

Aus dem Institut für Virologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

**Regulation der DNA-Polymerase BALF5 des
Epstein-Barr Virus (EBV) durch die
Virale microRNA miR-BART2**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften**

der medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2007

vorgelegt von Thorsten Pfuhl
geb. am 27.11.1977 in Illingen/Saar

Wissenschaft hat etwas Faszinierendes an sich
So eine geringfügige Investition an Fakten
liefert so einen reichen Ertrag an Voraussagen

Mark Twain

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abbildungen	V
Verzeichnis der Tabellen.....	VII
Verzeichnis der Abkürzungen	VIII
1. Zusammenfassung	1
2. Summary	2
3. Einleitung	3
3.1. Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit	3
3.2. Das Epstein-Barr-Virus (EBV)	4
3.2.1. Allgemeines	4
3.2.2. EBV-Infektion und assoziierte Krankheiten	5
3.2.3. Das EBV Genom	6
3.2.4. Der Replikationszyklus des Epstein-Barr Virus	8
3.2.4.1. Die lytische Infektion.....	8
3.2.4.2. Die latente Infektion.....	9
3.3. Micro-RNA's (miRNA's).....	10
3.3.1. Genomische Organisation und Expression	12
3.3.2. Biogenese.....	14
3.3.3. Mechanismus.....	17
3.3.4. Funktion und Zielgene	18
3.3.5. Micro-RNA's bei EBV	19
4. Material	24
4.1. Chemikalien, Membranen, Filter	24
4.2. Puffer und Lösungen	25
4.3. Enzyme	28
4.4. Größen- und Molekulargewichtsmarker.....	28
4.4.1. DNA-Größenmarker	28
4.4.2. Protein-Molekulargewichtsmarker	28
4.5. Antikörper.....	29
4.6. Zelllinien	30
4.6.1. Epitheliale Zelllinien.....	30

4.6.2.	B-Zelllinien	30
4.7.	Bakterienstämme	31
4.8.	Nähr- und Kulturmedien	31
4.8.1.	Nährmedien für Bakterien	31
4.8.2.	Kulturmedien für Säugerzellen	32
4.9.	Vektoren	32
4.9.1.	Der pGem™-T Vektor	32
4.9.2.	Der pSG5 Vektor	33
4.9.3.	Der pEGFP-C1 Vektor	34
4.9.4.	Der Vektor pGL3-Promoter	35
4.9.5.	Effektorplasmide	36
4.10.	Oligonukleotide (Primer)	38
4.11.	Computersoftware	39
4.12.	Verwendete Laborgeräte	40
5.	Methoden	42
5.1.	Bakterien-Techniken	42
5.1.1.	Aufzucht und Lagerung von Bakterien	42
5.1.2.	Herstellung kompetenter Bakterien	42
5.1.3.	Transformation kompetenter Bakterien	44
5.1.4.	Blue/White Screening	44
5.2.	Kultur eukaryotischer Zellen	45
5.2.1.	Kultur von B-Zellen in Suspension	45
5.2.2.	Kultur von Monolayerzellen	45
5.2.3.	Transfektion eukaryotischer Zellen mit dem Transfektionsreagenz Nanofectin™	46
5.2.4.	Transfektion eukaryotischer Zellen mit dem Transfektionsreagenz Metafectene™	46
5.2.5.	Bestimmung der Zellzahl mit dem Zellanalysegerät CASY™	47
5.2.6.	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	47
5.3.	DNA-Techniken	48
5.3.1.	Isolierung von Plasmid-DNA	48
5.3.1.1.	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipräparation, „Boiling-Präp“)	48
5.3.1.2.	Präparative Plasmidisolierung (NUCLEOBOND™-Methode)	49
5.3.2.	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	51
5.4.	Enzymatische Modifikation von DNA	51
5.4.1.	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)	51
5.4.2.	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	52
5.4.3.	Ligation von DNA-Fragmenten	53
5.5.	Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA	54
5.5.1.	Herstellung eines Agarosegels	54
5.5.2.	Agarosegelelektrophorese	55
5.5.3.	Gene-Clean™-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	56

5.5.4.	Nucleo-Spin™-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	56
5.6.	RNA-Techniken	57
5.6.1.	Isolierung von RNA aus Zellen mittels Trifast™	57
5.6.2.	Northern Blot	57
5.6.2.1.	Herstellung eines harnstoffhaltigen Polyacrylamidgeles	57
5.6.2.2.	Elektrophorese und Membrantransfer	58
5.6.2.3.	Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden am 5'-Ende	59
5.6.2.4.	Herstellung radioaktiv-markierter RNA-Sonden mittels T7-RNA-Polymerase	60
5.6.2.5.	Hybridisierung der Membran	61
5.6.2.6.	Waschen und Exposition	62
5.7.	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	62
5.8.	Real-Time-quantitative PCR	65
5.9.	Der Luciferase-Reporter-Gen-Assay	66
5.10.	Proteintechniken	68
5.10.1.	Herstellung von 2x Sample-Buffer-Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen	68
5.10.2.	Herstellung nativer Proteinextrakte aus eukaryotischen Zellen	69
5.10.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	69
5.10.3.1.	Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels	70
5.10.4.	Western Blot (Immunoblot)	71
5.10.4.1.	Proteintransfer	72
5.10.4.2.	Immunologischer Nachweis von Proteinen	72
5.10.4.3.	Entfernung gebundener Antikörper nach ECL™-Färbung („Stripping“)	73
5.10.4.4.	Immunpräzipitation	74
5.11.	Indirekte Immunfluoreszenz	74
6.	Ergebnisse	76
6.1.	Expression der miRNA-Konstrukte pSG5-miR-BART2 und pSG5-miR-155	77
6.2.	Luciferase-Reporter-Gen-Experimente	79
6.2.1.	Einfluss der miR-BART2 auf die BALF5-3'-UTR	80
6.2.2.	Einfluss der miR-BART2 auf die mutierte BALF5-3'-UTR	81
6.2.3.	Einfluss der miR-BART2 auf die 3'UTR des latenten EBV-Membranproteins LMP2A	83
6.2.4.	Einfluss der miR-BART2 auf den pGL3-Vektor	84
6.2.5.	Einfluss der zellulären miR-155 auf die BALF5-3'-UTR	85
6.3.	Nachweis des BALF5-Proteins mit dem monoklonalen Antikörper 4C12	87
6.3.1.	Western Blot	87
6.3.2.	Immunpräzipitation	89
6.3.3.	Immunfluoreszenz	91
6.4.	Einfluss der miR-BART2 auf die BALF5 Proteinmenge	93
6.5.	Hemmung der miR-BART2 durch „Locked Nucleic Acids“ (LNA's)	96
6.6.	Einfluss des lytischen Zyklus auf die Expression der EBV miR-BART2	99

6.7.	Reduzierung der Repression („De-Repression“) der BALF5 3'UTR im lytischen Zyklus	103
6.8.	Einfluss der miR-BART2 auf die Virusneuproduktion.....	106
7.	Diskussion.....	108
7.1.	Expression der miRNA-Konstrukte	109
7.2.	Translationale Repression und Verringerung der BALF5 Proteinmenge durch die miR-BART2.....	110
7.3.	Spaltung der BALF5-mRNA durch die miR-BART2	111
7.4.	Spezifische Hemmung der miR-BART2	113
7.5.	Einfluss des lytischen Zyklus auf die Expression der miR-BART2	115
7.6.	Viruslast.....	117
7.7.	Bedeutung der EBV-miRNA's für das Virus	118
7.8.	Ausblick.....	123
8.	Literaturverzeichnis.....	125
9.	Anhang	140
9.1.	Vorträge und Poster	140
9.2.	Publikationen	141
9.3.	Danksagung	142
10.	Lebenslauf.....	143

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: EBV-Virionen im Elektronenmikroskop	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung des EBV Episoms.....	7
Abbildung 3: Haarnadelstruktur der Vorläufer von miRNA lin-4 und let-7	11
Abbildung 4: Schema der Biogenese und Funktion humaner miRNA's	16
Abbildung 5: Beispiele EBV-kodierter miRNA's	19
Abbildung 6: Lage der miRNA's im EBV-Genom.....	20
Abbildung 7: Die vorhergesagte Schnittstelle der miR-BART2 in der BALF5-mRNA	23
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Vektors pGEM-T™	33
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Vektors pSG5.	34
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Vektors pEGFP-C1.....	35
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Vektors pGL3-Promoter.....	36
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Effektorplasmide pSG5-miR-BART2 und pSG5-miR-155.	37
Abbildung 13: Northern Blot zum Nachweis der ektopischen Expression der miR- BART2.....	78
Abbildung 14: Northern Blot zum Nachweis der ektopischen Expression der miR-155	79
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Interaktion von miRNA und 3'-UTR ...	80
Abbildung 16: Einfluss der miR-BART2 auf die BALF5-3'-UTR.....	81
Abbildung 17: Schematische Darstellung des pGL3-BALF5-3'-UTR-mut.....	82
Abbildung 18: Einfluss der miR-BART2 auf die mutierte BALF5-3'-UTR.....	83
Abbildung 19: Einfluss der miR-BART2 auf die LMP2A-3'UTR	84
Abbildung 20: Einfluss der miR-BART2 auf den pGL3-Promoter-Ausgangsvektor...	85
Abbildung 21: Einfluss der unspezifischen miR-155 auf die BALF5-3'-UTR.....	86
Abbildung 22: Nachweis des BALF5 Proteins in B95.8-Zellen mit dem mAk 4C12..	88
Abbildung 23: Nachweis des BALF5-Proteins in 293EBV-Zellen mit dem mAk 4C12	89
Abbildung 24: Immunpräzipitation von BALF5 mit dem mAk 4C12	91
Abbildung 25: Immunfluoreszenz von BALF5.....	93
Abbildung 26: Western Blot zur Verringerung der BALF5-Proteinmenge durch die miR-BART2	94

Abbildung 27: Reduktion der BALF5-Proteinmenge durch die miR-BART2	95
Abbildung 28: Einfluss der unspezifischen miR-155 auf die BALF5-Proteinmenge..	96
Abbildung 29: Northern Blot zum Nachweis der Hemmung von mir-BART2 durch ein sequenzspezifisches LNA-Oligonukleotid	98
Abbildung 30: Einfluss einer miR-BART2-spezifischen LNA auf die Expression des Proteins BALF5	99
Abbildung 31: Northern Blot zum Nachweis der miR-BART2 Menge im lytischen Zyklus.....	100
Abbildung 32: Northern Blot zum Nachweis der miR-155-Menge im lytischen Zyklus	101
Abbildung 33: Northern Blot zum Nachweis der miR-BART1 Menge im lytischen Zyklus.....	102
Abbildung 34: Einfluss der reduzierten miR-BART2 Menge auf die BALF5 3'UTR im lytischen Zyklus	104
Abbildung 35: Einfluss der reduzierten miR-BART2 Menge auf die mutierte BALF5 3'UTR im lytischen Zyklus	105
Abbildung 36: Einfluss der ektopischen Expression der miR-BART2 auf die Viruslast im lytischen Zyklus	107
Abbildung 37: Reduktion der Spaltungsaktivität von miR-BART2 im lytischen Zyklus	113
Abbildung 38: miRNA-vermittelte Wirt-/Virus-Interaktionen	119

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Abkürzungen der Aminosäuren:.....	X
Tabelle 2: Beispiele von viralen Zielgenen der EBV miRNA's	21
Tabelle 3: Ideale Agarosekonzentrationen für bestimmte DNA-Trennbereiche	55
Tabelle 4: Komponenten eines 12%igen Polyacrylamidgels zur Auftrennung von RNA	58
Tabelle 5: Pipettierschema eines 100 µl Standard-PCR-Ansatzes.....	64
Tabelle 6: Schema eines verwendeten PCR Standardprogramms.....	65
Tabelle 7: EBV-spezifische Primer für die Real-Time-quantitative PCR.....	66
Tabelle 8: Komponenten für 10%iges und 12,5%iges Polyacrylamidgel.....	71

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Ampere
α	anti
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BL	Burkitt- Lymphom
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C-	Carboxy-
CIP	calf intestinal phosphatase
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBNA	Epstein-Barr Virus nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	„Enhanced Green Fluorescent Protein“
FKS	fötales Kälberserum
GST	Gluthadion-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O _{(bi)dest}	(bi)destilliertes Wasser
HD	Hodgkin's Disease
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
IM	Infektiöse Mononukleose
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge [nm]
LB	Luria's Broth
LNA	“Locked Nucleic Acid”
M	molar
m	Milli-
μ	Mikro
mAK	Monoklonaler Antikörper

MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute
N-	Amino-
NaAc	Natriumacetat
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal)
NPC	Nasopharyngealkarzinom
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
ori	Ursprung der Plasmidreplikation (origin of replication)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pox	Peroxidase
Ran	Ras related nuclear protein
RBP _{Jκ}	recombination signal binding protein jκ
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	simian virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat- Ethylendiamintetraacetat
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris- Ethylendiamintetraacetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNE	Tris-Natriumchlorid- Ethylendiamintetraacetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
V	Volt
V	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
wt	Wildtyp

Tabelle 1: Abkürzungen der Aminosäuren:

Aminosäure	Dreibuchstaben-Code	Einbuchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glycin	Gly	G
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1. Zusammenfassung

Micro-RNA's (miRNA's) sind 19-24 Nukleotide lange, nicht-kodierende RNA Moleküle, welche die Genexpression posttranskriptionell regulieren, indem sie an die 3'UTR ihrer Ziel-mRNA's binden. Eine unvollständige Komplementarität führt zu translationaler Repression und eine vollständige Komplementarität zur Spaltung und dem Abbau der mRNA. Das Epstein-Barr Virus kodiert für 23 miRNA's in den Regionen BHRF und BART. *In silico* wurden virale und zelluläre Zielgene für diese miRNA's vorausgesagt, von denen die viralen fast alle für Proteine kodieren, die im lytischen Zyklus exprimiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion der EBV kodierten miR-BART2 untersucht, welche die virale DNA Polymerase BALF5 als potenzielles Zielgen hat.

Ob BALF5 tatsächlich ein Ziel für miR-BART2 ist, wurde in Luciferase-Reportergeren Experimenten untersucht mit einem Konstrukt, bei dem die Luciferase durch Bindung der miR-BART2 an die BALF5-3'UTR inhibiert werden kann. Dieses zeigte bei Ko-Expression mit der miR-BART2 eine Reduktion der Luciferase-Aktivität um 40%, während die zelluläre miR-155 keinen Einfluss auf den BALF5-3'UTR-Reporter hatte. Eine Deletionsmutante, der die Zielsequenz in der BALF5-3'UTR fehlt, blieb unbeeinflusst von miRNA-BART2. Da die miR-BART2 zu 100% komplementär zu ihrer Zielsequenz in der BALF5-3'UTR ist, konnte in Zusammenarbeit mit Gunter Meister (MPI für Biochemie, Martinsried) in miRNA-vermittelten Spaltungsexperimenten gezeigt werden, dass die mRNA von BALF5 erwartungsgemäß von der miR-BART2 gespalten wird. Diese Spaltungsaktivität verringerte sich nach Auslösen des lytischen Zyklus drastisch und wurde von einer Abnahme der miR-BART2 im Northern Blot begleitet. Die Abnahme der Menge an miR-BART2 im lytischen Zyklus hatte umgekehrt eine Steigerung der Aktivität des Luciferase-BALF5-3'UTR Reporters zur Folge. Diese „De-Repression“ der BALF5-3'UTR spiegelt die gesteigerte BALF5-Synthese nach dem Eintritt in die DNA-Replikation wider

Mittels eines neu hergestellten monoklonalen Antikörpers gegen BALF5 konnte gezeigt werden, dass die BALF5-Proteinmenge bei einer Überexpression von miR-BART2 während des lytischen Zyklus um 40% abnimmt. Gleichzeitig verringerte sich die Viruslast im Überstand EBV-positiver Zellen signifikant um 20%.

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass die EBV-kodierte miR-BART2 den viralen Lebenszyklus beeinflusst, indem sie die Expression der BALF5-DNA Polymerase hemmt und somit einen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Latenz in EBV-infizierten Zellen leistet.

2. Summary

MicroRNAs (miRNAs) are non-coding RNAs of about 19-24 nucleotides that usually bind to partially complementary sites in the 3'UTR of mRNA targets and either repress translation, induce degradation or deadenylation of their targets depending on the sequence complementarity. The Epstein-Barr virus (EBV) encodes at least 23 miRNAs within 2 clusters, the BHRF1- and BART-region. Bioinformatical analyses predicted different viral and cellular target genes with most of the potential viral targets corresponding to lytic genes. The aim of this thesis was to examine the functions of the EBV-encoded miR-BART2 vis-a-vis its predicted target, the EBV DNA-polymerase BALF5.

To show that BALF5 indeed is a target of miR-BART2, luciferase reporter gene assays were performed. Co-expression of a BALF5-3'UTR reporter construct with the miR-BART2 led to a reduction of the luciferase activity of about 40% while the cellular miR-155 had no effect. A mutated construct with a deletion of the miRNA target sequence was not influenced by the miR-BART2. From this it can be deduced that the translational repression by miR-BART2 is specific for BALF5-3'UTR.

In miRNA-guided cleavage assays that were performed in collaboration with Gunter Meister (Max-Planck Institute for Biochemistry, Martinsried) a cleavage of the BALF5-mRNA by the miR-BART2 could be shown in EBV-positive cells. The cleavage activity was drastically reduced upon induction of the lytic viral replication which was paralleled by a decrease in miR-BART2 levels. In accordance with this observation, the activity of the BALF5-3'UTR reporter was strongly induced after induction of lytic replication. This "de-repression" mirrors the situation in the cell after entry into replication with a need for an increase in DNA polymerase.

