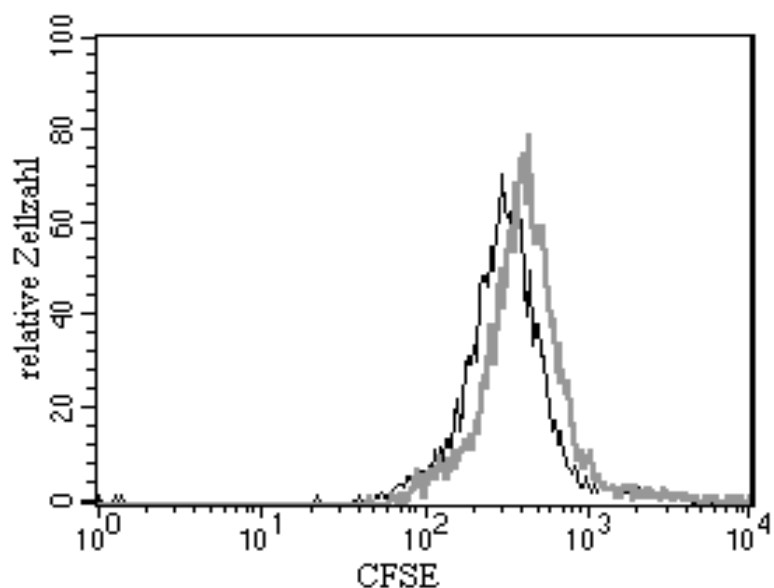
Es zeigte sich wieder eine deutliche Abnahme der ^3H -Thymidin-Einbaurate mit steigender Interferonkonzentration sowie im Verlauf der Kinetik, was in einer Wiederholung des Versuchs bestätigt wurde.

Der antiproliferative Effekt von Interferon ist also auch an L929-Zellen nachweisbar. Eine Zunahme des Interferoneffekts im Zeitverlauf kann anhand dieser Ergebnisse nicht nachgewiesen werden, da auch bei den Kontrollansätzen ohne Interferonbehandlung die ^3H -Thymidin-Einbaurate zurückging, vermutlich aufgrund verminderter Zellproliferation bei zunehmender Konfluenz der ausgesäten Zellen.

Im FACscan ließ sich der konzentrationsabhängige antiproliferative Interferoneffekt nach drei Tagen erkennen. Dargestellt ist die FACscan-Analyse bei 5000 U/ml Interferon im Vergleich zu dem Ansatz ohne Interferon. Aufgrund der höheren Teilungsaktivität zeigen sich im Ansatz ohne Interferon geringere intrazelluläre CFSE-Konzentrationen.

Abb. 2: Einfluß von Interferon auf die Proliferation von L929-Zellen

Die Zellen ohne Interferon (schwarze Linie) zeigen aufgrund höherer Teilungsraten geringere CFSE-Konzentrationen als die Zellen mit 5000 U/ml Interferon (graue Linie).



4.2. Transduktion von L929-Zellen und Makrophagen mit Blimp-1-Gen tragenden Retroviren

Für die Transduktion wurden Retroviren verwendet, die außer dem Blimp-1-Gen ein Markergen für die Fluoreszenzfarbstoffe EGF (enhanced green fluorescence) oder YFP (yellow fluorescent protein) und ein Neomycin- oder Zeocinresistenzgen besaßen. Die Viren für den Kontrollansatz besaßen nur das Markergen und das Resistenzgen.

Die benötigte Plasmid-DNA mit Blimp-1, Markergen und Fluoreszenzgen sowie jeweils einem Gen für die retroviralen Oberflächenproteine wurde in E.coli vermehrt und durch Maxipräparation isoliert. Die Gewinnung der benötigten Retroviren erfolgte durch Transfektion von 293T-Zellen.

Es wurden Retroviren mit den unterschiedlichen Oberflächenproteinen 123 bzw. 456 eingesetzt, um die Effizienz der Transduktion vergleichen zu können.

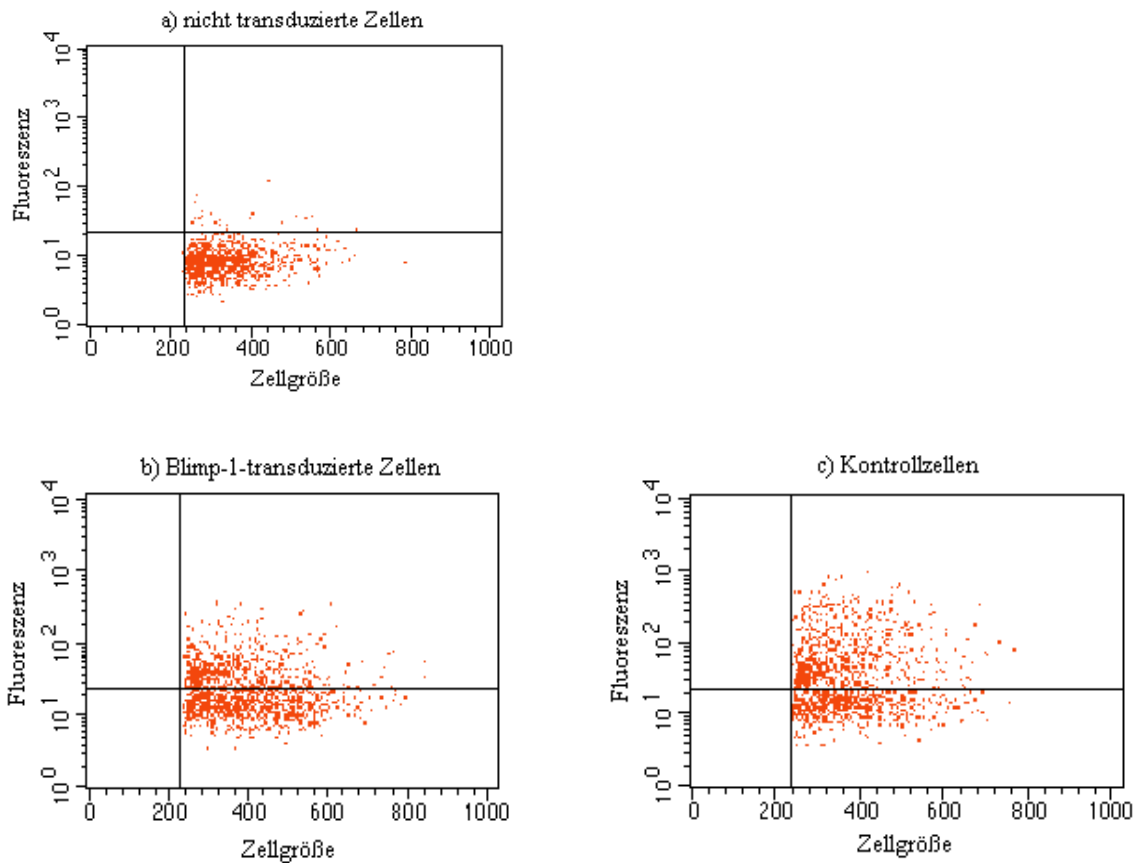
Die Transduktion mit den zunächst verwendeten Retroviren (Markerprotein EGF, Neomycinresistenzgen) wurde nach den beiden oben beschriebenen Methoden, durchgeführt: einmal durch Inkubation der Zellen mit der Retrovirussuspension und einmal durch dreistündige Zentrifugation.