Using novel monoclonal antibodies against the BALF5 polymerase, it could be demonstrated that forced over-expression of miR-BART2 during lytic cycle replication reduced the levels of BALF5 protein by 40% which was accompanied by a 20% reduction in virus load.

The data presented in this thesis are compatible with the notion that the EBV-encoded miR-BART2 plays a role in the viral life cycle by inhibition of the EBV DNA polymerase BALF5. This may help the virus to maintain the state of latency in infected cells.

3. Einleitung

3.1. Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit

Das Epstein-Barr Virus ist ein humanes Herpesvirus, welches lebenslang unter Ausbildung einer Latenz in B-Zellen persistiert und ursächlich an der Entstehung von Tumorerkrankungen beteiligt ist. In den vergangenen Jahren wurden 23 EBV-kodierte miRNA's beschrieben, für die durch Computeranalysen potenzielle Zielgene sowohl im viralen, als auch im humanen Genom vorausgesagt werden konnten. Über die Funktion dieser miRNA's ist bislang nichts bekannt, es gibt aber Hinweise darauf, dass sie eine Rolle im Lebenszyklus des Virus spielen. So sind die EBV-miRNA's beispielsweise in Zellen mit unterschiedlichen Latenztypen verschieden stark exprimiert (Cai et al., 2006).

Die EBV miR-BART2 weist eine Besonderheit hinsichtlich der vorhergesagten Zielgene auf. Sie wird direkt antisense zu ihrem Zielgen, dem Transkript der EBV DNA-Polymerase BALF5, transkribiert. Somit ist sie zu 100% komplementär zur 3'-UTR von BALF5. Das könnte der Funktion der miRNA zufolge zu einer translationalen Inhibition des BALF5 Proteins, bzw. wegen der vollständigen Komplementarität zu einer Spaltung der mRNA führen. Tatsächlich wurde schon 1993 beschrieben, dass die mRNA von BALF5, die normalerweise eine Länge von 5,1 kb aufweist, in verschiedenen EBV-Zelllinien in verkürzter Form (3,7 kb) vorliegt (Furnari et al., 1993). Pfeffer et al. formulierten später die Hypothese, dass die miR-BART2 genau so an die BALF5-3'UTR bindet, dass die beiden unterschiedlich großen mRNA's entstehen können (Pfeffer et al., 2004).

Ziel der folgenden Experimente war es, die mögliche Interaktion der miR-BART2 mit der EBV DNA-Polymerase BALF5, die ausschließlich im lytischen Zyklus exprimiert wird, zu untersuchen. Die Funktion der miR-BART2 könnte eine Beteiligung am Lebenszyklus von EBV sein, indem sie zur Aufrechterhaltung des latenten Zustands in EBV-positiven Zellen beiträgt. In Luciferase-Reportergen-Experimenten sollte der Effekt der miR-BART2 auf ein Reporterkonstrukt, welches die BALF5 3'UTR im Anschluss an das Luciferasegen trägt, analysiert werden. Mittels eines neu hergestellten monoklonalen Antikörpers gegen BALF5 sollte der Einfluss der miR-BART2 auf die Proteinexpression, erstens nach Auslösen des lytischen Zyklus und

zweitens nach Blockieren der endogenen miR-BART2 durch „Locked Nucleic Acids“ (LNA's) nachgewiesen werden. Die Expression der endogenen miR-BART2 im lytischen Zyklus sollte in Northern Blot Analysen analysiert werden. Eine mögliche Reduktion der Repression von BALF5 durch die miR-BART2 im lytischen Zustand sollte in Luciferase-Reporter-Gen-Assays gezeigt werden („De-Repression“). Um die regulatorische Funktion der miR-BART2 auf den Lebenszyklus von EBV zu bestätigen, sollte die Veränderung der Virusneuproduktion unter Einfluss der miRNA in quantitativen Real-Time-PCR Experimenten untersucht werden.

3.2. Das Epstein-Barr-Virus (EBV)

3.2.1. Allgemeines

Der englische Chirurg Dennis Burkitt beschrieb Ende der fünfziger Jahre erstmals klinische und epidemiologische Eigenschaften eines Lymphoms, das primär bei Kindern in Gelbfieber- und Malariagebieten Zentral- und Ostafrikas auftrat (Burkitt, 1958). Weil dieses Lymphom geographisch nur in diesen Regionen beobachtet wurde, postulierte Burkitt ein infektiöses Agens, das an der Genese der Tumore beteiligt sei. Im Jahr 1964 wurden von Budd Achong, Yvonne Barr und Tony Epstein elektronenmikroskopische Untersuchungen an Ultradünnschnitten von *in vitro* kultivierten Burkitt-Lymphomzellen durchgeführt. Sie konnten nachweisen, dass die Zellen ein Virus enthalten, welches dann nach ihren Entdeckern Epstein-Barr Virus genannt wurde (Epstein et al., 1964). Kurze Zeit später konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das Epstein-Barr-Virus (EBV) befähigt ist, *in vitro* B-Lymphozyten zu immortalisieren (Henle et al., 1967; Pope et al., 1968).

Das Virus gehört zur Familie der *Herpesviridae*, der Unterfamilie der *Gammaherpesvirinae* und der Gattung *Lymphocryptovirus*. Die Lymphokryptoviren kommen nur bei Altwelt Primaten vor, sie haben also nur ein relativ beschränktes Wirtsspektrum. EBV selbst ist der einzige humanpathogene Vertreter der Gattung. Morphologisch hat das Epstein-Barr-Virus einen für Herpesviren typischen Aufbau. Das DNA Genom ist doppelsträngig, linear und 172 kbp groß (Abbildung 2). Es wird von einem ikosaedrischen Nukleokapsid von 100-110 nm Durchmesser umgeben. Das aus 162 Kapsomeren bestehende Nukleokapsid ist eingeschlossen von einer

Lipidmembran (envelope), die eine große Zahl von Glykoproteinen enthält. Das Tegument liegt zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran und enthält mehrere Virusproteine (Rickinson & Kieff, 1996).

Man unterscheidet Typ 1- und Typ 2-EBV. Diese Unterteilung ergibt sich aufgrund von signifikanten Unterschieden in der primären Aminosäuresequenz der Kern-Antigene (Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen) EBNA 2 (47% nicht homolog), EBNA 3A (16% nicht homolog), EBNA 3B (20% nicht homolog) und EBNA 3C (28% nicht homolog). Es werden unterschiedliche zytotoxische T-Zellantworten ausgelöst (Sample et al., 1990). EBV Typ 1 zeigt *in vitro* eine viel höhere Transformationseffizienz als EBV Typ 2 (Rickinson et al., 1987). Das EBV Typ 1 kommt überwiegend in den westlichen Industrieländern vor, wohingegen in Afrika Typ 1 und 2 in annähernd gleicher Häufigkeit auftreten (Rowe & Clarke, 1989; Zimmer et al., 1986).

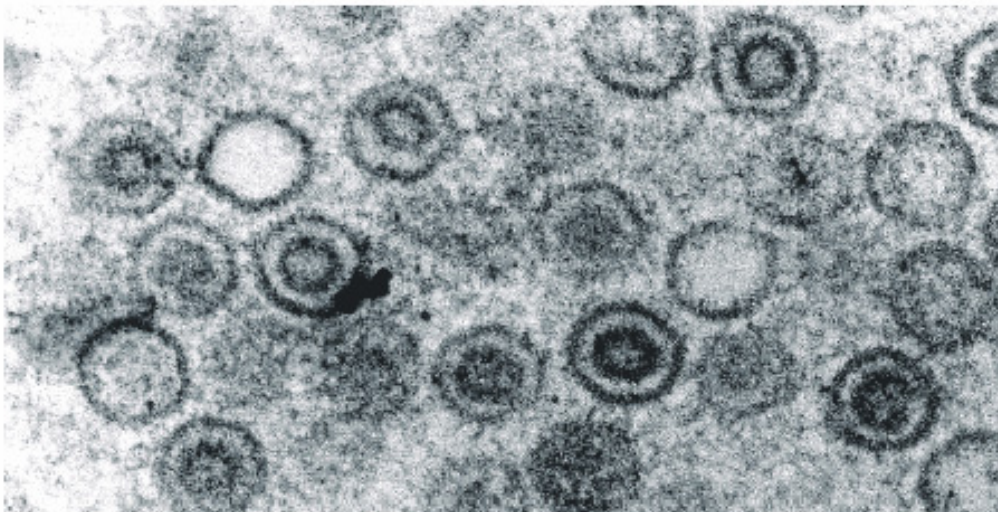


Abbildung 1: EBV-Virionen im Elektronenmikroskop

Negativ gefärbte Epstein-Barr Virionen in Biopsien oraler Haarleukoplakie

3.2.2. EBV-Infektion und assoziierte Krankheiten

Es ist bekannt, dass EBV auf der ganzen Welt verbreitet ist und bis zu 95% aller Erwachsenen seropositiv sind. Diese Menschen besitzen IgG-Antikörper gegen Hüllmembran- und Kapsidproteine des Virus (Gerber et al., 1972). Die Übertragung

erfolgt horizontal durch die Speichelflüssigkeit (Golden et al., 1973). Das Virus wird endozytotisch in die primäre Zielzelle aufgenommen. Dieser Vorgang wird vermittelt über den Glykoproteinkomplex gp220/350 auf der Virushüllmembran und den Komplementrezeptor CD21 (CR2) auf der Oberfläche der Zielzelle. Weil das CD21-Antigen von unreifen B-Lymphozyten in hoher Dichte präsentiert wird, kommen ruhende B-Lymphozyten als primäre Zielzellen in Betracht (Niedobitek et al., 1997). Möglich ist jedoch auch, dass undifferenzierte Epithelzellen des Nasen-Rachenraumes sowie des Zungenrandes, in denen eine produktive, lytische Vermehrung des Virus erfolgt (Greenspan et al., 1985; Morgan et al., 1979; Sixbey et al., 1984), die primären Zielzellen der Virusinfektion darstellen. In gesunden Personen persistiert das EBV in ruhenden, CD23-negativen B-Zellen (Babcock et al., 1998; Gratama et al., 1988; Miyashita et al., 1995).

Im frühen Erwachsenenalter führt die Primärinfektion mit dem Virus in 50% aller Fälle zum klinischen Bild der Infektiösen Mononukleose (Henle et al., 1968; Kieff, 1996). Darüber hinaus wurde das Epstein-Barr-Virus als erstes humanpathogenes Virus kausal mit der Entstehung verschiedener maligner Tumorerkrankungen in Zusammenhang gebracht. Dazu gehören das Burkitt Lymphom (BL), das Hodgkin Lymphom, das Nasopharynxkarzinom (NPC), T-Zell-Lymphome und PTLD (Post-Transplant-Lymphoproliferative Disease). Es ist in der Lage, *in vitro* primäre B-Zellen mit hoher Effektivität zu immortalisieren. Hierbei wachsen latent infizierte, periphere B-Zellen spontan zu lymphoblastoiden Zelllinien (lymphoblastoid cell lines, LCLs) aus. Diese (lymphoblastoiden) Zelllinien exprimieren insgesamt 12 so genannte latente Proteine. Von diesen benötigt das Virus allerdings nur die Kernantigene EBNA1, EBNA2, EBNA3c und EBNA-LP sowie das latente Membranprotein (LMP1) zur Induktion und Aufrechterhaltung des transformierten Zustandes (Bornkamm & Hammerschmidt, 2001).

3.2.3. Das EBV Genom

Das Genom des Epstein-Barr Virus hat eine Größe von 172 kbp und liegt im Nukleokapsid des Virions als lineare doppelsträngige DNA vor (Baer et al., 1984). In infizierten Zellen dagegen findet es sich im Zellkern entweder als kovalent geschlossenes, sich selbst replizierendes Episom oder ins Wirtsgenom integriert

(Henderson et al., 1983; Lindahl et al., 1976). In Abbildung 2 ist das Genom anhand des M-ABA Stammes schematisch dargestellt. Die Terminal Repeats (TR) an den Genomenden sind etwa 500 bp lange repetitive Sequenzen, die der Zirkularisierung des Genoms dienen (Kintner & Sugden, 1979). Im Genom liegen vier „Internal Repeats“ (IR 1-4), die 3,1 kbp lange Sequenzwiederholungen darstellen und das Genom in fünf singuläre Bereiche („Unique Sequences“, UR 1-5) unterteilen. Das Genom verfügt über 2 verschiedene Replikationsursprünge. Der oriLyt dient zu Replikation des Genoms im lytischen Zyklus, während der oriP für die episodale Genomvermehrung in der Latenz verantwortlich ist (Hammerschmidt & Sugden, 1988; Hudewentz et al., 1982; Rawlins et al., 1985; Yates et al., 1984). Aufgrund der hohen Zahl an Wiederholungseinheiten und verschiedener Deletionen ist die Genomlänge bei den einzelnen EBV-Stämmen sehr variabel.

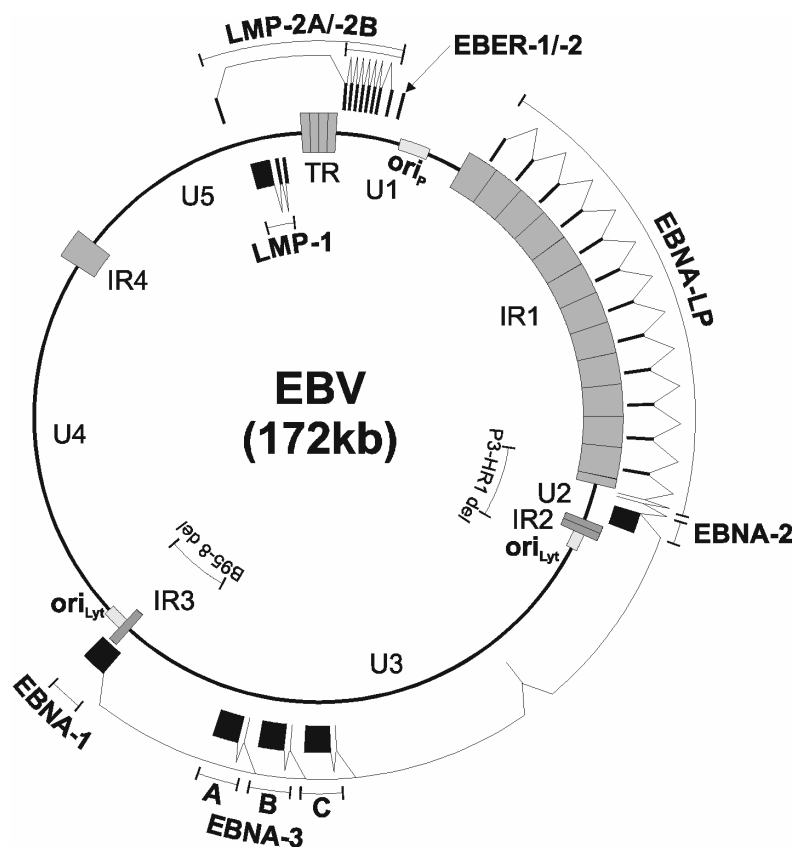


Abbildung 2: Schematische Darstellung des EBV Episoms

Innen: Lage der Deletionen in den EBV-Stämmen B95-8 und P3HR-1 sowie Bezeichnung repetitiver und singulärer Genomabschnitte (TR: "terminal repeat region"; IR1-4: "internal repeat regions" 1-4; U1-U5: "unique regions" 1-5). Die Replikationsursprünge des latenten sowie des lytischen Zyklus sind hellgrau dargestellt und mit *oriP*, bzw. *oriLyt* bezeichnet. *Außen:* Primärtranskripte des latenten Zyklus sowie Lage der einzelnen Exons (Modifiziert nach Kieff, 1996).

3.2.4. Der Replikationszyklus des Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus ist in der Lage in der Wirtszelle eine lytische oder eine latente Infektion auszulösen. In der Latenz wird die virale DNA zusammen mit dem Wirtszellgenom repliziert ohne Bildung neuer Viruspartikel (Aiyar et al., 1998; Rawlins et al., 1985; Yates et al., 1984). Im Gegensatz dazu wird im lytischen Zyklus, der in so genannten „Producer-Zelllinien“ spontan in einer Minderheit von Zellen ablaufen kann, eine große Anzahl von Virionen gebildet, was zu einer Lyse der Wirtszellen führt. Dieser lytische Zyklus kann durch spezielle exogene Stimuli wie beispielsweise TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) oder durch α -Immunglobulin-Behandlung ausgelöst und dadurch der Anteil an lysierten Zellen um bis zu 20% gesteigert werden (Bauer et al., 1982; Faggioni et al., 1986; zur Hausen et al., 1978). Unterschiede zwischen der lytischen und der latenten Phase finden sich in den jeweils aktiven Replikationsursprüngen oriLyt und oriP (Abbildung 2) sowie in unterschiedlichen Expressionsmustern der Virusproteine.

3.2.4.1. Die lytische Infektion

Die Induktion des lytischen Zyklus führt in der Wirtszelle dazu, dass keine zellulären Makromoleküle mehr gebildet werden und sich das zelluläre Chromatin am Kernrand konzentriert während im Kernzentrum virale DNA synthetisiert wird (Gergely et al., 1971). Im Zytoplasma erfolgt der Zusammenbau der Nukleokapside, die dann zum Verpacken der viralen DNA zum Zellkern transportiert werden und anschließend an der inneren Kernmembran umhüllt werden. Die Wirtszelle wird lysiert und die Viruspartikel freigesetzt. Die virale Genexpression verläuft in mehreren Stufen. Im ersten Schritt werden die „Immediate Early Gene“, also die ganz frühen Gene BZLF1 und BRLF1 exprimiert und somit die zugehörigen Proteine Z und R gebildet, die als Transkriptionsfaktoren fungieren (Flemington et al., 1991). Das Z-Protein vermittelt den Übergang von der latenten in die lytische Phase. BZLF1 kann vom eigenen als auch vom BRLF1 Promotor transkribiert werden. Induktion mit TPA führt dazu, dass über den zellulären Transkriptionsfaktor Zif68 die Transkription von BZLF1 über den BRLF1-Promotor aktiviert wird (Zalani et al., 1995). Die Proteine Z und R transaktivieren die Promotoren der frühen Gene BHLF1, BHRF1 und BALF2, die das

Wirtsgenom stilllegen und das virale Genom aktivieren. Beide Proteine induzieren außerdem die Expression der späten Antigene gp350, gp200 und m-VCA (Feederle et al., 2000). Das Z-Protein bindet zusätzlich an oriLyt und wirkt dort als „Origin Binding Protein“ (Fixman et al., 1992; Fixman et al., 1995; Hammerschmidt & Sugden, 1988; Schepers et al., 1993).

Die frühen lytischen Gene sind die DNA Polymerase BALF5, das DNA-Bindeprotein BALF2, die dUTPase BLLF3, die Ribonukleotidreduktasen BORF2 und BARF1, die Thymidinkinase BXLF1 und die alkalische Exonuklease BGLF5 (Kieff, 1996).

Nach der viralen DNA Replikation werden die späten lytischen Gene exprimiert. Es entstehen die viralen Strukturproteine BNRF1 (p143), BLLF1a und b (gp350/220), BXLF2 (gp85), BALF4 (gp15), die das Tegument bilden und BCLF1 (p150), aus welchem sich das Kapsid zusammensetzt (Beisel et al., 1985).

3.2.4.2. Die latente Infektion

Unter dem Begriff Latenz versteht man die Persistenz eines Erregers in einem Wirtsorganismus ohne dort Symptome hervorzurufen. In der Zellkultur kommt es dabei ebenfalls nicht zur lytischen Replikation. Die Gene des Epstein-Barr Virus sind in der lytischen Phase nahezu alle aktiv, während in latent infizierten Zellen *in vitro* nur 11 virale Gene exprimiert werden. Dazu gehören 6 Proteinen, die im Wirtszellkern lokalisiert sind, die sog. Epstein-Barr Virus nukleären Antigene (EBNA). Man unterscheidet EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP („Leader Protein“). Im Gegensatz dazu sind die latenten Membranproteine LMP-1, -2A und -2B in der Membran der Wirtszelle zu finden. Des Weiteren werden kleine nicht polyadenylierte RNA Moleküle, die EBV-kodierten EBER-1 und -2 (EBV-Encoded Small RNA's) transkribiert. Anhand der Expression dieser Gene lassen sich 3 verschiedene Latenztypen unterscheiden. Bei Latenztyp I werden nur EBNA-1 und die beiden Transkripte EBER-1 und -2 generiert und es wird keine zytotoxische T-Zell Antwort induziert (Rowe et al., 1987; Trivedi et al., 1991). Latenztyp II ist typisch für Nasopharyngealkarzinome und Hodgkin-Lymphome und weist eine Expression EBNA-1, LMP-1, -2A und -2B auf (Fahraeus et al., 1988; Raab-Traub et al., 1983; Young et al., 1988). Der Latenztyp III zeichnet sich dadurch aus, dass alle elf

latentem Gen exprimiert werden. Es gibt einen weiteren Latenztyp 0, bei dem nur LMP-2A und die EBER Transkripte vorliegen (Miyashita et al., 1997).

3.3. Micro-RNA's (miRNA's)

Als micro-RNA's bezeichnet man kleine endogene RNA Moleküle, die etwa 19-25 nt umfassen. In Pflanzen und Tieren übernehmen sie regulatorische Funktionen (Ambros, 2003; Bartel, 2004; Cullen, 2004). Je nach Komplementarität zu der Ziel-mRNA kommt es zu deren Spaltung oder zu translationaler Repression.

Die Gene, die für die miRNA's kodieren liegen in zellulären und viralen genomischen Loci. Die daraus entstehenden Transkripte weisen eine spezifische Haarnadelstruktur auf. Daraus werden Zwischenprodukte gebildet, die aus der miRNA und der annähernd komplementären so genannten miRNA* bestehen. Die Gene für die miRNA's sind bei verwandten Organismen oftmals stark konserviert (Cai et al., 2006). Durch die Unterschiede in der Sequenz und der Expressionsmuster entsteht eine spezifische Funktion der miRNA's auf ihre Zielgene. Zu Beginn der 1990er Jahre wurde beschrieben, dass das lin-4 Gen von *C. elegans* nicht für ein Protein kodiert sondern für zwei kleine RNA's mit einer Länge von 22 nt und 61 nt. Nähere Untersuchungen ergaben, dass es sich bei der größeren RNA um den Vorläufer des kleineren Moleküls handelte. Diese kleine lin-4 RNA besitzt Komplementarität zu mehreren Abschnitten der 3'-UTR der lin-14 mRNA. Das LIN-14 Protein ist maßgeblich an der Larvenentwicklung von *C. elegans* beteiligt und steuert den Übergang vom ersten zum zweiten Larvenstadium. Es konnte nun gezeigt werden, dass die Bereiche der 3'-UTR der lin-14 mRNA die Orte sind, an denen die lin-4 RNA sequenzspezifisch binden kann (Wightman et al., 1991). Außerdem wurde eine Abnahme der LIN-14 Proteinmenge, nicht aber der lin-14 mRNA Menge beobachtet.

Etwa 7 Jahre später wurde dann bei *C. elegans* eine weitere 22 nt lange miRNA entdeckt, die vom let-7 Gen kodiert wird und auch an der Larvenentwicklung von *C. elegans* beteiligt ist (Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000). Für beide miRNA's lin-4 und let-7 gilt, dass sie eine wichtige Funktion bei der Entwicklung des Wurmes spielen (Abbildung 3).

Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass diese speziellen kleinen RNA-Moleküle in der Lage sind, an komplementäre Sequenzen in der 3'-UTR von mRNA's zu binden und dadurch eine translationale Inhibition zu vermitteln. Heute weiß man, dass diese Beobachtungen eine neue Klasse von regulatorischen kleinen RNA's begründet haben, die als microRNA's (miRNA's) bezeichnet werden (Lagos-Quintana et al., 2001; Lagos-Quintana et al., 2002; Lau et al., 2001; Lee & Ambros, 2001; Pasquinelli, 2002).

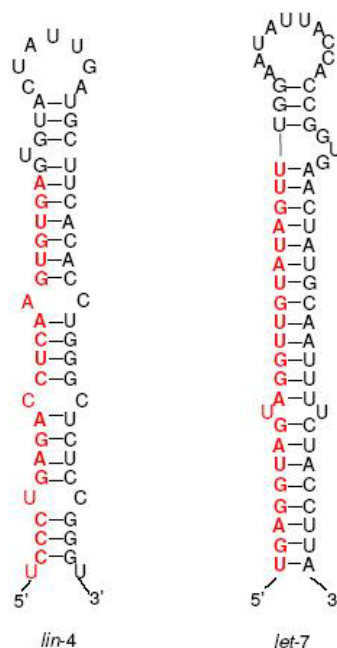


Abbildung 3: Haarnadelstruktur der Vorläufer von miRNA *lin-4* und *let-7*

Dargestellt sind die miRNA-Vorläufer (pre-miRNA's) von *C. elegans*. Charakteristisch sind die spezifischen Haarnadelstrukturen. Die enthaltene miRNA ist jeweils rot markiert (Lagos-Quintana et al., 2001; Pasquinelli et al., 2000).

Später wurden dann auch Homologe zur *let-7* miRNA in Genomen anderer Organismen gefunden, so z.B. in *Drosophila*, Mensch und 11 weiteren bilateralen Tieren (Pasquinelli et al., 2000).

Auch die Anzahl neuer miRNA's, die in verschiedenen Organismen entdeckt wurde stieg drastisch an. Für die Vorhersage solcher Gene werden Computerprogramme eingesetzt. Zum endgültigen Nachweis werden die RNA's aber kloniert bzw. über so genannte „Micro-Arrays“ identifiziert. Bis heute hat man miRNA's in Säugern,

Fischen, Würmern, Fliegen, Pflanzen und Viren nachweisen können (Ambros et al., 2003; Aravin et al., 2003; Dostie et al., 2003; Houbaviy et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2002; Lim et al., 2003a; Lim et al., 2003b; Mourelatos et al., 2002; Pfeffer et al., 2004). Bislang wurden viral kodierte miRNA's nur in Viren mit Doppelstrang-DNA Genom vorausgesagt und nachgewiesen. Die meisten werden von Mitgliedern der Familie der Herpesviren kodiert. Das humane Immundefizienzvirus (HIV), das zu den Retroviren zählt, ist bislang das einzige Virus mit RNA-Genom für das eine miRNA beschrieben wurde (Omoto & Fujii, 2006).

Bei nahezu allen der klonierten miRNA's fiel auf, dass eine starke Konservierung zwischen eng verwandten Spezies vorliegt. Beispielsweise zwischen *C. elegans* und *C. briggsae* oder zwischen Mensch und Maus (Lagos-Quintana et al., 2003; Lim et al., 2003b). Es gibt aber auch Beispiele, bei denen eine Konservierung über weit entfernte Spezies bekannt ist. So gibt es zu für mehr als 30% aller miRNA Gene von *C. elegans* ein Homolog im Menschen (Lim et al., 2003a). Eine Konservierung ist auch bei Viren zu beobachten, beispielsweise zwischen dem humanen Epstein-Barr Virus und dem Lymphocryptovirus des Rhesusaffen, was als Zeichen der Adaption an das hochkonservierte Wirtsgenom der Primaten gedeutet wird (Cai et al., 2006). Die Ziel-mRNA's von viralen miRNA's sind nur wenig variabel und somit sind nur geringe virale miRNA Änderungen möglich (Cullen, 2006).

3.3.1. Genomische Organisation und Expression

Die miRNA-Gene weisen eine Besonderheit bei der Organisation im Genom auf. Sie liegen oftmals weit entfernt von anderen Genen (>1kb) und es wird deshalb postuliert, dass sie grundsätzlich als eigene, unabhängige Transkriptionseinheit exprimiert werden (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee & Ambros, 2001). Eine weitere Besonderheit ist, dass etwa ein Viertel aller miRNA Gene nicht immer in 5'→3' sondern auch in entgegengesetzter Orientierung in Introns anderer Gene kodiert werden. Man geht davon aus, dass diese miRNA Gene keine eigenen Promotoren besitzen, sondern aus den Introns der „normalen“ Gene prozessiert werden (Aravin et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2003; Lai et al., 2003; Lim et al., 2003a). Es ist vorstellbar, dass bei der Expression eines Proteins gleichzeitig aus einem Intron eine miRNA prozessiert wird, die dann regulatorisch eingreifen kann,

indem sie zur translationalen Repression eines Proteins führt, dass dem kodierten Protein entgegenwirkt.

MiRNA-Gene können auch in Genclustern vorliegen. In diesem Falle werden die miRNA's aus einem multicistronischen Primärtranskript gebildet (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001). Diese Gencluster findet man beim Menschen eher selten, wobei bei *Drosophila* über die Hälfte der miRNA's aus Genclustern gebildet werden (Aravin et al., 2003). Bei Viren ist die Lokalisation der miRNA's indifferent. Bei EBV, HHV8 (Humanes Herpesvirus 8) und MHV68 (Murines Herpesvirus 68) liegen die miRNA-Gene in Clustern vor, bei CMV (Cytomegalievirus) nicht (Pfeffer et al., 2005). Heute lassen sich miRNA's nach ihrem genomischen Ursprung in 3 Gruppen einteilen: Exonische miRNA's in nicht kodierenden Transkriptionseinheiten, intronische miRNA's in nicht kodierenden Transkriptionseinheiten und intronische miRNA's in für Protein kodierenden Transkriptionseinheiten (Rodriguez et al., 2004). Es ist bislang ungeklärt, ob die Splicing Maschinerie ein Intron produzieren kann, das im Anschluss zu einer miRNA Prozessierung führt. Somit weiß man auch nicht, ob die in Introns kodierten miRNA's funktionell mit ihrem entsprechenden Wirtsgen verwandt sind (Chen & Meister, 2005). Eine Verbindung zwischen der Prozessierung der mRNA und der miRNA wäre möglich, da Studien gezeigt haben, dass miRNA's häufig mit den entsprechenden Wirts-mRNA's prozessiert werden (Baskerville & Bartel, 2005).

Auffällig ist, dass miRNA-Gene bei Säugern in repetitiven Elementen des Genoms liegen. Dies lässt vermuten, dass dadurch die Neuentstehung von miRNA-Genen in der Evolution von Säugetieren gewährleistet wird (Smalheiser & Torvik, 2005).

MiRNA's weisen vielfältige Expressionsmuster auf. Als ein Beispiel für eine entwicklungspezifische Expression sei hier noch einmal die *lin-4* und *let-7* miRNA bei *C.elegans* genannt, die zu unterschiedlichen Zeiten der Larvenentwicklung unterschiedlich stark exprimiert werden (Bashirullah et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2002; Lau et al., 2001; Lim et al., 2003a; Pasquinelli et al., 2000). Des Weiteren gibt es eine zelltypspezifische Expression, z.B. wird die humane miR-1 stark in Säugerherzen exprimiert, die humane miR-122 vornehmlich in der Leber (Jopling et al., 2005). Außerdem muss erwähnt werden, dass jeder Zelltyp zu jedem Zeitpunkt in der Entwicklung ein spezifisches miRNA-Expressionsprofil besitzt was für eine Funktion der miRNA spricht. Betrachtet man nun die Menge an miRNA Molekülen in der Zelle findet man hier auch große Unterschiede. Bei *C. elegans* konnte man

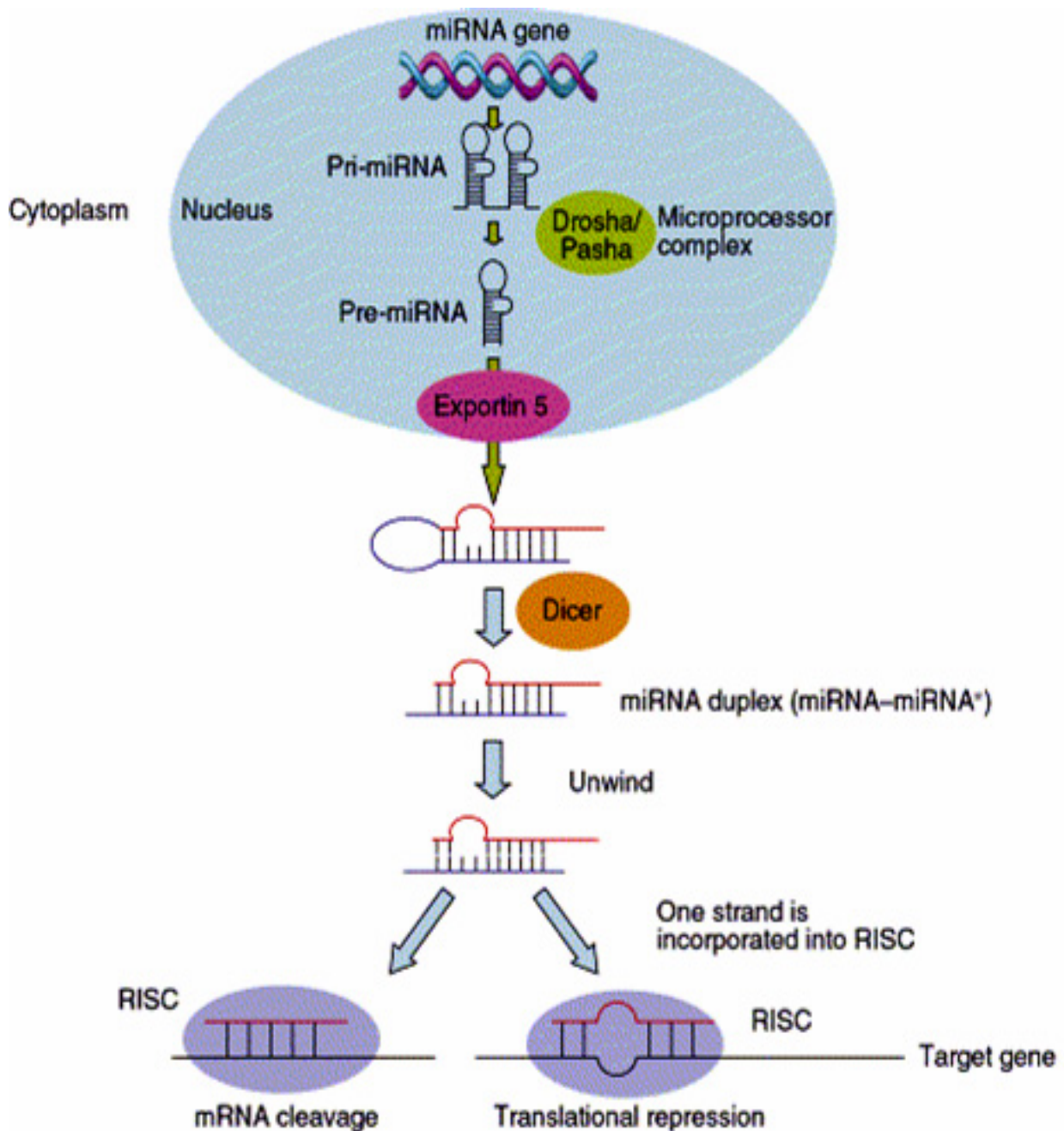
zwischen 800 und 50.000 Moleküle pro Zelle nachweisen (Lim et al., 2003b). Mittlerweile ist auch sicher, dass miRNA's eine der größten Genfamilien darstellen und etwa 1% der exprimierten Gene höherer Eukaryoten ausmachen (Bartel, 2004). Beim Menschen hat man bis heute über 400 miRNA's entdeckt und es werden noch etwa 600 vermutet. Bei Metazoen sind es mittlerweile etwa 300 miRNA's (Cullen, 2006).