Die Analyse der Zellen im FACScan zeigt eine deutlich effizientere Transduktion bei Verwendung von Retroviren mit den Oberflächenproteinen 456. Außerdem war die zweite aufgeführte Transduktionsmethode mit dreistündiger Zentrifugation während der Absorptionsphase der ersten Methode überlegen. Es folgte nun die Selektion der Transduktanten durch Zusatz von 1 mg/ml, 500 µg/ml bzw. 250 µg/ml G418 zum Nährmedium. Die Analyse im FACScan zeigte nach vier Tagen eine deutliche Anreicherung transduzierter Zellen, die als abgesetzte Population mit hoher Fluoreszenzintensität in Erscheinung traten.

Bei einer Konzentration von 1 mg/ml G418 war die Anreicherung am deutlichsten.

Abb. 3: Transduktion von L929-Zellen

Dargestellt sind a) Zellen vor der Transduktion sowie b) Blimp-1-transduzierte und c) Kontrollzellen nach viertägiger Selektion mit G418.

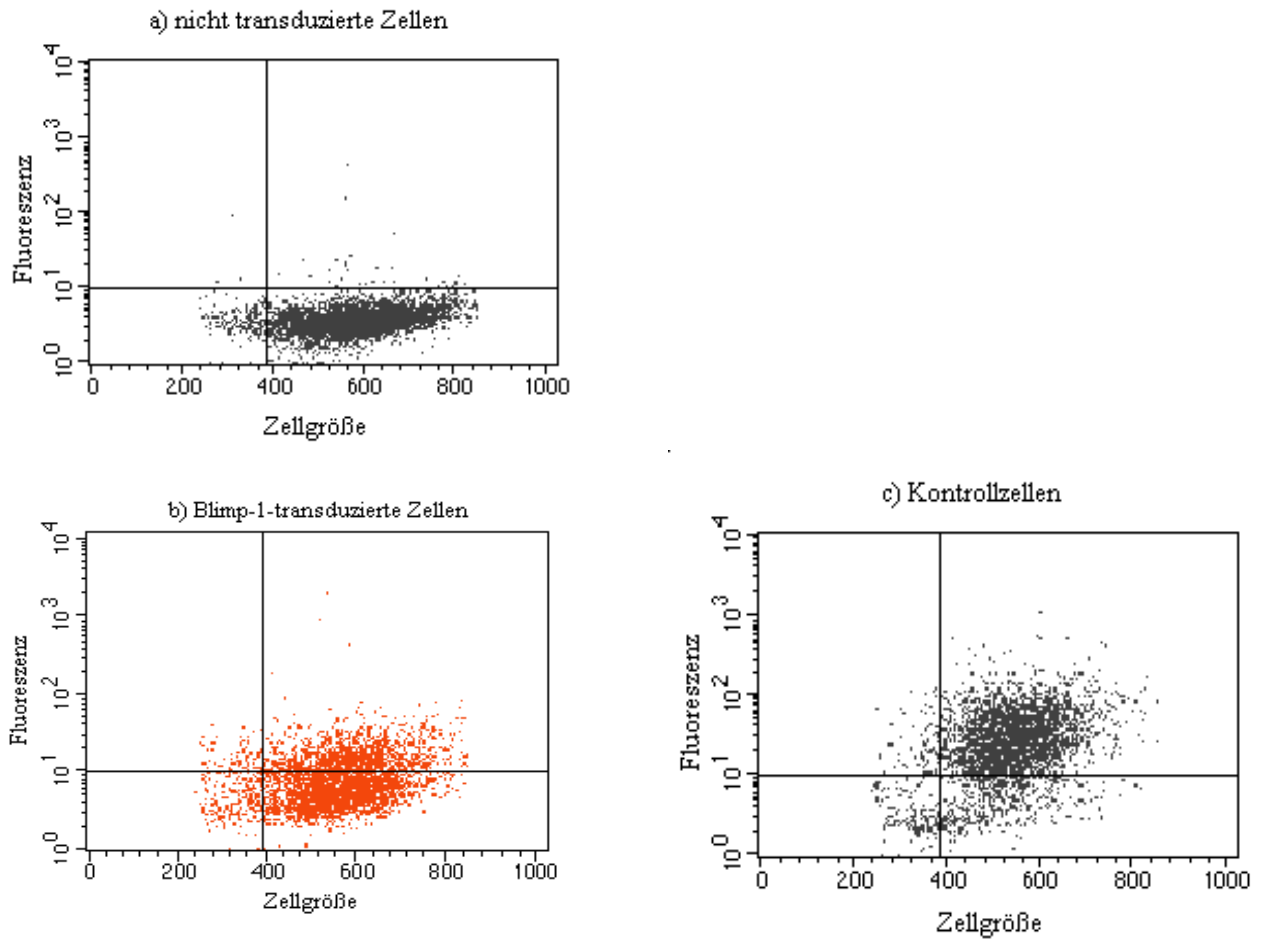


Es ist anzumerken, daß der Anteil transduzierter Zellen in den Populationen mit Blimp-1 in der Regel geringer ausfiel als in den Kontrollpopulationen.

Bei den später hergestellten und eingesetzten Retroviren (Markerprotein YFP, Zeocinresistenzgen) ergab sich eine noch wesentlich effektivere Selektion der Transduktanten durch Zeocin, als dies bei den Zellen mit Neomycinresistenzgen durch G418 möglich war. Die folgende FACscan-Aufnahme zeigt eine Population nach dreitägiger Zeocinbehandlung.

Abb. 4: Transduktion von L929-Zellen

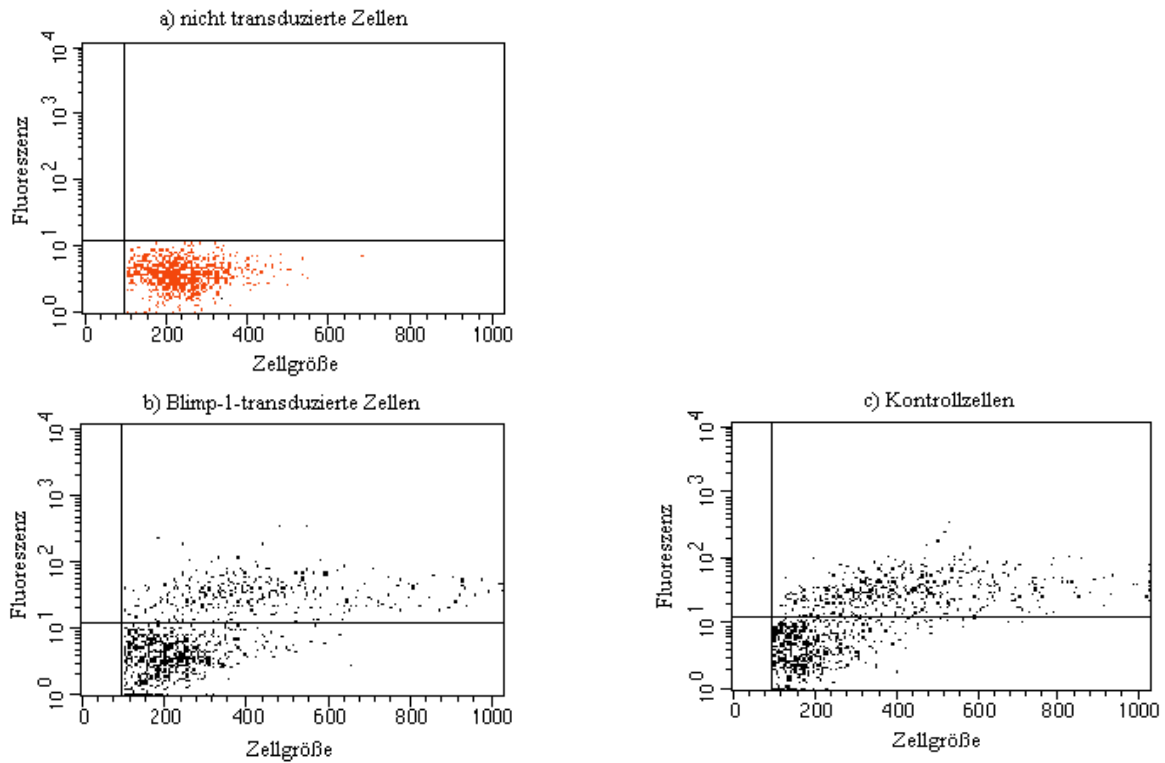
Dargestellt sind a) Zellen vor der Transduktion sowie b) Blimp-1-transduzierte und c) Kontrollzellen nach dreitägiger Selektion mit Zeocin.