3.3.2. Biogenese

Die miRNA's werden über bestimmte Prozesse generiert, die noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Die bislang bekannten Schritte der Prozessierung sind in Abbildung 4 dargestellt. Das miRNA Gen wird im Zellkern von einer RNA Polymerase II und III (pol II+III) transkribiert. Das entstehende Transkript wird als primäre miRNA (pri-miRNA) bezeichnet und weist bei mehreren Kilobasen Länge typische Haarnadelstrukturen auf. Außerdem besitzt es, wie eine normale mRNA, am 5'-Ende eine m⁷G-Cap Struktur und am 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz. Der nächste Schritt der Prozessierung findet ebenfalls im Kern statt. Die bei *Drosophila* entdeckte RNA Endonuklease III Drosha entfernt die Überhänge und schneidet etwa 2 helikale Windungen entfernt von der Haarnadelstruktur (Zeng & Cullen, 2005). Dabei entsteht die Vorläufer-miRNA (Precursor-, pre-miRNA), die etwa 60-70 nt Länge aufweist, als „Stem-loop“-Molekül vorliegt und ein 5'-Phosphat und am 3'-Ende einen Überhang von 2 nt bildet (Basyuk et al., 2003; Lee et al., 2003; Lee et al., 2002; Zeng & Cullen, 2003). Drosha selbst ist ein 650 kDa schwerer Proteinkomplex, der auch Microprozessorkomplex genannt wird und aus der Endonuklease III und dem dsRNA-Bindeprotein (dsRBP) Pasha/DGCR8 (DiGeorge Critical Region 8) besteht. Dieses spielt eine eminente Rolle bei der Erkennung der pri-miRNA und somit der weiteren Prozessierung (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004; Landthaler et al., 2004).

Die anschließenden Schritte finden im Zytoplasma statt. Dazu wird die pre-miRNA durch aktiven Transport unter Verbrauch von GTP mittels des Exportfaktors Exportin 5 aus dem Kern geschleust (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004). Für den Transport entscheidend sind der 3'-Überhang und die Haarnadelstruktur und es findet eine direkte Bindung an das Exportin 5 statt (Zeng & Cullen, 2004).

Die ausgeschleuste pre-miRNA wird nun im Zytoplasma von einem Komplex namens Dicer weiterverarbeitet. Der Dicer Komplex entspricht einer RNA Endonuklease III, die zwei RNase III Regionen, eine dsRNA Bindungsregion, wahrscheinlich eine Helikase Region und eine PAZ-Domäne aufweist (Bangsow et al., 2001). Die Endonuklease schneidet zwei helikale Windungen nach der ersten Base des Doppelstranges und es entsteht ein 5'-Phosphat und ein 2nt 3'-Überhang (Lee et al., 2003). Das Ergebnis ist eine Duplexstruktur, die aus der reifen miRNA und der komplementären miRNA* besteht (Lau et al., 2001; Zhang et al., 2004). Die einzelsträngige reife miRNA wird nun in einen Ribonukleoproteinkomplex, den miRNP (miRNA-containing Ribonucleoprotein Complex) oder auch genannt miRISC (miRNA-containing RNA-induced Silencing Complex) eingebaut. In diesen miRNP wird zuerst das 5'-Ende des Strangs, der am Ende des Doppelstrangs am schwächsten gepaart ist, eingebaut (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Der miRNP besteht aus den Proteinen eIF2C2, Argonaut 1-4 und der Helikase Gemin-3 und -4 (Mourelatos et al., 2002). Gemin-3 und -4 zählen zu den DEAD-Box Helikasen und sind vermutlich an der Entwindung des miRNA/miRNA* Duplex beteiligt. Warum nun nur die reife miRNA und nicht die miRNA* in den Komplex aufgenommen wird und was mit dem Gegenstrang passiert ist bislang unbekannt. Ein wichtiger Bestandteil des miRNP sind die Proteine der Argonaut (Ago) Familie, von denen bisher Ago 1-4 bekannt sind. Die Ago Proteine besitzen ein Molekulargewicht von etwa 100 kDa und tragen PAZ (piwi-argonaut-zwille) und PIWI Regionen (Carmell et al., 2002; Cerutti et al., 2000). PAZ ist eine RNA-Bindungsregion, die eine Bindung der miRNA vermittelt, indem sie spezifisch den 2nt Überhang am 3'-Ende erkennt und daran bindet (Lingel et al., 2004; Ma et al., 2004; Song et al., 2003; Yan et al., 2003). Die PIWI Domäne ist ein Homolog der RNase H und ist beteiligt an der miRNA spezifischen Spaltung der Ziel-mRNA's (Ma et al., 2005; Parker et al., 2004; Parker et al., 2005; Song et al., 2004; Yuan et al., 2005). Beim Menschen konnte man eine Spaltungsaktivität nur bei Ago2 beobachten, trotz einer intakten PIWI Region auch in den anderen Ago Proteinen (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004; Meister & Tuschl, 2004; Rivas et al., 2005; Song et al., 2004).



Drug Discovery Today

Abbildung 4: Schema der Biogenese und Funktion humaner miRNA's

Im Zellkern erfolgt die Transkription zum Primärtranskript (pri-miRNA). Durch den Microprozessorkomplex Drosha entsteht die Vorläufer-miRNA (pre-miRNA). Der Transport ins Zytoplasma wird durch Exportin 5 vermittelt. Dort wird durch den Enzymkomplex Dicer die Haarnadelstruktur entfernt und es entsteht eine miRNA Duplexstruktur, die aus der reifen miRNA und dem Gegenstrang miRNA* besteht. Die reife miRNA wird in den RISC-Komplex eingebaut, der das RNA-Silencing vermittelt. Ist die Zielsequenz in der 3'-UTR der mRNA zu 100% komplementär, so kommt es zur Spaltung der mRNA, bei einer teilweisen Komplementarität zur translationalen Repression.

3.3.3. Mechanismus

Grundsätzlich wirkt miRNA posttranskriptionell und hat eine Verringerung der Proteinexpression zur Folge. Dabei gibt es zwei Hauptwege, die abhängig von der Komplementarität der miRNA zu ihrer Ziel-mRNA sind. Im Falle einer vollständigen Sequenzkomplementarität zwischen der miRNA und des entsprechenden Abschnitts der 3'-UTR der mRNA kommt es zu einer Spaltung und anschließenden Degradation der mRNA. Dieser Mechanismus ist vergleichbar mit dem der siRNA und den dort beteiligten Proteinen. Gespalten wird, unabhängig von der Länge der miRNA, zwischen dem 10. und 11. Basenpaar vom 5'-Ende der miRNA (Elbashir et al., 2001). Die miRNA selbst bleibt intakt und kann weitere Spaltungsvorgänge auslösen (Hutvagner & Zamore, 2002). Der zweite Mechanismus der miRNA ist die translationale Repression. Hierbei ist die miRNA nur partiell zu der 3'UTR ihrer Ziel-mRNA komplementär, was dann zu einer Abnahme der Proteinmenge führt, aber die Menge der mRNA und das Polysomenprofil nahezu unbeeinflusst bleiben (Olsen & Ambros, 1999; Seggerson et al., 2002).

Das Zusammenwirken von RISC und miRNA ist noch nicht gänzlich aufgeklärt. Es gibt Hinweise, dass mehrere RISC-Komplexe zusammenarbeiten, denn oft finden sich mehrere komplementäre Abschnitte zu einer miRNA in einer 3'-UTR der mRNA bei Metazoen (Abrahante et al., 2003; Lin et al., 2003; Reinhart et al., 2000). Für die Erkennung der Ziel-mRNA ist ein besonderer Sequenzabschnitt in der miRNA von Bedeutung, die so genannte „seed sequence“. Sie umfasst die Basen 2-8 am 5'-Ende der miRNA, ist häufig vollständig komplementär zu dem entsprechenden Abschnitt der 3'UTR der mRNA und somit sehr wahrscheinlich notwendig für die Bindung (Lai, 2002). Mutationen in dieser Sequenz bzw. Deletion derselben können die Bindung der miRNA verhindern (Taganov et al., 2006).

Die miRNA kann außerdem beteiligt sein an der Deadenylierung der mRNA. Dieser Mechanismus ist aber wenig untersucht (Wu et al., 2006).

In letzter Zeit tauchen Hinweise in der Literatur auf, dass translational stillgelegte mRNA's in der Zelle getrennt von der translationalen Maschinerie abgelagert werden. Diese cytoplasmatischen Ablagerungen werden als P-Bodies („Processing Bodies“) bezeichnet (Coller & Parker, 2005; Liu et al., 2005; Sen & Blau, 2005). P-Bodies enthalten mRNA, die zur Lagerung bzw. zum Abbau bestimmt ist. Dazu enthalten sie die entsprechenden Decapping Enzyme Dcp1 und Dcp2, die 5'-3' Exonuklease Xrn1

und besitzen Deadenylierungsaktivität. Es lassen sich Bestandteile des RISC (Ago1 und Ago2) zusammen mit reifer miRNA nachweisen.

3.3.4. Funktion und Zielgene

Die Funktion der miRNA's ist primär eine negative Regulation der Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene. Um geeignete „Ziele“, also mRNA's für miRNA's zu finden nutzt man Computerprogramme, die über bestimmte Algorithmen eine Vorhersage treffen können (Enright et al., 2003; Lewis et al., 2003; Stark et al., 2003). Diese Algorithmen basieren in der Regel auf multiplen, konservierten Regionen in der 3'-UTR mit einer Komplementarität zu den entsprechenden miRNA's. Dabei kommt es auch auf die Stabilität der einzelnen Basenpaarungen an. Bei Säugern ergibt sich das Problem, dass nur wenige mRNA's mit nahezu vollständiger Komplementarität vorhanden sind, was die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse ansteigen lässt. Des Weiteren ist die Konservierung ein Kriterium für die Identifikation der Zielgene und kann somit nicht zur Verifikation der Ergebnisse herangezogen werden. Beim Menschen ist vorausgesagt worden, dass ca. ein Drittel aller Gene potenzielle Ziele für miRNA's darstellen (Lewis et al., 2005). Eine große Schwierigkeit ist das „Filtern“ der richtigen mRNA's. Häufig liegt eine geeignete Komplementarität vor, aber andererseits ist der betroffene Genabschnitt nicht konserviert. Die Konservierung selbst spielt für die Entscheidung ob nun eine Ziel-mRNA vorliegt oder nicht keine Rolle. Aus diesem Grund braucht man andere Kriterien um eine zuverlässige Voraussage zu treffen. Eine Möglichkeit wäre die Protein- bzw. die Sekundärstruktur der mRNA zu betrachten in Bezug auf Zugänglichkeit der 3'-UTR durch den miRNP-Komplex.

Die computergestützte Vorhersage der Zielgene reicht nicht aus um einen endgültigen Nachweis der miRNA Funktion zu erbringen und muss stets experimentell validiert werden.

3.3.5. Micro-RNA's bei EBV

Anhand von EBV gelang 2004 erstmals der Nachweis, dass miRNA's auch von Viren kodiert werden. Aus einer latent mit EBV infizierten Burkitt Lymphom Zelllinie wurden kleine RNA Moleküle kloniert und 5 verschiedene EBV-kodierte miRNA's identifiziert (Pfeffer et al., 2004).

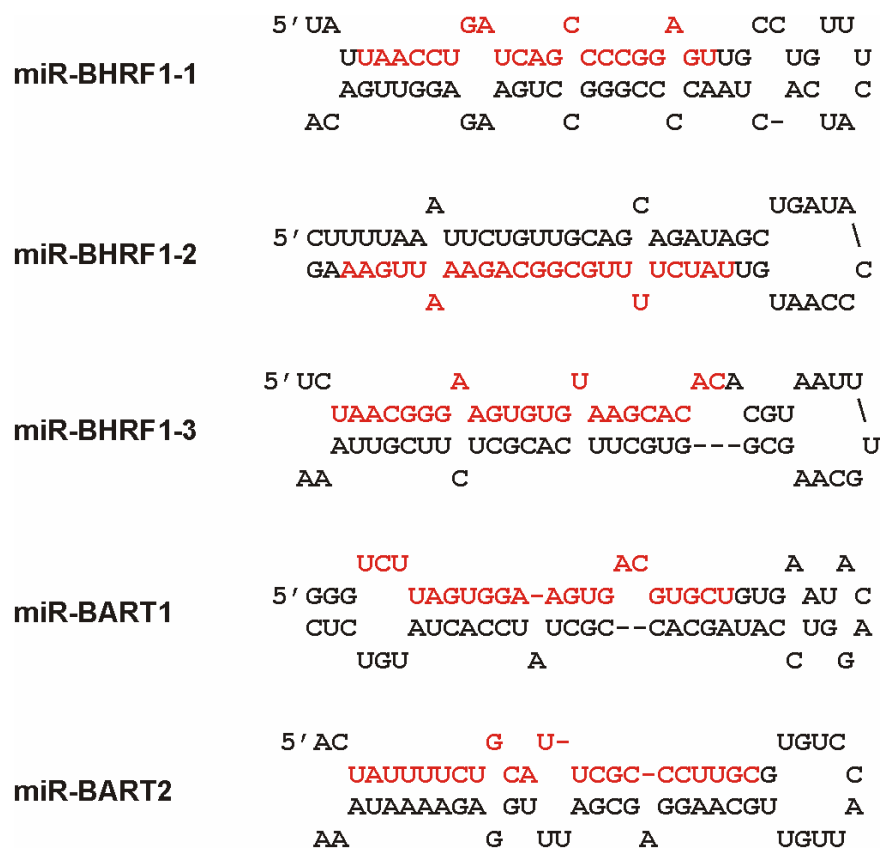


Abbildung 5: Beispiele EBV-kodierter miRNA's

Die Struktur der Vorläufer, der in 2004 von Pfeffer et al. gefundenen miRNA's des Epstein-Barr Virus. In rot sind die jeweiligen reifen miRNA's dargestellt.

Mittlerweile wurden von zwei weiteren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander 18 zusätzliche miRNA's von EBV vorhergesagt, kloniert und nachgewiesen (Cai et al., 2006; Grundhoff et al., 2006). Der Grund, warum initial nur 5 miRNA's bei EBV entdeckt wurden liegt an der B95.8 Burkitt Lymphom Zelllinie, die von Pfeffer et al. benutzt wurde. Diese ist mit dem B95.8-Stamm von EBV transformiert und trägt im

Genom eine Deletion von ca. 12 kbp. Ein Großteil der später identifizierten EBV-miRNA's sind in der Deletion kodiert.

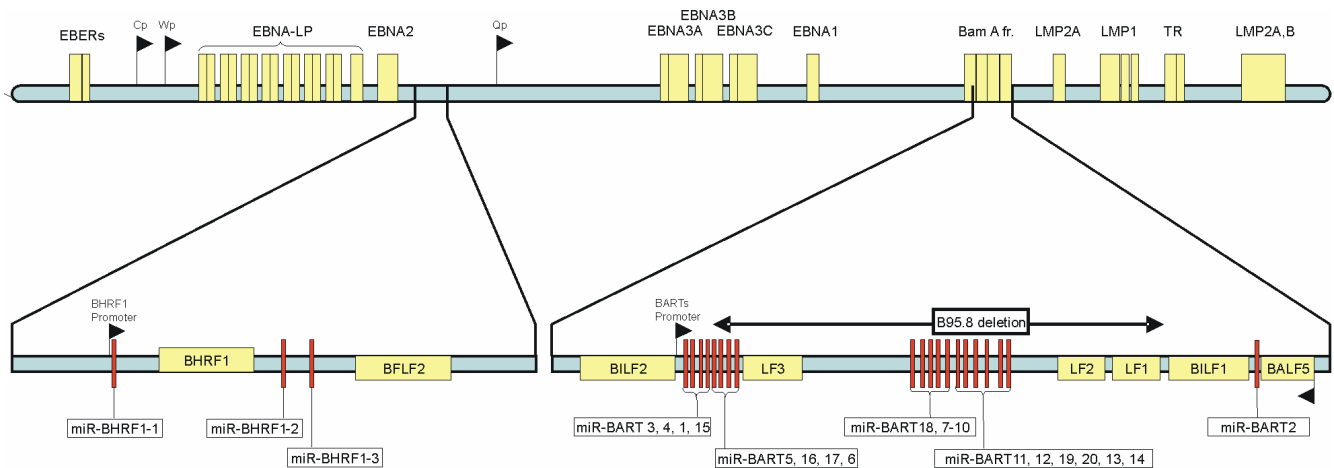


Abbildung 6: Lage der miRNA's im EBV-Genom

Im oberen Teil der Abbildung sind die wichtigsten latenten Gene von EBV dargestellt. Der untere Teil zeigt vergrößert die beiden Cluster, in denen die miRNA's von EBV kodiert sind. Im BHRF1-Bereich liegen 3 und im BART-Bereich 20 miRNA's. Die meisten miRNA's des BART-Clusters fehlen beim B95.8-Stamm. Außerdem sind die lytischen Gene eingezeichnet.

Die miRNA's von EBV sind im Genom in zwei Clustern organisiert. Ein Cluster mit 3 miRNA's liegt im Bereich des BHRF1-Gens (Bam H1 Fragment H Rightward Open Reading Frame 1), welches für das virale Homolog des zellulären antiapoptotischen BCL2-Proteins kodiert. Die miRNA's werden als BHRF1-1, -1-2 und -1-3 bezeichnet. miR-BHRF1-1 liegt in der 5'-UTR des BHRF1-Gens, während miR-BHRF1-2 und -1-3 in der 3'-UTR kodieren und gegenläufig zu BFLF2 transkribiert werden.

Die anderen 20 miRNA's werden im BART Gencluster (Bam H1 Fragment A Rightward Transcript) kodiert und als miR-BART1 bis -20 bezeichnet. Die miR-BART1-3, 4 und 15 liegen außerhalb, alle anderen in der B95.8 Deletion (Cai et al., 2006; Grundhoff et al., 2006; Pfeffer et al., 2004). In Abbildung 6 ist die Lage der miRNA's im EBV Genom schematisch dargestellt.

Die miRNA's von EBV sind unterschiedlich stark exprimiert in der Latenz und im lytischen Zyklus. Die miRNA's des BHRF1-Gens werden in B-Zellen stark exprimiert, die sich im Latenzstadium III befinden, z.B. bestimmte BL (Burkitt-Lymphom Zellen) und LCL (Lymphoblastoid Cell Lines). In Epithelzellen oder B-Zellen des Latenztyps I

Signaltransduktionswegen, die B-Zell spezifische Chemokine oder Zytokine beeinflussen.

Es wurden auch virale Gene als potenzielle Ziele der EBV miRNA's identifiziert. In Tabelle 2 sind einige der vorhergesagten EBV Zielgene aufgeführt. Die miRNA-BART2 ist nicht in der B95.8-Deletion kodiert und weist eine Besonderheit bei den EBV miRNA's auf. Sie wird gegenläufig zum BALF5 Transkript (Bam H1 Fragment A Leftward Open Reading Frame 5) transkribiert und ist zu 100% komplementär zur BALF5-3'UTR (Pfeffer et al., 2004).

Anfang der Neunziger Jahre wurden zwei verschieden große Transkripte der BALF5 mRNA im Northern Blot nachgewiesen. In Zelllinien der Stämme P3HR1, Raji, W-91 und FF-41 fand man ein Fragment von 5,1 kB, während in B95.8-Zellen nur ein Fragment von 3,7 kB vorhanden war (Furnari et al., 1993). Es wurde spekuliert, dass ein viraler Faktor für die Spaltung der mRNA von BALF5 verantwortlich sein könnte. Interessanterweise wurde nun bei der Entdeckung der miRNA's von EBV die Schnittstelle der miR-BART2 genau an die Position der 3'-UTR der BALF5-mRNA vorhergesagt, sodass zwei Fragmente dieser Größe entstehen können (Pfeffer et al., 2004). In Abbildung 7 ist die potenzielle Spaltstelle der BALF5-mRNA durch die miR-BART2 schematisch dargestellt. Es ist gut möglich, dass EBV noch für mehr miRNA's kodiert, die noch nicht gefunden wurden. Man weiß nämlich, dass aus der BART-Region eine Vielzahl verschieden gespleißter Transkripte von unterschiedlichen Promotoren generiert werden, aus denen allerdings keine Proteine synthetisiert werden und es sich hier um pri-miRNA's handeln könnte (Chen et al., 1992; Chen & Meister, 2005; Gilligan et al., 1991; Hitt et al., 1989). Die BART-miRNA's werden bis auf die miR-BART2 (4. Intron) im 1. Intron des BART-Locus kodiert und es ist bislang unbekannt ob alle zur gleichen Zeit exprimiert werden. Die Tatsache, dass die meisten der BART-miRNA's in der B95.8 Deletion kodiert werden, führt sehr wahrscheinlich auch zu unterschiedlichen miRNA-Expressionsprofilen in unterschiedlichen EBV-positiven Zellen, die mit verschiedenen Virusstämmen infiziert sind.

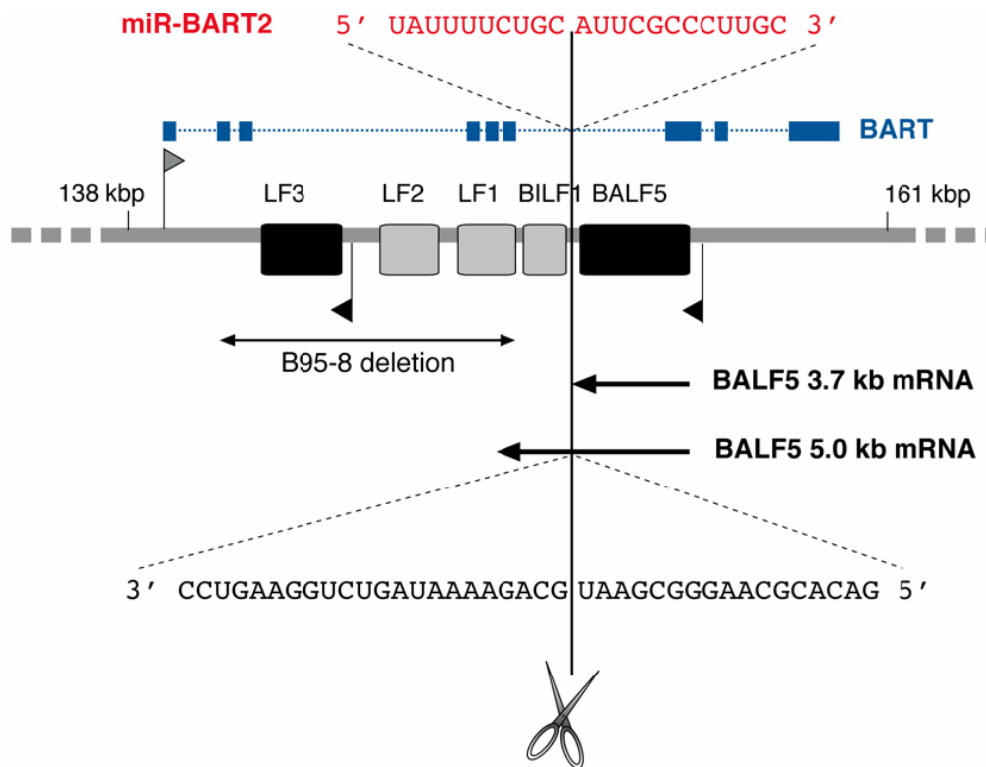


Abbildung 7: Die vorhergesagte Schnittstelle der miR-BART2 in der BALF5-mRNA

Der mittlere Teil der Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus der BART-Region des EBV-Genoms. Lytische Gene sind in schwarz und Gene, für die eine Expression noch nicht nachgewiesen ist, in grau markiert. Im oberen Teil ist die Sequenz der reifen miR-BART2 und im unteren Teil die komplementäre Sequenz der BALF5-mRNA dargestellt. Die vorhergesagte Schnittstelle stimmt mit dem 3'-Ende der 3,7 kB BALF5-mRNA überein und ist angegeben (Pfeffer et al., 2004).

Auch die Funktion der EBV miRNA's ist bislang völlig ungeklärt. Verschiedene Vermutungen deuten darauf hin, dass vor allem die miRNA's aus dem BART-Bereich, die in der B95.8-Deletion liegen, an der Aufrechterhaltung des latenten Zustands in der Zelle beteiligt sind. In B95.8 Zellen wird demgegenüber eine stabile Latenz beschrieben, die *in vitro* zur lytischen Replikation induziert werden kann. Daraus wird ersichtlich, dass die miRNA's in der Deletion nicht zwingend notwendig sind für die Aufrechterhaltung der Latenz oder dass ihre Funktion durch andere miRNA's oder Faktoren ersetzt werden kann (Grundhoff et al., 2006).

4. Material

4.1. Chemikalien, Membranen, Filter

Acrylamid	Serva (Heidelberg)
Agarose	Seakem (Rockland, USA)
Amidoschwarz	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumpersulfat	Serva
Ampicillin (Binotal™)	Bayer (Leverkusen)
Bactoagar	DIFCO
Bisacrylamid	Serva
Bromphenolblau	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Coomassie Brilliant Blue™ R-250	Serva
50x Denhardt's Solution	Sigma
Dichlor-diphenyl-trichlorethan (DTT)	Invitrogen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Ethidiumbromid	Sigma
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories (Pasching, A)
Glycin	Serva
Hybond N-XL Membran	Amersham
Hyperfilm ECL™	Amersham
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Novagen
Magermilchpulver	Glücksklee (Hamburg)
3-Mercapto-1,2-Propandiol	Sigma
Metafectene™	Biontex (Martinsried)
Nanofectin™	PAA Laboratories (Pasching, A)
Natriumjodid	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schuell
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva

NucleoSpin Extract™	Macherey-Nagel
Nukleotide (dNTPs)	Invitrogen
PeqGold TriFast™	PeqLab
Ponceau S	Sigma
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
Röntgen-Fixier-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
SequaGel™-Kit	Biozym/National Diagnostics
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva
Triton X-100	Serva
X-Gal (5-Brom-4Chlor-3-Indolyl-bD-Galaktopyranosid)	Sigma
Zellulosefilter Whatman™ #1	Herolab (Maidstone, USA)

Alle weiteren Chemikalien, die verwendet wurden und hier nicht aufgeführt sind, wurden über die Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) in analysereiner Form bezogen.

4.2. Puffer und Lösungen

Amidoschwarz-Färbelösung	:	Isopropanol	25,0% (v/v)
		Essigsäure	10,0% (v/v)
		Amidoschwarz	0,1% (w/v)
Blaumarker (DNA-Probenpuffer)	:	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
		Glycerol	50% (v/v)
		EDTA	50mM
Blockingpuffer	:	Magermilchpulver in PBS-Puffer	5% (w/v)
Bottomgelstock (für SDS-Gele)	:	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
		SDS	0,4% (w/v)
Elvanol (Polyvinyl-Alkohol)	:	Elvanol	5 g

	PBS	80 ml
	Glycerol	40 ml
Entfärbelösung für Amidoschwarz und Coomassie-Blau	:	Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure 10% (v/v)
Ethidiumbromidlösung	:	Ethidiumbromid 10 mg/ml H ₂ O
Laufpuffer (SDS-PAGE)	:	Tris/HCl 0,025 M SDS 0,1% (w/v) Glycin 0,2 M
PBS	:	NaCl 140 mM KCl 25 mM MgCl ₂ 0,5 mM CaCl ₂ 1 mM Na-K-Phosphat 10 mM
PBS-Puffer (ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺): (für Arbeiten mit Zellen)	:	NaCl 8,0 g/l KCl 0,2 g/l Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O 2,9 g/l KH ₂ PO ₄ 0,2 g/l pH-Wert auf 7,4 eingestellt
SDS-Probenpuffer (2x) (2x Sample-Buffer)	:	Tris HCL (pH6,8) 130 mM SDS 6% (w/v) 3-Mercapto-1,2-propandiol 10% (v/v) Glycerol 10% (w/v) Bromphenolblau 0,05% (w/v)
SSC-Puffer (20x) (pH 7,0)	:	NaCl 3 M Tri-Na-Citrat-2'-Hydrat 0,3 M

STET-Puffer	:	Tris (pH 8,0)	10 mM
		EDTA (pH 8,0)	50 mM
		Triton X-100	0,5% (v/v)
		Saccharose	8% (w/v)
		Lysozym (Zugabe vor Gebrauch)	0,5 mg/ml
TAE-Puffer (50x)	:	Tris	2 M
		Natriumacetat	25 mM
		EDTA	0,5 M
		ad pH 7,8 mit Essigsäure	
TBE-Puffer (10x)	:	Tris	89 mM
		Borsäure	89 mM
		EDTA	2 mM
TE-Puffer	:	Tris	10 mM
		EDTA	1 mM
		ad pH 7,6 mit Essigsäure	
Transferpuffer (SDS-PAGE)	:	Tris/HCl	25 mM
		Glycin	192 mM
		Methanol	20% (v/v)
		SDS	0,05% (w/v)
Uppergelstock (für SDS-Gele)	:	Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
		SDS	0,4% (w/v)

Zusätzliche Puffer werden bei der jeweiligen Methode genannt.

4.3. Enzyme

Alkalische Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP)	Roche
DNase I (RNase frei)	Roche
Lysozym aus Hühnereiweiß	Roche
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (NEB)
RNase A	Roche
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (NEB)
T7-RNA-Polymerase	New England Biolabs (NEB)
Taq-DNA Polymerase	Sigma
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH

4.4. Größen- und Molekulargewichtsmarker

4.4.1. DNA-Größenmarker

1 kb plus DNA ladder™ (Life Technologies)

Bei der Agarosegelelektrophorese wurde zur Bestimmung der Größe doppelsträngiger, linearer DNA-Moleküle (0,1-12 kb) eine 1 kb plus DNA Leiter verwendet, die folgende Fragmentgrößen enthält:

12000 , 11000 , 10000 , 9000 , 8000 , 7000 , 6000 , 5000 , 4000 , 3000 , 2000 , 1650 , 1000 , 850 , 650 , 500 , 400 , 300 , 200 , 100 bp.

4.4.2. Protein-Molekulargewichtsmarker

Zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen bei der SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese) wurde der LMW-Marker („Low molecular weight – Marker“) der Firma Pharmacia eingesetzt.

Er enthält folgende Proteine:

Phosphorylase b	94	kDa
Kälberserumalbumin	67	kDa
Ovalbumin	43	kDa
Carboanhydrase	30	kDa
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	20,1	kDa
Lactalbumin	14,4	kDa

4.5. Antikörper

Die monoklonalen Antikörper (Ratte IgG), die gegen das Epitop (AS 66-87) des EBV kodierten Proteins BALF5 gerichtet sind, wurden in Kooperation mit Frau Dr. Elisabeth Kremmer (GSF, München) hergestellt. Zu Kontrollzwecken wurde ein monoklonaler Borna-Antikörper (Klon 5F11, Ratte IgG) verwendet, der ebenfalls von Frau Dr. Elisabeth Kremmer zur Verfügung gestellt wurde. Der BZ-1 Antikörper (Maus IgG) zum Nachweis des EBV-Proteins BZLF1 wurde von Martin Rowe (Birmingham, Großbritannien) zur Verfügung gestellt. Zum Nachweis gleicher Proteinmengen in den Extrakten kam ein ein Antikörper (Maus IgG), der gegen β -Actin gerichtet ist zum Einsatz (Sigma-Aldrich). Das Protein β -Actin wird von einem Haushaltsgen kodiert und in eukaryotischen Zellen in gleichen Mengen exprimiert. Alle Meerrettich-Peroxidase- oder Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper (anti-Ratte- und anti-Maus-Pox) wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

anti BALF5 (4C12) :	1:10
anti Borna 5F11 :	1:10
anti BZLF1 (BZ-1) :	1:100
anti β -Actin :	1:5000

Die Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Maus- und anti-Ratte-Pox) wurden in der Regel zu einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt.

4.6. Zelllinien

4.6.1. Epitheliale Zelllinien

- 293T : Diese humane Nierenepithelzelllinie leitet sich von HEK293 Zellen ab (Graham et al., 1977), exprimiert aber zusätzlich das "SV40 large T-Antigen", welches die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem "SV40 origin of replication" ermöglicht (DuBridgde et al., 1987).
- 293EBV : Hierbei handelt es sich um 293 Zellen, die mit einem rekombinanten EBV-Plasmid transfiziert sind. Das Plasmid verfügt über eine Hygromycinresistenz und kodiert außerdem noch für EGFP, welches der Erkennung der EBV-positiven Zellen z.B. im FACS dient. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von H.-J. Delecluse DKFZ, Heidelberg bereitgestellt (Delecluse et al., 1998).
- HeLa : Diese Zelllinie wurde aus einem zervikalen Adenokarzinom einer 31 Jahre alten Patientin etabliert (Scherer et al., 1953).

4.6.2. B-Zelllinien

- BJAB : EBV-negative Burkitt-Lymphom B-Zelllinie, die keine BL-typische *c-myc*-Translokation enthält (Klein et al., 1974).
- BL41 : EBV-negative Burkitt-Lymphom B-Zelllinie, die aus Tumormaterial eines 8jährigen Patienten mit Burkitt-Lymphom etabliert wurde (Lenoir et al., 1985).
- BL41/B95-8 : Diese Zelllinie wurde nach Infektion der EBV-negativen Burkitt-Lymphom-Zelllinie BL41 mit dem EBV-Typ A Stamm B95-8 erhalten (Lenoir et al., 1985).

- B95.8 : Lymphoblastoide Zelllinie (LCL) aus *in vitro* EBV-immortalisierten B-Zellen eines Krallenaffen, welche mit einem Typ I Virus aus einer LCL eines IM-Patienten (Miller & Lipman, 1973) infiziert wurden.
- Jijoye : Die EBV-Typ 2 positive Burkitt-Lymphom Zelllinie wurde aus Tumormaterial eines afrikanischen Patienten etabliert (Bornkamm et al., 1982; Hinuma et al., 1967).
- Raji : EBV-positive Non-Producer Burkitt-Lymphom-Zelllinie mit der typischen t (8;14) Chromosomentranslokation. Das Typ I Virus trägt eine Deletion im EBNA3C Bereich und ist nicht transformierend (Epstein et al., 1966).

4.7. Bakterienstämme

E.coli pMosBlue: Diese Bakterien stammen aus dem „pMOSBlueT-Vektor“ Kit der Firma Amersham. Sie wurden sowohl zur Vermehrung rekombinanter DNA, als auch im Blue-White Screening bei der Klonierung rekombinanter DNA eingesetzt.

4.8. Nähr- und Kulturmedien

4.8.1. Nährmedien für Bakterien

Zur Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur wurde 2,5% (w/v) LB-Medium (Luria Broth Base (GIBCO)) angesetzt und autoklaviert.

Zum Ausstrich der Bakterien auf Platten wurden Petrischalen mit 3,75% (w/v) Luria's Agar (GIBCO) hergestellt und autoklaviert.

Zur Selektion von transformierten Bakterien wurde, abhängig vom Resistenzgen, Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Kanamycin (30 µg/ml) zu den Nährmedien gegeben.

4.8.2. Kulturmedien für Säugerzellen

DMEM: Zur Kultivierung adhärenter Monolayer-Zellkulturen wurde "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (Bio-Whittaker) verwendet. Dieses Medium wurde jeweils mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, PAA Laboratories), 40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat ergänzt.

RPMI 1640: RPMI 1640-Medium (Sarstedt) wurde verwendet für eukaryotische Zellen, die in Suspensionskultur wachsen. Hierzu wurde das Medium noch mit je 10% fötalem Kälberserum (FKS, PAA Laboratories), 40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat, sowie 5% Natrium Pyruvat ergänzt.