Eine versuchsweise Transduktion von Makrophagen durch Zentrifugation war ebenfalls erfolgreich, der Anteil transduzierter Zellen jedoch wesentlich geringer als bei den L929-Zellen.

Abb. 5: Transduktion von Makrophagen

Dargestellt sind a) Zellen vor der Transduktion sowie b) Blimp-1-transduzierte und c) Kontrollzellen nach dreitägiger Selektion mit Zeocin.



Die üblicherweise in Suspension wachsenden Makrophagen zeigten nach der Transduktion ein verändertes Wachstumsverhalten mit fester Zelladhäsion am Boden der Petrischale.

4.3. Einfluß von Blimp-1 auf die Interferonexpression in L929-Zellen

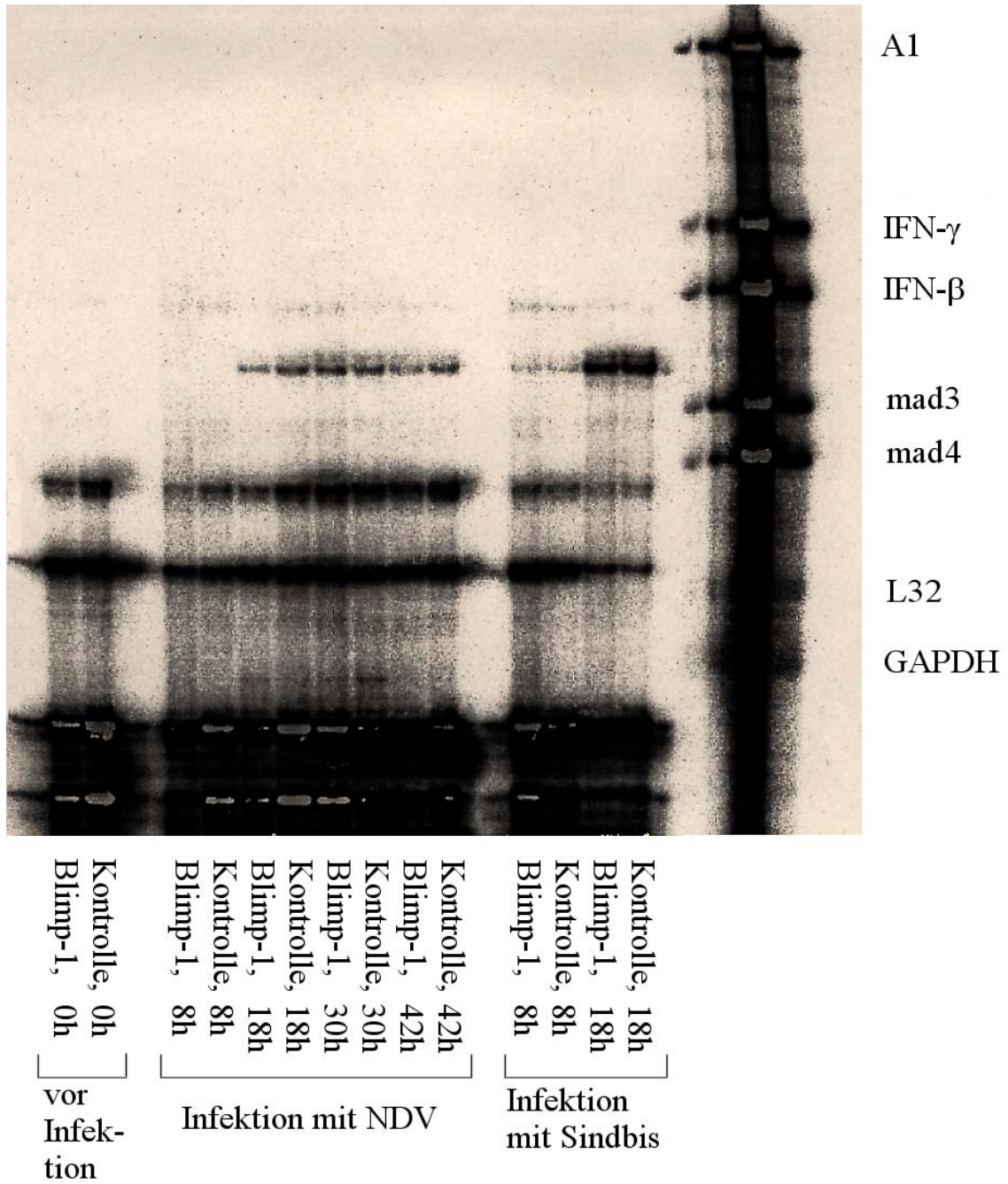
4.3.1. Infektion der Zellen

Blimp-1-transduzierte L929-Zellen und Kontrollzellen wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll mit 30 PFU Sindbis-Virus bzw. Newcastle-Disease-Virus (NDV) infiziert und nach der Adsorption mit frischem Medium überschichtet. Im hier beschriebenen Versuchsansatz wurden die mit Newcastle-

Disease-Virus infizierten Zellen nach 8, 18, 30 und 42 Stunden und die Sindbis-infizierten Zellen nach 8 und 18 Stunden mit Trypsin abgelöst, abzentrifugiert, durch Zugabe von Trizol lysiert und eingefroren. Anschließend wurde die RNA isoliert und die virusinduzierte Interferonexpression auf mRNA-Ebene mit Hilfe des RNase Protection Assay untersucht. Mit dem speziell zusammengestellten Template Set wurden neben den mRNAs für Interferon- β und - γ auch A1, mad3 und mad4 untersucht, außerdem waren L32 und GAPDH als Housekeeping-Gene enthalten. Das Versuchsergebnis ist in Abbildung 6 dargestellt.