4.9. Vektoren

4.9.1. Der pGemTM-T Vektor

Der pGemTM-T Vektor der Firma Promega wird zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Alle PCR-Amplifikate enthalten am 3' Ende ein Desoxyadenosin und können somit ohne einen vorherigen Restriktionsverdau in den mit überstehenden Desoxythymidinenden offenen Vektor inseriert werden. Die Ligation von Produkten ohne überhängende Desoxyadenosinenden erfolgt über die Multiple-Cloning-Site (MCS). Diese enthält Erkennungssequenzen mehrerer Restriktionsenzyme. Der erfolgreiche Einbau des Inserts wird durch die Zerstörung des lacZ-Markergens in einem Blue-White-Screening angezeigt. Der pGemTM-T Vektor besitzt neben den T7- und SP6-spezifischen Promotoren auch zwei „ori's“ (Origin of Replication). Der Bakterien-„ori“ verleiht ihm die Fähigkeit zur autonomen Replikation im prokaryotischen System und der „ori“ aus dem filamentösen Phagen f1 ermöglicht ihm die Erzeugung von Einzelstrang-DNA. Für die Selektion transformierter Bakterien besitzt der Vektor ein Ampicillinresistenzgen. Die Vektorkarte ist in Abbildung 8 dargestellt.

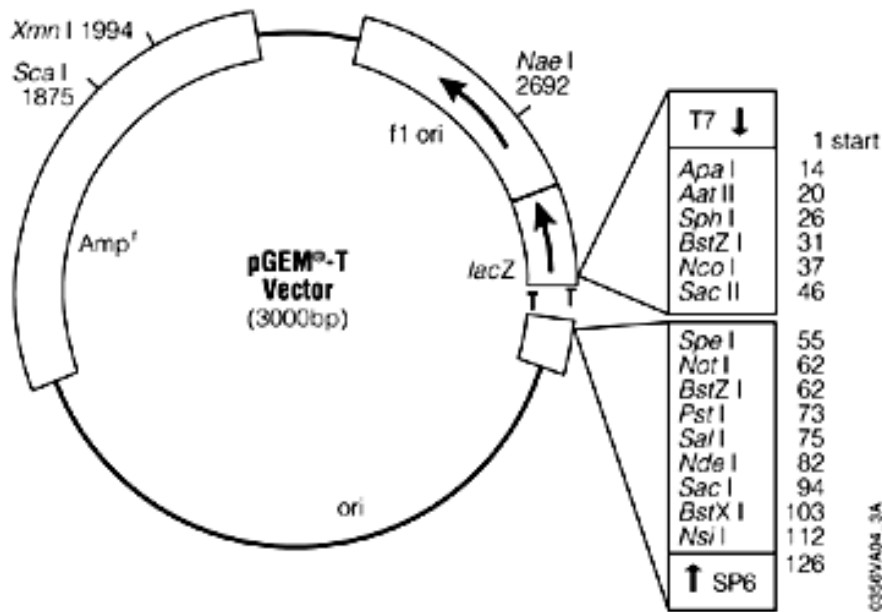


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Vektors pGEM-T™.

4.9.2. Der pSG5 Vektor

Der pSG5 Vektor der Firma Stratagene wird überwiegend für die Expression im eukaryotischen System eingesetzt. Der Vektor zeichnet sich durch eine hohe Expressionsrate aus, die große Mengen an doppelsträngiger DNA liefert. Zudem kann der Vektor sowohl für *in vivo* als auch für *in vitro* Expressionen verwendet werden. Der SV40 Promotor erleichtert die *in vivo* Expression während der T7 Promotor die *in vitro* Transkription des klonierten Inserts vereinfacht. Die Ligation von Produkten erfolgt über die Multiple-Cloning-Site (MCS). Diese enthält die Erkennungssequenzen von *EcoRI*, *BamHI* und *BglII*. Der pSG5 Vektor besitzt zwei „ori’s“ (origin of replication). Der Bakterien „ori“ ermöglicht die autonome Replikation im prokaryotischen System und der „ori“ aus dem filamentösen Phagen f1 ermöglicht die Erzeugung von Einzelstrang-DNA. Für die Selektion in Bakterien und eukaryotischen Zellen enthält der 4,1 kb große Vektor ein Ampicillinresistenzgen. Die Karte des Vektors ist in Abbildung 9 zu sehen.

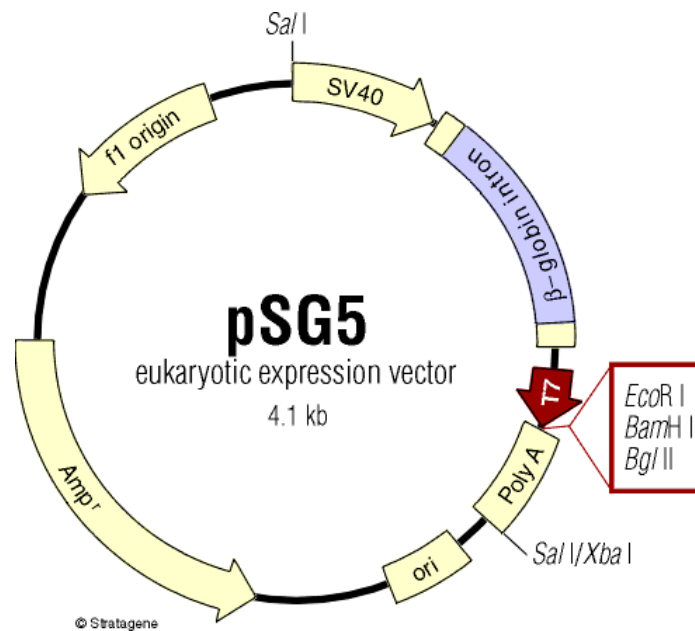


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Vektors pSG5.

4.9.3. Der pEGFP-C1 Vektor

Dieses 4,7 kbp große Plasmid der Firma Clontech dient der transienten oder stabilen eukaryotischen Expression mit einer Kanamycin/Neomycin Selektion. Einklonierte Gene werden über den CMV-Promotor als EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)-Fusionsprotein exprimiert. Dieser EGFP-Anteil kann sowohl N-terminal, als auch C-terminal angefügt werden. Durch Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm kann die maximale Emission des EGFP-Chromophors bei 507 nm im Durchflusszytometer oder im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Somit kann beispielsweise bei Kotransfektionen mit anderen Plasmiden die Transfektionsrate ermittelt werden. Eine Zeichnung des Vektors ist in Abbildung 10 dargestellt.

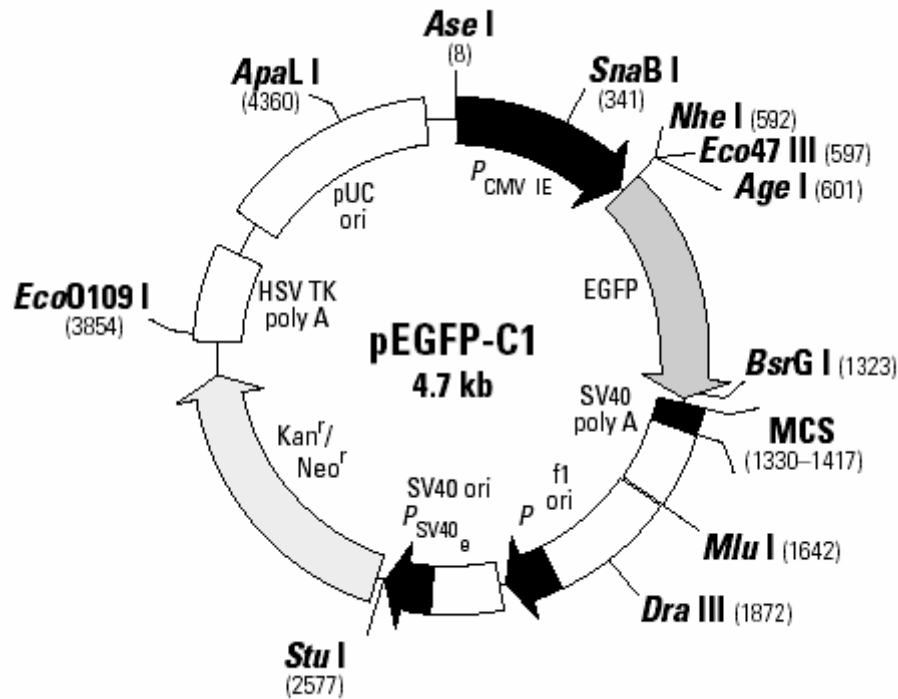


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Vektors pEGFP-C1.

4.9.4. Der Vektor pGL3-Promoter

Bei diesem Plasmid handelt es sich um einen 4,8 kbp großen eukaryotischen Expressionsvektor, der für die Firefly Luciferase kodiert (Promega). Die Luciferase steht unter Kontrolle des SV40-Promotors. Der Vektor dient zur quantitativen Analyse von Faktoren, die einen Einfluss auf die Genregulation in Säugerzellen haben. Die Faktoren können sowohl cis-, als auch trans-regulatorische Elemente sein. Hierzu zählen z.B. Enhancer und 3'-UTR's mit regulatorischen Funktionen, sowie DNA bindende Faktoren. Der Vektor besitzt als Selektionsmarker ein Ampicillinresistenzgen und verfügt ebenfalls über die Replikationsursprünge „ori“ und „f1 ori“. Dem Luciferasegen vorgeschaltet befindet sich die „multiple cloning site“ (MCS) und nachgeschaltet ein „SV40 late polyA Signal“ zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Die Vektorkarte ist in Abbildung 11 gezeigt.

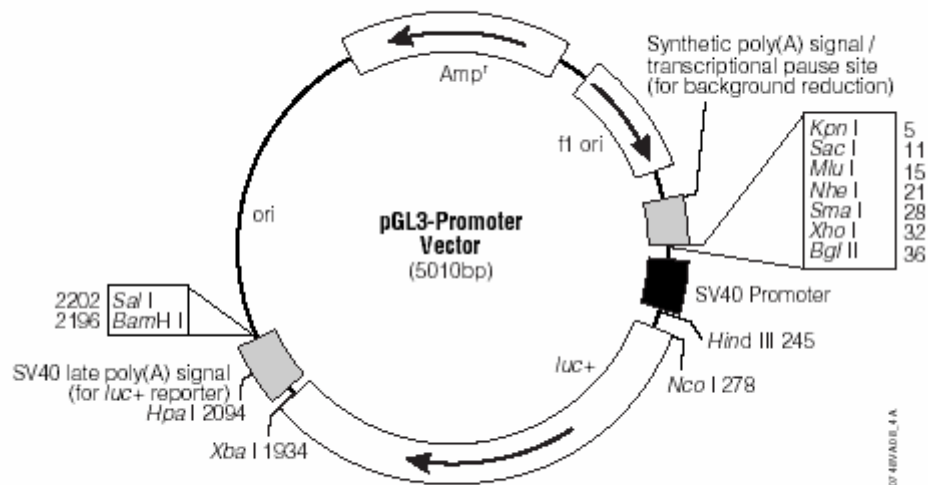


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Vektors pGL3-Promoter

4.9.5. Effektorplasmide

pSG5-miR-BART2:

Dieses Plasmid diente der Expression der miR-BART2 in Säugerzellen. Mittels PCR wurde mit den Primern BART2pSG5' und BART2pSG3' das miRNA-kodierende Fragment aus genomischer B95.8-Zell-DNA amplifiziert und über eine *EcoR I*-Schnittstelle eingefügt. Das Insert beinhaltet die Sequenz des miR-BART2 Vorläufers und flankierende Sequenzen (82 bp stromaufwärts und 98 bp stromabwärts). Diese sind notwendig um eine korrekte Prozessierung der Vorläufer pre-miRNA zur reifen miRNA zu gewährleisten (Zeng & Cullen, 2003). Das 240 bp große Fragment wurde über die Schnittstelle *EcoR I* in den pSG5-Vektor eingefügt. Ein Kontrollverdau zur Bestimmung der korrekten Orientierung des Inserts erfolgte mittels einer eingefügten *Bgl II* Schnittstelle (4,1 kB + 18 bp). Das Konstrukt ist in Abbildung 12 dargestellt.

pSG5-miR-155:

Dieses Plasmid diente der Expression der als Kontroll-miRNA verwendeten humanen miR-155 in Säugerzellen. Mit den Primern 5'Eco-miR155 und Bgl II-miR155 wurde ein 240 bp großes Fragment inklusive der flankierenden Sequenzen (80 bp stromaufwärts und 96 bp stromabwärts) aus humaner genomischer DNA amplifiziert

und über die Schnittstellen *Eco RI* und *Bgl II* in den pSG5-Vektor einkloniert (Abbildung 12). Zur Kontrolle der Orientierung wurde eine *Bgl II*-Schnittstelle eingefügt.

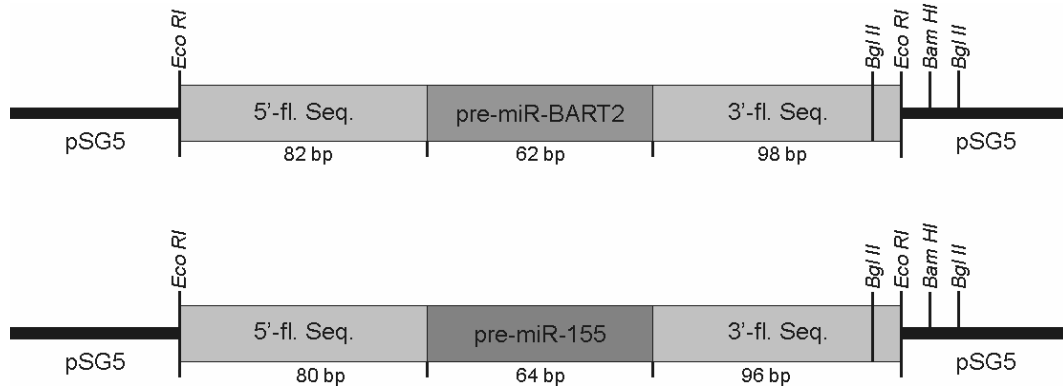


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Effektorplasmide pSG5-miR-BART2 und pSG5-miR-155.

Dargestellt sind die Vorläufer (pre-miRNA) mit flankierenden Sequenzen und den für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen.

pGL3-Prom-BALF5-3'-UTR:

Dieses Plasmid leitet sich von dem Vektor pGL3-Promoter ab. Die komplette BALF5-3'-UTR (Position 152188-153228 bp des EBV-Genoms, Gene Bank Accession Number AJ507799) mit einer Länge von 1058 bp wurde durch PCR mit den Primern BALF5-3'-UTR-for und BALF5-3'-UTR-rev aus B95.8-DNA amplifiziert und in die *Xba I*-Schnittstelle, unmittelbar im Anschluss an die Sequenz der Firefly-Luciferase, des Vektors einkloniert. Die vorhergesagte Bindungsstelle der miRNA liegt im Bereich 152747-152768. Ein Kontrollverdau konnte mittels einer im Primer eingefügten *Bgl II*-Schnittstelle erfolgen. Das Reportergenkonstrukt ist in Abbildung 15 schematisch dargestellt und diente der quantitativen Bestimmung des regulatorischen Einflusses von miR-BART2 auf die 3'-UTR von BALF5 durch den Nachweis der Expression des Luciferase-Gens.

pGL3-Prom-BALF5-3'-UTR-mut:

Bei diesem Luciferasekonstrukt, wurde die Bindungsstelle der miR-BART2 in der BALF5-3'UTR deletiert. Dazu wurde der Bereich der 3'-UTR vor der Bindungsstelle

(152188-152746) mittels PCR mit den Primern 5'-Eco/Nhe und 3'-Eco und der Bereich hinter der Bindungsstelle (152769-153228) mit den Primern 5'-Eco und 3'-Nhe amplifiziert. Beide Fragmente wurden über die eingebaute *Eco RI* Schnittstelle zusammengefügt und über *Nhe I*-Verdau in die *Xba I*-Schnittstelle des pGL3 Vektors einkloniert. In Abbildung 17 ist das Konstrukt schematisch dargestellt.

pGL3-Prom-LMP2A-3'-UTR:

Dieses Plasmid enthält die LMP2A-3'UTR direkt im Anschluss an das Luciferase-Gen und diente als unspezifisches Zielgen für die EBV-miR-BART2 in den Luciferase-Reporter-Experimenten. Das Insert wurde mittels PCR mit den Primern 5'-LMP2A-XbaI und 3'-LMP2A-XbaI amplifiziert und über die *Xba I*-Schnittstelle einkloniert.

p509:

Das Plasmid kodiert für das BZLF1-Gen von EBV. Expression von BZLF1 führt zur Induktion des lytischen Zyklus in EBV-positiven Zellen (Hammerschmidt & Sugden, 1988).

4.10. Oligonukleotide (Primer)

DNA-Oligonukleotide für die Klonierung (MWG-Biotech):

Die eingeführten Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung verwendet wurden, sind unterstrichen.

BART2-pSG5-Eco: 5'-GTCGAATTCGGGTGGTGTCTGCAGCAAAG-3'
Eco RI

BART2-pSG5-Eco/Bgl: 5'-TCTGAATTCAGATCTGCTTCAGACAGCCGCGGTTG-3'
Eco RI Bgl II

BALF5-3'-UTR-for: 5'-GCTCTAGATCTGGGGGCCTGAGACTGGACCC-3'
Xba I Bgl II

BALF5-3'-UTR-rev: 5'-GCTCTAGAGGAGTACCAGACAAAACACGCC-3'
Xba I

5'-Eco/Nhe: 5'-GACGAATTCGCTAGCTCTGGGGGCCTGAGACTGGACCC-3'
Eco RI Nhe I

3'-Eco: 5'-CGAGAATTCTGGAAGTCCACCAGGCAGGGAGG-3'
Eco RI

5'-Eco: 5'-TCGGAATTCGTGCCATTGTTGCAAGGAGCG-3'
Eco RI

3'-Nhe: 5'-GCGCTAGCTCTGGGGGCCTGAGACTGGACCC-3'
Nhe I

5'-Eco-miR155: 5'-CGCGAATTCCAGGAAGGGGAAATCTGT-3'
Eco RI

3'-Bgl-miR155: 5'-CGCGAATTCAGATCTGTTTATCCAGCAGGGTGACTC-3'
Eco RI Bgl II

5'-LMP2A-Xbal: 5'-GCTCTAGATCTTGGTTCTCCTGATTTGCTCTTC-3'
Xbal

3'-LMP2A-Xbal: 5'-GCTCTAGACACTCTCCGTGCCCAAGTGTTACC-3'
Xbal

DNA-Oligonukleotide für die Sondenmarkierung im Northern-Blot (MWG-Biotech):

Markierung am 5'-Ende mit Polynukleotidkinase (vgl. 5.6.2.3):

miR-BART2: 5'-GCAAGGGCGAATGCAGAAAATA-3'

Markierung mit T7-RNA-Polymerase (vgl. 5.6.2.4):

Die Sequenz zur Hybridisierung an den T7-Promotor-Primer ist unterstrichen.

miR-BART1: 5'-TCTTAGTGGAAGTGACGTGCTCCTGTCTC-3'

miR-BART2: 5'-TATTTTCTGCATTGCCCTTGCCCTGTCTC-3'

miR-155: 5'-TTAATGCTAATCGTGATAGGGGCCTGTCTC-3'

LNA-Oligonukleotide zum Ausschalten der miRNA (Exiqon, 50 nM, vgl. 6.5):

EBV-miR-BART2: 5'-GCAAGGGCGAATGCAGAAAATA-3'

Scramble-miR: 5'-GTGTAACACGTCTATACGCCCA-3'

4.11. Computersoftware

Zur Textverarbeitung diente Microsoft Word 2002™ (Microsoft Corp.). Grafiken wurden mit dem Programm CorelDRAW 12.0™ (Corel Corp.) erstellt. Nukleotid- und Protein-Sequenzabgleiche wurden über die Internetseiten des *NCBI* (National Center Of Biotechnology Information: www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/) und des *Human Genome Center, Baylor College of Medicine* (BCM Search Launcher: www.gc.bcm.tmc.edu:8088/search-launcher/launcher.htm/), sowie angeschlossener Dienste durchgeführt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Programme Sigma Plot 10.0, sowie CellQuest 3.1 (BD Biosciences) für FACS-Analysen.

Im Institut für klinische Biochemie und Molekularbiologie wurde zur Auswertung der radioaktiven Gele und Blots im PhosphorImager™SF (Molecular Dynamics) die Software Image Quant 5.1 verwendet.

Die Bearbeitung der immunfluoreszenzmicroskopischen Aufnahmen erfolgte mit Axio Vision 3.0.

4.12. Verwendete Laborgeräte

- **Blotkammern**

LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit (Nassblot)

Electro Blotting Unit (Stratagene; Semi-Dry Blot)

- **Durchflusszytometer**

FACScan (Becton-Dickinson, BD)

- **Fluoreszenzmicroskop**

Leica DM IRB/E mit der Kamera Axio-Cam Color der Fa. Zeiss

- **Luminometer**

Lumat LB9501, Berthold Technologies GmbH & Co. KG

- **PCR-Maschine**

Peltier Thermal Cycler 200 der Firma MJ Research

Light Cycler

- **Phosphoimager**

PhosphoimagerTM-SF mit Exponierplatten, -Kammer und Belichter, Personal Densitometer, Molecular Dynamics.

- **Photometer**

Pharmacia Biotech Ultraspec 3000

- **Ultraschallgerät**

Bronson Sonifier 250

- **UV-Crosslinker**

UV-Stratalinker 1800, Stratagene

- **UV-Gerät**

MWG Biotech Gelprint 2000 i

- **Zellanalysegerät**

CASY™-Counter, Scharf Systems

- **Zentrifugen**

Heraeus Megafuge 1,0 R (mit Kühlung)

Heraeus Picofuge (Tischzentrifuge ohne Kühlung)

Sigma 202 MK (Tischzentrifuge mit Kühlung)

5. Methoden

5.1. Bakterien-Techniken

5.1.1. Aufzucht und Lagerung von Bakterien

Zur Aufzucht und zum Zwecke der Amplifikation von Plasmiden wurden Bakterien mit dem entsprechenden Plasmid transformiert. Eine entsprechende Menge LB-Medium wurde mit den Bakterien angeimpft. Zum Animpfen des Mediums können auch Bakterien aus der Stammhaltung (DMSO-Stocks) benutzt werden.

Zur Aufzucht für analytische Zwecke wurden zunächst Bakteriensuspensionen auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien dienten anschließend zum Animpfen von 2,5 ml LB-Suspensionskulturen.

Die LB-Suspensionskulturen wurden für 12-16 Stunden bei 37°C aerob auf dem Schüttler inkubiert. Zur selektiven Kultivierung wurde den LB-Agarplatten und LB-Suspensionskulturen Ampicillin zugegeben (0,1% [w/v]). Zur Stammhaltung wurden 800 µl der Übernachtskulturen mit 20% (v/v) DMSO versetzt. Diese wurden bei -70°C eingefroren und gelagert. Kurzfristig wurden Bakterien in Form von Zellkolonien auf Agarplatten, die mit Parafilm abgedichtet waren, gelagert.

5.1.2. Herstellung kompetenter Bakterien

(CaCl_2 /RbCl-Methode; Kushner, 1978).

Für gentechnisches Arbeiten soll die Fähigkeit von Bakterien sich schnell zu vermehren und somit auch ihre DNA zu replizieren ausgenutzt werden. Dabei soll nur bestimmte Plasmid-DNA vermehrt werden, die in die Bakterien eingebracht werden muss. Um die Aufnahme der DNA zu erleichtern, wird eine Kompetenzinduktion der Bakterien durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird die Bakterienzellwand durch chemische Einflüsse durchlässig gemacht und DNA kann in die Zelle eingeschleust werden. Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurden 30 ml SOB-Medium mit bereits kompetenten Bakterien angeimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 200 ml SOB-Medium mit 8 ml

der Vorkultur angeimpft und bei 37°C inkubiert, bis die Bakterien sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden und die Suspension eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,3 erreicht hatte. Dann wurde die Bakterienkultur in 50 ml Aliquots 15 min auf Eis gehalten und anschließend 5 min bei 2000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 RF). Die Bakterienpellets wurden nun in jeweils 16 ml Transformationspuffer 1 resuspendiert und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 4°C und 2000 rpm für 5 min (Heraeus Megafuge 1.0 RF). Die Bakterienpellets wurden nun in jeweils 4 ml Transformationspuffer 2 resuspendiert, zu je 200 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -70°C.

Transformationspuffer 1:

RbCl	0,10 M
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,05 M
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 M
CH ₃ COOH (pH7)	0,03 M
Glycerol	15,0% (v/v)

ad 1000 ml H₂O_{bidest.}, sterilfiltriert
pH 5,8 mit 0,2 M CH₃COOH eingestellt

Transformationspuffer 2:

MOPS (pH6,8)	0,500 M
RbCl	0,010 M
CaCl ₂ ·H ₂ O	0,075 M
Glycerol	15% (v/v)

ad 1000 ml H₂O_{bidest.}, sterilfiltriert

SOB-Medium:

Trypton	20,0 g
Hefe-Extrakt	5,0 g
NaCl	0,6 g
KCl	0,5 g

ad 1000 ml H₂O_{bidest.}, autoklaviert
Zugabe von 20 mM MgCl₂ direkt vor Gebrauch

5.1.3. Transformation kompetenter Bakterien

(Lederberg & Cohen, 1974)

Mit dem Begriff Transformation wird die Überführung freier, löslicher DNA in eine dafür kompetente Bakterienzelle bezeichnet. Die eingesetzte, zirkuläre Plasmid-DNA trägt immer die Information für eine selbständige Replikation sowie Gene, die der Zelle eine Resistenz gegen bestimmte Antibiotika verleihen. Dadurch wird eine erfolgreiche Selektion von transformierten Zellen gesichert. Für die Transformation wurde ein 200 µl Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Etwa 60 µl des Aliquots wurden mit 20 ng Plasmid-DNA, bzw. mit 250 ng DNA (~10 µl) aus einem Ligationsansatz gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit hat die DNA die Gelegenheit sich an die Zelloberfläche der Bakterien anzulagern. Es erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 sec im Wasserbad, wodurch die Bakterienzellwand kurzfristig permeabel wird und die DNA in die Zelle eindringt. Nach 2 min Abkühlung auf Eis lässt die Permeabilität wieder nach. Dem Bakterienansatz wurde 1 ml LB-Medium zugegeben. Diese Vorkultur wurde bei 37°C für 30 min inkubiert. Um solche Bakterien mit Plasmid zu selektionieren wurde der Ansatz auf LB-Platten, die Ampicillin enthalten, ausplattiert bzw. entsprechendes LB-Medium damit angeimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Vorkultur soll den, durch den Hitzeschock gestressten, Bakterien das Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase erleichtern, bevor sie mit dem Antibiotikum in Kontakt kommen. Damit soll eine Erhöhung der Bakterienausbeute erreicht werden.

5.1.4. Blue/White Screening

Hierbei handelt es sich um eine Methode, mit deren Hilfe sich der Erfolg der Ligation eines Vektors mit dem entsprechenden Insert nachweisen lässt. Auf der Agarplatte kann optisch unterschieden werden zwischen Klonen, die den Vektor und das eingebaute Insert tragen und solchen die nur den Vektor ohne ligiertes Insert tragen. Das Prinzip dieses Screenings fußt auf einer enzymatischen Reaktion. Das Enzym β -Galaktosidase wandelt das Substrat X-Gal bei Vorhandensein des Induktors IPTG zu einem blauen Farbstoff um. Die Methode ist nur anwendbar bei Bakterienstämmen, die das Enzym β -Galaktosidase nicht enthalten (z.B. pMOS-Stamm). Außerdem

muss der zu klonierende Vektor das lacZ-Gen enthalten, das für die β -Galaktosidase codiert. Wenn das lacZ-Gen durch den Einbau eines Inserts unterbrochen wird, kann die β -Galaktosidase nicht mehr gebildet werden und die betroffenen Kolonien bleiben weiß. Entsprechend sind Bakterien, die mit einem Vektor ohne entsprechendes Insert transformiert werden (das lacZ-Gen ist nicht unterbrochen) in der Lage β -Galaktosidase zu bilden und die enzymatische Reaktion findet statt. Dies führt zu einer Blaufärbung dieser Kolonien.

5.2. Kultur eukaryotischer Zellen

5.2.1. Kultur von B-Zellen in Suspension

B-Zellen wurden in 50 ml RPMI 1640-Medium (Sarstedt, ergänzt mit 10% FKS, „4er Antibiotikum“ 1:1000 und 5% Na-Pyruvat) in 75 cm² Flaschen bei 37°C und 7% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich subkultiviert. Dabei wurde die Zellsuspension einmal pro Woche bei 4°C und 1200 rpm (Heraeus Megafuge 1.0 RF) abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und das erhaltene Zellpellet auf 2 Flaschen à 50 ml RPMI 1640-Medium mit den genannten Zusätzen verteilt. Hierdurch sollen schädliche Stoffwechselendprodukte aus dem Medium entfernt werden um ein besseres Wachstum der Zellen zu erreichen. Für die Zellkultur der B-Lymphozyten wurden ausschließlich Plastikpipetten verwendet, um den störenden Einfluss von Spülmittelrückständen an Glaspipetten zu vermeiden.

5.2.2. Kultur von Monolayerzellen

Monolayer Zellkulturen wachsen adhärent auf einer Unterlage. HeLa- und 293T-Zellen wurden in 20 ml DMEM-Medium, dem 10% FKS und 4er-Antibiotikum (40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 μ g/ml Neomycinsulfat und 50 μ g/ml Streptomycinsulfat) zugesetzt wurden in 75 cm² Flaschen bei 37°C und 7% CO₂ im Brutschrank kultiviert. 293EBV-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium kultiviert, welchem 10% FKS, 2,5% Penicillin/Streptomycin und Hygromycin (100 μ g/ml) zugesetzt wurden. Sie wurden ebenfalls in 75 cm² Flaschen bei 37°C und 7% CO₂ im

Brutschrank gehalten. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen durch Andauen mit Trypsin subkultiviert. Dazu wurde das Medium unter sterilen Bedingungen abgenommen, der Zellrasen einmal mit 1,5 ml Trypsin/EDTA gespült und mit 1 ml Trypsin/EDTA, nach kurzer Inkubation bei 37°C und 7% CO₂ abgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit DMEM-Medium verdünnt und 1 ml der Suspension in eine neue 75 cm² Flasche übertragen und auf 20 ml mit dem supplementierten DMEM- bzw. RPMI 1640-Medium aufgefüllt.

5.2.3. Transfektion eukaryotischer Zellen mit dem Transfektionsreagenz Nanofectin™

Das von PAA Laboratories angebotene Transfektionsreagenz Nanofectin™ zeichnet sich durch eine hohe Transfektionseffizienz bei geringer Zytotoxizität aus. Die DNA wird dabei an ein positiv geladenes Polymer gebunden und in poröse Nanopartikel eingebettet. Die Zelle nimmt den Komplex aus gebundener DNA und Nanopartikel über Endozytose auf. Die Komplexierung soll zudem die DNA-Degradierung in der Zelle verhindern. Die Transfektion der Zellen erfolgte nach Herstellerangaben. Die adhärent wachsenden Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion ausgesät und dann transfiziert, wenn sie zu etwa 60% konfluent waren. Für 24-Loch Platten wurde in der Regel pro Loch 1 – 1,2 µg DNA und 3,2 µl Nanofectin™ eingesetzt.

5.2.4. Transfektion eukaryotischer Zellen mit dem Transfektionsreagenz Metafectene™

Das Transfektionsreagenz Metafectene™ (Biontex) kann zur Transfektion von eukaryotischen Zellen mit DNA, RNA oder siRNA verwendet werden. Im Medium vorhandenes Serum beeinflusst nicht die Wirkung des polykationischen Reagenz. Metafectene™ ist gut geeignet für sensitive Zellen und wurde in dieser Arbeit zur Transfektion von 293EBV-Zellen eingesetzt. Die Nukleinsäuren werden in recht kompakten Strukturen komplexiert, durch die dann die Freisetzung in der Zelle über so genanntes „Endosome Buffering“ vermittelt wird. Typischerweise wurden die

Zellen in 6-Loch Platten ausgesät und am darauffolgenden Tag transfiziert. Pro Loch wurden 1,5 µg DNA und 4,5 µl Metafectene™ verwendet.

5.2.5. Bestimmung der Zellzahl mit dem Zellanalysegerät CASY™

Zur exakten quantitativen Bestimmung der Zelldichte und gleichzeitiger qualitativer Analyse der Größenverteilung einer Zellpopulation wurde ein definiertes Volumen (7 µl) der Population im 10³-fachen Volumen (7 ml) einer definierten Elektrolytlösung (CASYTon™) resuspendiert und in einem CASY™-Counter (Scharf-Systems) analysiert. Zellgröße und Integrität der Zellmembran beeinflussen den gemessenen elektrischen Widerstand der Elektrolytlösung beim Durchtritt der Zellen durch eine im Gerät befindliche Kapillare und können anhand des ausgegebenen Histogrammes dokumentiert werden.

5.2.6. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie bzw. FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter) wird eingesetzt zur Analyse von Einzelzellen durch Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Hierbei werden in einer Lösung befindliche Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Argon-Laserstrahl ($\lambda=488$ nm). Das Sensormodul misst die relative Intensität des emittierten Streulichts. Das Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward Scatter*) wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht SSC (*Side Scatter*) wird durch Brechung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Granularität (Struktur der Zelle). Auch Fluoreszenzfarbstoffe können durch den Laserstrahl angeregt werden. Dies erlaubt eine durchflusszytometrische Analyse von Zellen, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper markiert wurden oder einen Fluoreszenzfarbstoff exprimieren (z.B. EGFP). Das emittierte Licht wird über ein optisches System gemessen. Die Ausgabedimension des Gerätes sind relative Lichtintensitäten, die in Form von Punktdiagrammen, Intensitätskurven oder Histogrammen dargestellt und miteinander korreliert werden können.

Für diese Arbeit wurden die Zellen mit pEGFP kotransfiziert, um die Transfektionseffizienz im FACScan™ (Beckton Dickinson) zu bestimmen. 100 µl der zu analysierenden Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit 100 µl FACS-Fixierlösung fixiert und dann im FACScan™ analysiert. Mit dem mock-transfizierten Ansatz (Heringssperma-DNA ohne pEGFP) wurde die noch lebende Zellpopulation deutlich von den toten Zellen abgegrenzt. Diese lebende Zellfraktion wurde als Nullwert definiert, der die Grundlage der Messung pEGFP-transfizierter Zellen bildet. Anschließend wurde durch Einteilung des Punktediagramms in Quadranten der Prozentsatz pEGFP-transfizierter Zellen innerhalb der lebenden Population ermittelt. Von diesem Prozentsatz wird auf die relative Transfektionseffizienz in den einzelnen Ansätzen rückgeschlossen.

FACS-Fixierlösung :	Paraformaldehyd	2% (w/v)
	NaCl in PBS	150 mM
	pH-Wert auf 7,5 eingestellt	

5.3. DNA-Techniken

5.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA

5.3.1.1. Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipräparation, „Boiling-Präp“)

(modifiziert nach Birnboim & Doly, 1979).