Ein weiterer Versuch mit geringfügig anderem Versuchsansatz und anders gewählten Zeitpunkten für die Kinetik bestätigte die Ergebnisse des hier dargestellten Versuchs.

Abb. 6: RNase Protection Assay



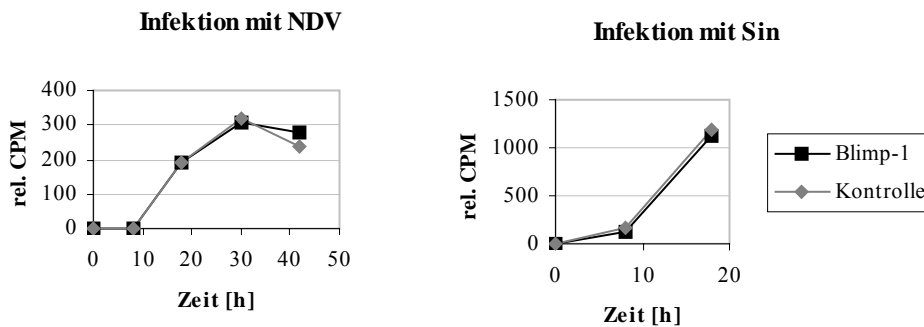
4.3.2. RNase Protection Assay

Eine Expression von A1 in L929-Zellen konnte nicht beobachtet werden.

Für Interferon- γ war eine sehr geringe, durch Virusinfektion nicht induzierbare Expression nachweisbar.

Dagegen zeigen die Banden von Interferon- β eine deutliche virusinduzierbare Expression. Bei den NDV-infizierten Zellen war nach 18 Stunden erstmals eine β -Interferonexpression nachweisbar, die sich nach 30 Stunden verstärkt hatte und nach 42 Stunden schon wieder zurückgegangen war. Die Sindbis-infizierten Zellen wiesen schon nach acht Stunden eine geringe Interferonexpression auf, die sich nach 18 Stunden enorm gesteigert hatte. Ein Unterschied zwischen Zellen mit Blimp-1-Expression und Kontrollzellen war in beiden Fällen nicht nachweisbar.

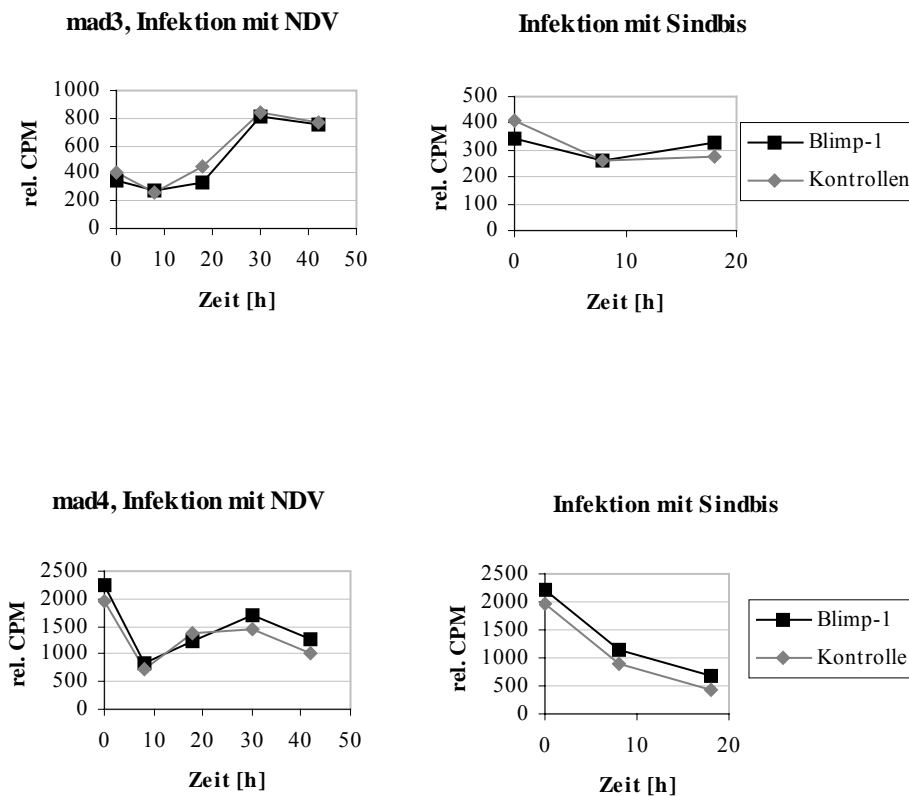
Abb. 7: Expression von Interferon- β



Auch die Expression von mad3 und mad4 wurde durch die Virusinfektion beeinflusst. Nach Infektion mit NDV wurde die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren zunächst vorübergehend reprimiert und stieg dann wieder an bis zum Erreichen eines Maximalwertes, der nach 42 Stunden bereits überschritten war. Die Sindbis-Infektion bewirkte nach acht Stunden ebenfalls eine reduzierte Expression beider Faktoren, die sich im Falle von mad4 nach 18 Stunden noch verstärkt hatte und bei mad3 etwa konstant blieb.

Bei mad4 war ein geringer Unterschied zwischen der Expression durch Blimp-1-transduzierte Zellen und durch Kontrollzellen zu beobachten. Die Blimp-1-transduzierten Zellen zeigen mit Ausnahme des Zeitpunkts 18 Stunden nach NDV-Infektion eine höhere Expression von mad4 als die Kontrollzellen. Bei der Expression von mad3 ist ein solcher Zusammenhang dagegen nicht erkennbar.

Abb. 8: Expression von mad3 und mad4



4.4. Einfluß von Blimp-1 auf die Virusvermehrung in L929-Zellen

4.4.1. Infektion der Zellen

L929-Zellen mit und ohne Blimp-1-Gen wurden wie oben beschrieben mit jeweils 10 PFU und 30 PFU Sindbis-Virus bzw. Vesicular-Stomatitis-Virus infiziert.

Dazu wurden die Zellen auf Petrischalen dünn ausgesät und nach 24 Stunden, noch bevor die Zellrasen Konfluenz erreicht hatten, die Zellzahl pro Schale bestimmt. Wegen der verringerten Teilungsraten der Blimp-1-transduzierten Zellen betrug bei diesen die Zellzahl $6 \cdot 10^5$ /Petrischale, bei den Kontrollzellen $8,5 \cdot 10^5$ /Petrischale.

Nach der Adsorption wurden die Zellen gewaschen und mit je 1,5 ml Medium überschichtet. Um die Kinetik der Virusvermehrung bestimmen zu können, waren jeweils drei Petrischalen mit identischen Ansätzen notwendig. Die virushaltigen Überstände wurden nach 30 Minuten, 10 Stunden und 18 Stunden gewonnen, eingefroren und der Virusgehalt im Plaquetest bestimmt.

4.4.2. Plaquetest

Der Plaquetest auf konfluent wachsenden L929-Zellen wurde zunächst mit $1:10^{-7}$ - und $1:10^{-6}$ -Verdünnungen der Überstände durchgeführt, wobei jeweils 500 μ l der Virusverdünnung verwendet wurden. Anschließend wurden in einem Wiederholungstest weitere Verdünnungen eingesetzt.

Bereits vor der Anfärbung mit Neutralrot war der zytopathische Viruseffekt mikroskopisch in Form von abgekugelten und zerstörten Zellen erkennbar. Die rasche Virusvermehrung in den infizierten Zellen und die Ausbreitung der Viren und somit der Zellzerstörung auf benachbarte Zellen führte zu einer allmählichen Größenzunahme der Plaques, die durch die Anfärbung intakter Zellen mit Neutralrot auch makroskopisch erkennbar wurde. Die Tabellen zeigen die Anzahl der Plaques bei verschiedenen Verdünnungen der virushaltigen Überstände, die nach 30 Minuten, 10 Stunden und 18 Stunden gewonnen wurden. Die Ergebnisse beziehen sich auf die Infektion mit 10 PFU. Bei dem Versuch ist zu berücksichtigen, daß bei der Infektion unterschiedliche Zellzahlen eingesetzt wurden. Daher wurde in der letzten Spalte die Virusproduktion zur Zellzahl ins Verhältnis gesetzt.

Sindbis-Virus

Tab. 2: Plaquetest mit Blimp-1-transduzierten Zellen

	Verdünnung	Anzahl Plaques	Virustiter im Überstand (Viren/ml)	Virusproduktion/ infizierte Zellen
30 min	10^{-2}	24	$4,8 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^{-2}$
10 h	10^{-4}	21	$4,2 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^0$
18 h	10^{-6}	120	$2,4 \cdot 10^8$	$6,0 \cdot 10^2$

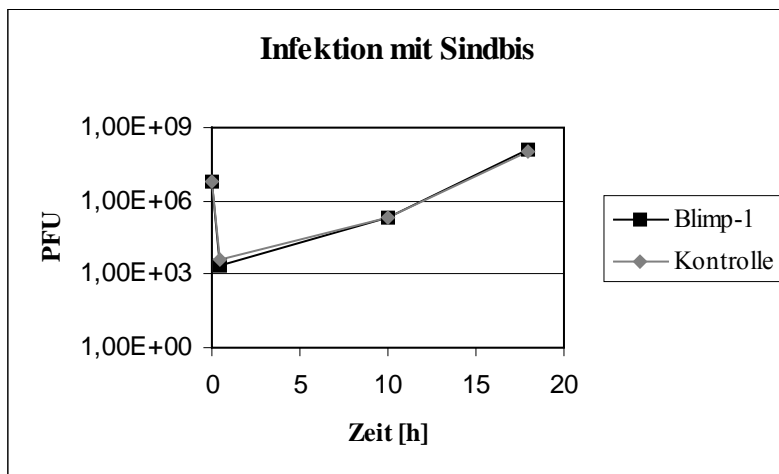
Tab. 3: Plaquetest mit Kontrollzellen

	Verdünnung	Anzahl Plaques	Virustiter im Überstand (Viren/ml)	Virusproduktion/ infizierte Zellen
30 min	10^{-2}	60	$1,2 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^{-2}$
10 h	10^{-4}	32	$6,4 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^0$
18 h	10^{-6}	151	$3,0 \cdot 10^8$	$5,3 \cdot 10^2$

Anhand dieser Daten wurde die Vermehrungskurve der Viren erstellt. Da bei den Kontrollzellen mit größeren Zellzahlen und somit auch größeren Virusmengen gearbeitet wurde, sind die entsprechenden Werte auf die Zellzahl der Blimp-1-transduzierten Zellen ($6 \cdot 10^5$) umgerechnet.

Zum Zeitpunkt 0 h ist die für die Infektion eingesetzte Virusmenge ($6 \cdot 10^5$ Zellen * 10 PFU/Zelle = $6 \cdot 10^6$ PFU) eingetragen. Die geringere Viruszahl zum Zeitpunkt 30 Minuten zeigt, daß die zur Infektion der Zellen eingesetzten Viren durch das Waschen entfernt wurden und daß die Viren in den gewonnenen Überständen tatsächlich aus der Virusreplikation in den Zellen stammen.

Abb. 9: Vermehrungskurve von Sindbis-Virus



Vesicular-Stomatitis-Virus

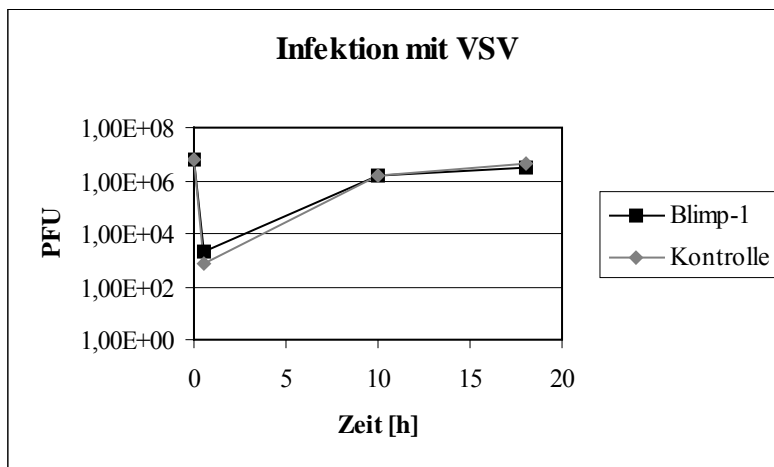
Tab. 4: Plaquetest mit Blimp-1-transduzierten Zellen

	Verdünnung	Anzahl Plaques	Virustiter im Überstand (Viren/ml)	Virusproduktion/ infizierte Zellen
30 min	10^{-2}	20	$4,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^{-2}$
10 h	10^{-5}	16	$3,2 \cdot 10^6$	$8,0 \cdot 10^0$
18 h	10^{-5}	30	$6,0 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^1$

Tab. 5: Plaquetest mit Kontrollzellen

	Verdünnung	Anzahl Plaques	Virustiter im Überstand (Viren/ml)	Virusproduktion/ infizierte Zellen
30 min	10^{-2}	10	$2 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^{-3}$
10 h	10^{-5}	22	$4,4 \cdot 10^6$	$7,8 \cdot 10^0$
18 h	10^{-5}	65	$1,3 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^1$

Abb. 10: Vermehrungskurve von VSV



In diesem Versuch ist kein Einfluß von Blimp-1 auf die Virusvermehrung zu erkennen.

5. Diskussion

Einfluß von Blimp-1 auf die Interferonexpression

Zunächst soll der im RNase Protection Assay untersuchte Einfluß von Blimp-1 auf die Expression von A1, Interferon- γ , Interferon- β , mad3 und mad4 diskutiert werden.

Der an WEHI 231-B-Lymphomzellen erkannte Zusammenhang zwischen der Expression des antiapoptotischen Proteins A1 und Blimp-1 konnte an L929-Zellen wegen fehlender A1-Expression nicht nachvollzogen werden. In frühen Stadien der B-Zell-Differenzierung wurde eine durch Blimp-1 verminderte Expression von A1 beobachtet, die zur Apoptose der Zellen führte (Knödel 1999).

Die sehr geringe, nicht virusinduzierbare Expression von Interferon- γ in L929-Zellen entspricht den Erwartungen, da Interferon- γ typischerweise durch Antigene, Mitogene und Enterotoxine in T_H1-Zellen und natürlichen Killerzellen induziert wird, nicht aber in Fibroblasten.

Dagegen wurde Interferon- β als typisches Fibroblasteninterferon in L929-Zellen, die ja eine permanente Mausfibroblastenlinie darstellen, durch Virusinfektion induziert. Die Interferonexpression erfolgte in Blimp-1-transduzierten Zellen und Kontrollzellen gleichermaßen.

Bei der ebenfalls virusinduzierbaren Expression von mad3 und mad4 waren nur im Falle von mad4 geringfügig höhere mRNA-Spiegel in Blimp-1-transduzierten Zellen als in den Kontrollzellen nachweisbar.

An B-Zellen wurde eine durch Blimp-1 bedingte verminderte Expression von myc/mad-Komplexen bei gleichzeitig vermehrten mad/max-Komplexen beschrieben, was funktionell einem Übergang von der Proliferationsphase früher B-Zellen zur späten Zelldifferenzierung gleichkommt (Knödel 1999). Der in diesem Zusammenhang beschriebene Anstieg der mRNA-Level für mad4 in Anwesenheit von Blimp-1 kann auch in diesem Versuch bei L929-Zellen beobachtet

werden. Der Unterschied zu den Kontrollzellen ist jedoch nur sehr gering und von fraglicher Signifikanz.

Einfluß von Blimp-1 auf die Virusvermehrung

Im Plaquetest konnte kein Einfluß von Blimp-1 auf die Virusvermehrung nachgewiesen werden.

Die alleinige Betrachtung dieses Versuchs läßt jedoch keine sicheren Rückschlüsse auf eine eventuelle Beeinflussung der Interferonproduktion durch Blimp-1 zu. Durch die bei der Infektion eingesetzte große Virusmenge pro Zelle kann die parakrine Wirkung von Interferon an nicht infizierten Zellen hier nicht zum Tragen kommen. Daher hätte eine Beeinflussung der Virusvermehrung durch Blimp-1 nur über die autokrine Interferonwirkung an bereits infizierten Zellen erfolgen können. Aussagen über einen eventuellen Einfluß in vivo unter Einbeziehung parakriner Wirkmechanismen sind nicht möglich.

Da jedoch bei der Untersuchung der Interferonexpression im RNase Protection Assay ebenfalls kein Einfluß von Blimp-1 festgestellt werden konnte, ist auch in diesem Versuch eine Beeinflussung unwahrscheinlich.

In keinem der durchgeführten Versuche zeigte sich ein eindeutiger und signifikanter Unterschied zwischen Blimp-1-transduzierten Zellen und der Kontrollpopulation. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist eine ganze Reihe von Faktoren zu berücksichtigen, die nun diskutiert werden sollen.

Bei der Transduktion von L929-Zellen und der anschließenden Selektion der Transduktanten mit Antibiotika wurden nach Optimierung der Transduktionsbedingungen Populationen mit sehr hohen Anteilen transduzierter Zellen gewonnen, wie die oben abgebildete FACScan-Analyse zeigt. Es ist jedoch auch ersichtlich, daß Blimp-1 nicht in allen Zellen in gleichem Maße exprimiert wird, sondern daß ein Anteil gering exprimierender Zellen vorliegt. Möglicherweise ist die Expression von Blimp-1 in diesen Zellen zu gering, um die Interferonexpression und die Virusvermehrung beeinflussen zu können.

Es wurde außerdem ein verändertes Wachstumsverhalten in den Blimp-1-transduzierten Zellkulturen beobachtet. Die Zellvermehrung war im Vergleich zu den Kontrollkulturen deutlich reduziert, so daß angenommen werden muß, daß innerhalb der transduzierten Zellkulturen der Anteil Blimp-1-exprimierender Zellen im Laufe der Versuche wieder abnahm.

Unter Annahme einer ausreichenden Expression von Blimp-1 in den verwendeten Zellkulturen ist ein weiterer Diskussionsansatz auf der Ebene des Wirkmechanismus von Blimp-1 möglich. Blimp-1 wurde zwar in lymphatischen Zellen von Mäusen, in myeloischen Zellen verschiedener Organismen wie *Xenopus* (Chang 2000), *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* (Tunayaplin 2000) sowie in Zellen ektodermalen, mesodermalen und endodermalen Ursprungs bei Mäuseembryonen nachgewiesen (Chang 2002), man kann jedoch nicht davon ausgehen, daß es natürlicherweise in den verwendeten L929-Mäusefibroblasten exprimiert wird. Somit ist auch nicht sichergestellt, ob diese Zellen mit sämtlichen Faktoren ausgestattet sind, die an dem noch nicht vollständig geklärten Wirkmechanismus von Blimp-1 beteiligt sind, wie etwa der bereits erwähnten Histondeacetylase (Yu 2000). Falls der für PRDI-BF1 beschriebene Signaltransduktionsweg über die Groucho-Proteine auch auf Blimp-1 zutrifft, wäre das ebenfalls nicht gesicherte Vorliegen der Korepressoren hGrg, TLE1 und TLE2 in den L929-Zellen Voraussetzung für die Wirkungsentfaltung von Blimp-1.

Nicht zuletzt ist es denkbar, daß Blimp-1 in den Zellen zwar ausreichend exprimiert wurde und, sei es über die Groucho-Proteine oder einen anderen Signaltransduktionsweg, auch zur Wirkung kam, daß es jedoch in seiner funktionellen Bedeutung von PRDI-BF1 abweicht. Die Möglichkeit einer Bindung von Blimp-1 an die PRDI ist sehr wahrscheinlich, da Blimp-1 die dafür notwendigen Zinkfingerdomänen in 98% Übereinstimmung mit PRDI-BF1 besitzt (Huang 1994). Ob jedoch Blimp-1 ebenso wie PRDI-BF1 als Repressor des Promotors für das Interferon- β -Gen fungiert, bleibt offen, da die Moleküle in ihrer Gesamtheit zu lediglich 90% übereinstimmen und ein Abschnitt von 67 aminoterminalen

Aminosäuren nur bei Blimp-1 vorliegt (Huang 1994). Deshalb könnten für Blimp-1 noch weitere DNA-Bindungsstellen und von Interferonexpression und Virusvermehrung unabhängige Einflüsse auf den Zellstoffwechsel vorhanden sein, die mit den durchgeführten Versuchen nicht erfaßt wurden.

Die Annahme, der Transkriptionfaktor Blimp-1 könne wegen seiner ähnlichen Struktur auch als funktionelles Äquivalent von PRDI-BF1 aufgefaßt werden, muß aufgrund der Versuchsergebnisse in Frage gestellt werden.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation untersucht den Einfluß des Transkriptionsfaktors Blimp-1 auf Interferonexpression und Virusvermehrung in L929-Zellen.

Für den Transkriptionsfaktor PRDI-BF1, der wegen seiner zu 90% identischen Aminosäuresequenz als humanes Äquivalent von Blimp-1 gesehen wird (Huang 1994), wurde bereits 1991 eine regulative Funktion bei der virusinduzierten Interferon- β -Produktion nachgewiesen (Keller und Maniatis 1991), wobei PRDI-BF1 für die Abnahme der nach Virusinduktion intrazellulär akkumulierten mRNA von Interferon- β verantwortlich war. Die Annahme einer ebensolchen negativ regulatorischen Funktion von Blimp-1 war wegen der starken Übereinstimmung insbesondere in den DNA-bindenden Zinkfingermotiven beider Faktoren naheliegend, wurde jedoch in der Vergangenheit nicht überprüft. Blimp-1 wurde vor allem hinsichtlich seiner Rolle bei der Differenzierung von B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluß von Blimp-1 auf die Interferonexpression in virusinduzierten L929-Zellen auf mRNA-Ebene untersucht. Da im Falle einer durch Blimp-1 reduzierten Interferon- β -Produktion eine effektivere Virusvermehrung in den Zellen anzunehmen wäre, wurde die Virusvermehrung in Abhängigkeit von Blimp-1 direkt im Plaquetest an L929-Zellen quantifiziert.

Die Versuchsergebnisse zeigen den zeitlichen Verlauf der Interferonexpression und Virusvermehrung, ein Einfluß von Blimp-1 beim Vergleich mit den nicht Blimp-1-transduzierten Kontrollzellen ist jedoch in keinem der durchgeführten Versuche erkennbar.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß in den Blimp-1-transduzierten Zellkulturen trotz Selektion mit Antibiotika ein Anteil schneller proliferierender, nicht transduzierter Zellen verblieb, wodurch ein eventueller Einfluß von Blimp-1 abgeschwächt würde. Außerdem wird Blimp-1 in L929-Zellen nur unter Versuchsbedingungen exprimiert, was die Frage nach

einem funktionierenden Signaltransduktionsweg für Blimp-1 in diesen Zellen aufwirft. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, daß Blimp-1 nicht wie PRDI-BF1 die Interferonexpression beeinflusst, sondern andere Funktionen als Transkriptionfaktor besitzt. Der fehlende Einfluß von Blimp-1 auf Interferonexpression und Virusvermehrung kann im Rahmen dieser Arbeit nur unter den gegebenen Versuchsbedingungen gezeigt werden.

7. Literatur

Angelin-Duclos C, Cattoretti G, Lin KI, Calame K (2000): Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *J Immunol*, 165: 5462-5471

Au WC, Moore PA, LaFleur DW, Tombal B, Pitha PM (1998): Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes. *J Biol Chem*, 273: 29210-29217

Bogdan C (2000): The function of type 1 interferons in antimicrobial immunity. *Current Opinion in Immunology*, 12: 419-424

Buyse IM, Shao G, Huang S (1995): The retinoblastoma protein binds to RIZ, a zinc-finger protein that shares an epitope with the adenovirus E1A protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 4467-4471

Chang DH, Angelin-Duclos C, Calame K (2000): Blimp-1: trigger for differentiation of myeloid lineage. *Nat Immunol*, 1: 169-176

Chang DH, Calame KL (2002): The dynamic expression pattern of B lymphocyte induced maturation protein-1 (Blimp-1) during mouse embryonic development. *Mech Dev*, 117: 305-309

De Benedetti A, Baglioni C (1983): Phosphorylation of initiation factor eIF-2 alpha, binding of mRNA to 48 S complexes, and its reutilization in initiation of protein synthesis. *J Biol Chem*, 258, 14556-14562

Degen HJ, Blum D, Grün J, Jungwirth Ch (1992): Expression of Authentic Vaccinia Virus-Specific and Inserted Viral and Cellular Genes under Control of an Vaccinia Virus Promotor is Regulated Post-Transcriptionally in Interferon-Treated Chick Embryo Fibroblasts. *Virology*, 188: 114-121

Dinter H, Hauser H (1987): Cooperative interaction of multiple DNA elements in the human interferon-beta promoter. *Eur J Biochem*, 166: 103-109

Erlandsson L, Blumenthal R, Eloranta ML, Engel H, Alm G, Weiss S, Leanderson T (1998): Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Current Biology*, 8: 223-226

- Fu XY, Kessler DS, Veals SA, Levy DE, Darnell JE (1990):** ISGF, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 8555-8559
- Fujita T, Ohno S, Yasumitsu H, Taniguchi T (1985):** Delimitation and properties of DNA sequences required for the regulated expression of human interferon-beta gene. *Cell*, 41: 489-496
- Gribaudo G, Lembo D, Cavallo G, Landolfo S, Lengyel P (1991):** Interferon action: binding of viral RNA to the 40-kilodalton 2'5'-oligoadenylate synthetase in interferon-treated HeLa cells infected with encephalomyocarditis virus. *J Virol*, 65: 1748-1757
- Hannigan GE, Williams BR (1991):** Signal transduction by Interferon-alpha through arachidonic acid metabolism. *Science*, 251: 204-207
- Haque SJ, Williams BR (1994):** Identification and characterisation of an Interferon (IFN)-stimulated response element -IFN-stimulated gene factor 3-independent signaling pathway for IFN-alpha. *J Biol Chem*, 269: 19523-19529
- Harada H, Fujita T, Miyamoto M, Kimura Y, Maruyama M, Furia A, Miyata T, Taniguchi T (1989):** Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell*, 58: 729-739
- Henderson A, Calame K (1998):** Transcriptional regulation during B cell development. *Annu Rev Immunol*, 16: 163-200
- Huang S (1994):** Blimp-1 is the murine homolog of the human transcriptional repressor PRDI-BF1. *Cell*, 78: 9
- Isaacs A, Lindemann J (1957):** Virus Interference: I. The Interferon. *Proc. Royal Society London (B)*, 147: 258-263
- Keller AD, Maniatis T (1991):** Identification and characterization of a novel repressor of beta-interferon gene expression. *Genes Dev*, 5: 868-879
- Keller AD, Maniatis T (1991):** Selection of sequences recognized by a DNA binding protein using a preparative southwestern blot. *Nucleic Acids Res*, 19: 4675-4680

Keller AD, Maniatis T (1992): Only two of the five zinc fingers of the eukaryotic transcriptional repressor PRDI-BF1 are required for sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol*, 12: 1940-1949

Kerr IM, Brown RE (1978): pppA2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75: 256-260

Kerr IM, Stark GR (1991): The control of interferon-inducible gene expression. *FEBS Lett*, 285: 194-198

Kessler DS, Levy DE, Darnell JE (1988): Two interferon-induced nuclear factors bind a single promoter element in interferon-stimulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 8521-8525

Kessler DS, Veals SA, Fu XY, Levy DE (1990): Interferon-alpha regulates nuclear translocation and DNA-binding affinity of ISGF3, a multimeric transcriptional activator. *Genes Dev*, 4: 1753-1765

Klein JB, Schepers TM, Dean WL, Sonnenfeld G, McLeish KR (1990): Role of intracellular calcium concentration and protein kinase C activation in IFN-gamma stimulation of U937 cells. *J Immunol*, 144: 4305-4311

Knödel M, Kuss AW, Lindemann D, Berberich I, Schimpl A (1999): Reversal of Blimp-1-mediated apoptosis by A1, a member of the Bcl-2 family. *Eur J Immunol*, 29: 2988-2998

Lenardo MJ, Fan CM, Maniatis T, Baltimore D (1989): The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. *Cell*, 57: 287-294

Lengyel P (1993): Tumor-suppressor genes: news about the interferon connection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 5893-5895

Levy DE, Kessler DS, Pine R, Reich N, Darnell JE (1988): Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. *Genes Dev*, 2: 383-393

- Levy DE, Darnell JE (1990):** Interferon-dependent transcriptional activation: signal transduction without second messenger involvement? *New Biologist*, 2: 923-928
- Levy DE, Lew DJ, Decker T, Kessler DS, Darnell JE (1990):** Synergistic interaction between interferon-alpha and interferon-gamma through induced synthesis of one subunit of the transcription factor ISGF3. *EMBO J*, 9: 1105-1111
- Lin KI, Angelin-Duclos C, Kuo TC, Calame K (2002):** Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol*, 22: 4771-4780
- Lin Y, Wong K, Calame K (1997):** Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science*, 276: 596-599
- MacDonald NJ, Kuhl D, Maguire D, Naf D, Gallant P, Goswamy A, Hug H, Bueler H, Chaturvedi M, de la Fuente J (1990):** Different pathways mediate virus inducibility of the human IFN-alpha 1 and IFN-beta genes. *Cell*, 60: 767-779
- Marie L, Durbin JE, Levy DE (1998) :** Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO Journal*, 17: 6660-6669
- Messika EJ, Lu PS, Sung JY, Yao T, Chi JT, Chien YH, Davis MM (1998):** Differential effect of B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp-1) expression on cell fate during B cell development. *J Exp Med*, 188: 515-525
- Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, Maruyama M, Harada H, Sudo Y, Miyata T, Taniguchi T (1988) :** Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell*, 54: 903-913
- Novick D, Cohen B, Rubinstein M (1994):** The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell*, 77: 391-400

Petricoin EF, Ito S, Williams BL, Audet S, Stancato LF, Gamero A, Clouse K, Grimley P, Weiss A, Beeler J, Finbloom DS, Shores EW, Abraham R, Larner AC (1997): Antiproliferative action of interferon-alpha requires components of T-cell-receptor signalling. *Nature*, 390: 629-632

Pfeffer LM, Strulovici B, Saltiel AR (1990): Interferon-alpha selectively activates the beta isoform of protein kinase C through phosphatidylcholine hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 6537-6541

Pitha PM, Au W-C (1995): Induction of interferon alpha gene expression. *Seminars in Virology*, 6: 151-159

Reich NC, Pfeffer LM (1990): Evidence for involvement of protein kinase C in the cellular response to interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 8761-8765

Reljic R, Wagner SD, Peakman LJ, Fearon DT (2000): Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *J Exp Med*, 192: 1841-1848

Ren B, Chee KJ, Kim TH, Maniatis T (1999): PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins. *Genes Dev*, 13: 125-137

Schliephake DE, Schimpl A (1996): Blimp-1 overcomes the block in IgM secretion in lipopolysaccharide/anti-mu F(ab')₂-co-stimulated B lymphocytes. *Eur J Immunol*, 26: 268-271

Sciavolino PJ, Lee TH, Vilcek J (1994): Interferon-beta induces metalloproteinase mRNA expression in human fibroblasts. Role of activator protein-1. *J Biol Chem*, 269: 21627-21634

Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, Giltzane JM, Yang L, Zhao H, Calame K, Staudt LM (2002): Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*, 17: 51-62

Sharf R, Meraro D, Azriel A, Thornton AM, Ozato K, Petricoin EF, Larner AC, Schaper F, Hauser H, Levi BZ (1997): Phosphorylation events modulate

the ability of interferon consensus sequence binding protein to interact with interferon regulatory factors and to bind DNA. *J Biol Chem*, 272: 9785-9792

Soro PG, Morales-A P, Martinez-M JA, Copin SG, Marcos MA, Gaspar ML (1999): Differential involvement of the transcription factor Blimp-1 in T cell-independent and –dependent B cell differentiation to plasma cells. *J Immunol*, 163: 611-617

Tunyaplin C, Shapiro MA, Calame KL (2000): Characterization of the B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1) gene, mRNA isoforms and basal promoter. *Nucleic Acids Res*, 28: 4846-4855

Turner CA, Mack DH, Davis MM (1994): Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell*, 77: 297-306

Usui T, Wakatsuki Y, Kaneko S, Koseki H, Kita T, Kosek H (1997): Overexpression of B cell-specific activator protein (BSAP/Pax-5) in a late B cell is sufficient to suppress differentiation to an Ig high producer cell with plasma cell phenotype. *J Immunol*, 158: 3197-3204

Vasanwala FH, Kusam S, Toney LM, Dent AL (2002): Repression of AP-1 function: a mechanism for the regulation of Blimp-1 expression and B lymphocyte differentiation by the B cell lymphoma-6 protooncogene. *J Immunol*, 169: 1922-1929

Watanabe N, Sakakibara j, Hovanessian AG, Taniguchi T, Fujita T (1991): Activation of IFN-beta element by IRF-1 requires a posttranslational event in addition to IRF-1 synthesis. *Nucleic Acids Res*, 19: 4421-4428

Xie M, Shao G, Buyse IM, Huang S (1997): Transcriptional repression mediated by the PR domain zinc finger gene RIZ. *J Biol Chem* 272: 26360-26366

Yap WH, Teo TS, Tan YH (1986): An early event in the interferon-induced transmembrane signaling process. *Science*, 234: 355-358

Yu J, Angelin-Duclos C, Greenwood J, Liao J, Calame K (2000):
Transcriptional repression by Blimp-1 (PRDI-BF1) involves recruitment of
histone deacetylase. *Mol Cell Biol*, 20: 2592-2603

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Virologie und Immunologie der Universität Würzburg unter Anleitung von Frau Prof. Dr. A. Schimpl und Herrn Prof. Dr. C. Jungwirth angefertigt. Ihnen gilt mein herzlichster Dank für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft im Laboralltag und für das gute Arbeitsklima.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. H.-P. Tony für die Übernahme des Korreferates und die Bereitschaft, als Zweitprüfer zur Verfügung zu stehen.

Schließlich bedanke ich mich bei meinen Eltern und meinen Geschwistern Frank und Regine für ihre Unterstützung.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Evelin Schneider
Geburtsdatum	10.05.1978
Geburtsort	Darmstadt
Familienstand	ledig
Eltern	Peter Schneider, Diplomelektroingenieur Irmgard Schneider, Lehrerin
Geschwister	Regine Schneider, Diplombauingenieurin Frank Schneider, Student

Schul Ausbildung

1984 - 1988	Grundschule: Erich Kästner - Schule, Darmstadt
1988 - 1997	Gymnasium: Edith - Stein - Schule, Darmstadt Abschluß: Abitur (Note 1,0)

Hochschulausbildung

11/1997 - 08/1999	Vorklinisches Medizinstudium an der Julius - Maximilians - Universität Würzburg 09/1999 Ärztliche Vorprüfung (Note 1,0)
11/1999 - 09/2002	Klinisches Medizinstudium an der Julius - Maximilians - Universität Würzburg 08/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 09/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2002 - 11/2003	Praktisches Jahr 1. Tertial: Innere Medizin, University of Rochester, New York, USA 2. Tertial: Augenheilkunde, Universitätsklinik Würzburg 3. Tertial: Chirurgie, Notfallstation der Klinik Sonnenhof, Bern, Schweiz
11/2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Abschluß des Medizinstudiums mit der Gesamtnote 1,0