Mit dieser Methode lassen sich maximal etwa 5 µg DNA gewinnen. Einzelkolonien wurden in 2,5 ml LB-Medium mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin angeimpft und nach Inkubation über Nacht (37°C auf dem Schüttler) abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm, 4°C, Sigma Kryofuge 202MK). Das entstandene Zellsediment wurde in 200 µl STET-Puffer mit Lysozym (0,5 mg/ml) resuspendiert und anschließend 45 sec im Wasserbad bei 98,5°C gekocht. Der Ansatz wurde kurz auf Eis gekühlt und dann abzentrifugiert (25 min, 13000 rpm, 4°C, Sigma Kryofuge 202MK). Das somit entstandene Pellet aus unerwünschten Zellresten wurde mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen und verworfen. Um die DNA zu fällen wurde 200 µl

Isopropanol zugegeben, gemischt und abzentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4°C, Sigma Kryofuge 202MK). Zum Schluss wurde das DNA-Pellet noch mit 70%igem eiskalten Ethanol gewaschen und abzentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4°C, Sigma Kryofuge 202MK), um Salze entfernen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 20-30 µl TE-Puffer mit RNase A (100 µg/ml) aufgenommen. Um noch vorhandene RNA zu verdauen wurde dieser Ansatz für 10 min bei 37°C inkubiert und kann dann schließlich bei 4°C gelagert werden.

5.3.1.2. Präparative Plasmidisolierung (NUCLEOBOND™-Methode)

Zur Herstellung von Plasmid-DNA in großen Mengen und mit einem hohen Reinheitsgrad wurde der NUCLEOBOND™-Kit von Marcherey Nagel verwendet. Bei dieser Methode wurden die Bakterien einer alkalischen Lyse und einer anschließenden Ionenaustauscher- chromatographie über NUCLEOBOND™-Säulen nach Firmenvorschrift unterzogen. Durch Verwendung von NUCLEOBOND™-AX 100-Säulen (Midipräparation) können ca. 100 ml, mit NUCLEOBOND™-AX 500-Säulen (Maxipräparation) 200-500 ml Bakterienkultur aufgearbeitet werden. Eine Übernachtskultur wurde 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 RF), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet bei Midipräparationen [Maxipräparationen] in 4ml [10 ml] Puffer S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml [10 ml] Puffer S2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Das im Puffer enthaltene SDS löst die bakterielle Zellmembran auf, und führt so zur Lyse der Zellen und zur Freisetzung der Zellbestandteile. Das enthaltene NaOH denaturiert die chromosomale DNA. Anschließend wurden 4 ml [10 ml] Puffer S3 zugegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Dadurch wird das Lysat neutralisiert, wobei die kleinere, kovalent geschlossene Plasmid-DNA wieder renaturiert und in Lösung bleibt. Die chromosomale Wirts-DNA präzipitiert nach dieser Behandlung. Der Ansatz wurde 30 min bei 6000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 RF). Danach wurde der DNA-enthaltende Überstand auf die AX 100-NUCLEOBOND™-Säule [AX 500-NUCLEOBOND™-Säule] gegeben, die zuvor mit 4 ml [10 ml] Puffer N2 äquilibriert war. Aufgrund der Salz- und pH-Bedingungen im Lysat bindet nur Plasmid-DNA an die Säule und wird zurückgehalten. Nach Waschen der Säule zur Entfernung von Proteinen mit 2 × 5 ml

[3 × 10 ml] Puffer N2 wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml [15 ml] Puffer N5 eluiert und mit 3,5 ml [10,5 ml] Isopropanol (100%) gefällt. Das durch 60 min Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C (Heraeus Megafuge 1.0 RF) erhaltene Pellet wurde mit eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Resuspension des DNA-Pellets in 100 [200] µl TE-Puffer wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (siehe unter 3.3.2.) und ein Kontroll-Restriktionsverdau durchgeführt.

Puffer S1 (pH 8,0):	Tris-HCl	50	mM
	EDTA	10	mM
	Rnase A	100	µg/ml
Puffer S2:	NaOH	200	mM
	SDS	1%	(w/v)
Puffer S3 (pH5,1):	Kaliumacetat	2,8	M
Puffer N2 (pH6,3):	Tris-H ₃ PO ₄	100	mM
	Ethanol	15%	(v/v)
	KCl	900	mM
	Triton X-100	0,15%	(v/v)
Puffer N3 (pH6,3):	Tris-H ₃ PO ₄	100	mM
	Ethanol	15%	(v/v)
	KCl	1,15	M
Puffer N5 (pH8,5) :	Tris-H ₃ PO ₄	100	mM
	Ethanol	15%	(v/v)
	KCl	1	M

5.3.2. Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

(Maniatis, 1989)

Nukleinsäuren absorbieren Licht der Wellenlänge 260 nm, deshalb stellt die photometrisch gemessene Absorption bei 260 nm ein Maß für den Nukleinsäuregehalt der Lösung dar.

Eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei $\lambda = 260$ nm entspricht bei doppelsträngiger DNA (dsDNA) einer Konzentration von 50 mg/ml, einzelsträngiger DNA (ssDNA) und RNA einer Konzentration von 40 mg/ml. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Nukleinsäurelösungen wurde der Quotient der Extinktionswerte bei 260 nm und bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) ermittelt ($OD_{260 \text{ nm}}/OD_{280 \text{ nm}}$). Bei reinen DNA Lösungen liegt dieser Wert zwischen 1,65 und 1,85. Tiefere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten, höhere Werte zeigen größere Mengen an RNA an.

Für die Messung wurden 3,5 μ l DNA- bzw RNA-Lösung 1:100 mit H_2O_{bidest} verdünnt, und die OD_{260} sowie OD_{280} in einem Ultrospec 3000 Photometer (Pharmacia) gemessen. Als Referenz diente H_2O_{bidest} .

5.4. Enzymatische Modifikation von DNA

5.4.1. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

(Restriktionsverdau)

(Maniatis, 1989)

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die hochspezifisch Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und sie durch Spaltung der Phosphodiesterbindung im DNA-Rückgrat vollständig trennen. Die spezifischen Erkennungssequenzen umfassen 4-8 Basenpaare, die normalerweise auch die Schnittstelle selbst beinhalten. Häufig handelt es sich bei diesen Sequenzen um Palindrome. Das Schneiden führt zu glatten Enden („blunt ends“), wenn zwischen direkt gegenüberliegenden Basenpaaren geschnitten wird oder zu klebrigen Enden („sticky ends“) bei denen ein versetztes Aufschneiden der DNA erfolgt, wobei entweder ein

3'- oder ein 5'-Überhang entsteht. Die Wirksamkeit der Enzyme wird in Units angegeben. Ein Unit (u) ist definiert als die Menge Enzym, die in der Lage ist, 1 µg DNA in optimalem Milieu und bei optimaler Temperatur (meistens 37°C) innerhalb von 60 min vollständig zu schneiden. Der Vorgang des Schneidens wird auch als „Restriktionsverdau“ bezeichnet. In den Verdauansätzen wurden für analytische Zwecke 0,5-1 µg DNA und für präparative Zwecke bis zu 4 µg DNA verwendet. Die Anzahl der eingesetzten Units betragen je nach Enzym zwischen 2-10 U/µg DNA, wobei das Volumen an zugesetztem Enzym wegen des in der Enzymlösung vorhandenen Glycerols 1/10 des Reaktionsansatzes nicht überschreiten durfte. Eine Glycerolkonzentration von über 5% (v/v) des Gesamtvolumens hat eine unspezifische Fragmentierung der DNA durch das Enzym zur Folge. Der Verdau wurde jeweils unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen (Temperatur und Inkubationsdauer), mit den mitgelieferten 10fach konzentrierten Puffern und, wenn benötigt, unter Zusatz von BSA durchgeführt. Es ist auch möglich DNA mit mehreren Enzymen in einem Ansatz zu fragmentieren, z.B. als „Doppelverdau“ mit zwei unterschiedlichen Enzymen. Voraussetzung ist, dass die Enzyme im gleichen Puffermilieu angemessen schneiden, ansonsten ist ein sequenzieller Verdau notwendig.

5.4.2. Dephosphorylierung von Vektor-DNA

(Bolivar, 1977; Chaconas, 1980)

Um eine Rezirkularisierung bzw. eine Konkatemerisierung von linearisierter Vektor-DNA zu verhindern, werden die linearisierten Vektoren, vor der Ligation mit dem Insert, mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (CIP, calf intestinal phosphatase) dephosphoryliert. Dieses Enzym spaltet vom freien 5'-Ende der DNA die reaktive Phosphatgruppe ab.

Ein Standardreaktionsansatz enthielt 20 µl der verdauten Vektor-DNA, 1 µl alkalische Phosphatase, 3 µl mitgelieferter 10-fach Reaktionspuffer und wurde mit 6 µl H₂O_{bidest} auf 30 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 2 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die DNA wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und durch Gene-Clean™ oder NUCLEOSPIN™-Säulen reisoliert. Bei Vektoren, die mit zwei unterschiedlichen

Restriktionsenzymen geschnitten wurden und deren sticky ends demzufolge auch nicht komplementär zueinander sind, ist eine Rezirkularisierung unwahrscheinlich, eine Verbindung mehrerer Vektoren miteinander jedoch möglich. Aus diesem Grund wurde auch in solchen Fällen eine Dephosphorylierung durchgeführt.

5.4.3. Ligation von DNA-Fragmenten

(Dugaiczky, 1975; Sgaramella et al., 1970)

Die T4-DNA-Ligase stammt aus *E.coli*-Bakterien, die mit dem Bakteriophagen T4 infiziert sind. Mit Hilfe dieses Enzyms können *in vitro* zwei Nukleinsäuremoleküle miteinander verknüpft werden, indem die Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden geknüpft und somit die Bildung einer intakten, rekombinanten ds-DNA ermöglicht wird. Die Enden der beiden Nukleinsäuremoleküle müssen dabei kompatibel sein, d.h. eine komplementäre Sequenz aufweisen. Die T4-DNA-Ligase benötigt für die Katalyse ATP als Cofaktor und Energiequelle. Die Effektivität der Ligation ist abhängig von den eingesetzten Konzentrationen an Vektor- und Insert-DNA. Diese wurden daher so gewählt, dass sie im Reaktionsansatz äquimolar vorliegen (je 0,5-1 µg). Nach Zugabe von 2 µl 10fach Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase [1 U/µl] wurde der Ligationsansatz auf ein Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl mit H₂O_{bidest} aufgefüllt und 4 h oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Zur Klonierung von PCR-Fragmenten ohne vorhergehende Modifikation wurde der TA-Klonierungsvektor pGEM-T™ (Promega) eingesetzt und der Ansatz für 1 h oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Hälfte der Ligationsansätze (10 µl) wurde nach Inkubation direkt zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt, die andere Hälfte für eventuell notwendige Wiederholungsschritte bei 4°C gelagert. Zu jeder Ligation wurde als Überprüfung einer erfolgreichen Dephosphorylierung eine Kontrolle mit dephosphoryliertem Vektor ohne Insert mitgeführt. Das Wachstum von Transformanten wäre dann ein Beweis mangelnder Dephosphorylierung. Außerdem wurde noch eine Transformationskontrolle durchgeführt mit einem zirkulären Vektor, der den Bakterien nach erfolgreicher Transformation eine Antibiotika-Resistenz verleiht. Es gibt also Bakterienwachstum, was als Nachweis für eine erfolgreiche Transformation gilt.

Ligasepuffer (10×):	ATP	10 mM
	MgCl ₂	50 mM
	DTT	10 mM
	Tris/HCl (pH 7,5)	660 mM

5.5. Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA

(Maniatis, 1989)

Die Agarosegelelektrophorese wird verwendet um Nukleinsäuren aufzutrennen und DNA Fragmente unterschiedlicher Größe sichtbar zu machen. DNA ist wegen des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und wandert im elektrischen Feld zur Anode. Agarosegele wirken dabei wie Molekularsiebe. Sie bewirken, dass kleinere Moleküle schneller durch die Poren des Gels wandern, als große. Das konstante Masse-Ladungs-Verhältnis führt zu einer Auftrennung der DNA Fragmente entsprechend ihres Molekulargewichts. Somit kann durch die Wahl einer geeigneten Agarosekonzentration eine optimale Auftrennung der DNA Moleküle erreicht werden. Je geringer die Agarosekonzentration ist, desto größer sind auch die Poren der Gelmatrix. Als Puffer wurde Tris-Acetat-Puffer (TAE) verwendet. Die Anfärbung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid. Dieser interkaliert in doppelsträngige DNA, sodass die DNA-Fragmente unter UV-Licht als orange gefärbte Banden erkennbar und dokumentierbar sind.

5.5.1. Herstellung eines Agarosegels

Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarosegele mit der jeweils geeigneten Konzentration eingesetzt (zwischen 0,6% und 2,0% w/v). Die entsprechende Agarosemenge wurde in 450 ml 1fach TAE-Puffer durch Aufkochen im Microwellenherd (ca. 5 min bei 750 W) gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C mit 25 µl Ethidiumbromid [Stammlösung: 10 mg/ml in H₂O] versetzt. Anschließend wurde die Agaroselösung auf Glasplatten mit Kunststoffeinfassung (24,5 × 24,5 × 1 cm), die zuvor mit 1%iger Agarose abgedichtet wurde, gegossen. Durch an dem Kunststoffrahmen befestigte PVC-Kämme, wurden im Gel

Probetaschen ausgespart, die nach der Polymerisation ca. 35 µl Fassungsvermögen hatten. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurden die Kämme entfernt, das Gel in Klarsichtfolie eingepackt und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 3: Ideale Agarosekonzentrationen für bestimmte DNA-Trennbereiche

Agarosemenge (%)	DNA-Trennbereich (kbp)
0,3	60-5
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2	3-0,1

5.5.2. Agarosegelelektrophorese

Um die Dichte der DNA Lösung zu erhöhen und das Absinken in die Geltaschen zu verbessern wurde den Proben 1/5 ihres Gesamtvolumens mit glycerolhaltigem Blaumarker zugesetzt. Der enthaltene Farbstoff Bromphenolblau hat zusätzlich den Effekt, dass die Lauffront der DNA im Gel zu erkennen ist. Zusätzlich sorgt das enthaltene EDTA als Chelatkomplexbildner dafür, dass den Enzymen die für ihre Funktion essenziellen divalenten Kationen entzogen werden und inaktiviert sie somit. Aufgrund dieser beiden Funktionen wird der Blaumarker auch als „Stopp-Lade-Mix“ bezeichnet. Das Gelstück in benötigter Größe wurde in eine Elektrophoresekammer, gefüllt mit 1x TAE-Puffer, gelegt und die Proben submers in die Taschen pipettiert. Parallel dazu wurde eine Markerspur (10 µl 1 kb plus DNA ladder™ (Life technologies), vgl.2.4.1.) zum Größenvergleich der Fragmente aufgetragen. Die DNA wurde durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt (1-2 h; 80-130 V). Dabei wurde darauf geachtet, dass das Gel mit Puffer bedeckt war. Sollten die Größen der Fragmente analysiert und das Gel fotografiert werden, so wurde die DNA mit kurzwelligem UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht (Geldokumentationssystem MWG Biotech Gel Print 2000i). Das kurzwellige UV-Licht schädigt die DNA sehr stark, was sie unbrauchbar macht für gentechnisches Arbeiten. Deshalb wurden zu präparativen Zwecken die entsprechenden Fragmente unter langwelligem UV-Licht ($\lambda=366 \text{ nm}$) ausgeschnitten.

5.5.3. Gene-Clean™-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung spezifischer DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des Gene-Clean™-Kits (Dianova) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Diese Methode erlaubt eine Aufreinigung von DNA-Fragmenten, die größer als 130 bp sind. Das entsprechende DNA-Fragment wurde unter langwelligem UV-Licht ($\lambda=366$ nm; siehe 3.5.2) mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Es wurde das 2,5- bis 3-fachen Volumen an 6 M NaI-Lösung zugegeben, welches die Denaturierung der DNA verhindert. Das Gelstück wurde zum Auflösen für 10 min bei 55°C inkubiert. Abhängig von der DNA-Menge wurde dem aufgelösten Gelstück 4-8 µl Glasmilch (Gene-Clean™-Kit) zugegeben. Zur Bindung der DNA an die Glasmilch wurde das Gemisch für eine Stunde oder über Nacht auf einem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Sedimentation der Glasmilch wurde der Ansatz anschließend 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge), der Überstand verworfen, das Glasmilchpellet dreimal mit je 400 µl NEW-WASH™-Lösung (Gene-Clean™-Kit) gewaschen und erneut 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge). Um die DNA aus dem Glasmilchpellet zu eluieren, wurde das gewaschene Pellet in 20 µl TE-Puffer resuspendiert, der Ansatz für 5 min bei 55°C inkubiert und anschließend nochmals 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge). Der DNA enthaltende Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. 3 µl dieses Überstandes wurden zur Überprüfung der Reisolierung auf ein Agarosegel aufgetragen.

5.5.4. Nucleo-Spin™-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA Fragmente mit einer Größe unter 5 kb können mit Hilfe des NUCLEOSPIN™-Kits nach Angaben der Herstellerfirma Macherey & Nagel aus den Agarosegelen isoliert werden. Diese Methode basiert auf einer Ionenaustauschchromatographie, bei der die DNA an vorgefertigte gepackte Säulen, die Silicagel enthalten, gebunden wird. Nach mehreren Waschschritten wurde die gereinigte DNA durch geänderte Pufferbedingungen von der Säule eluiert.

5.6. RNA-Techniken

5.6.1. Isolierung von RNA aus Zellen mittels Trifast™

Um die Gesamt-RNA aus den Zellen zu isolieren wurde das Trifast™-Reagenz der Firma peQLAB nach einem modifizierten Protokoll benutzt. Das Reagenz enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat in einphasiger Lösung. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in drei Phasen auf, was auch eine Extraktion von DNA und Proteinen aus dem gleichen Ansatz ermöglicht. Die RNA befindet sich in der wässrigen, oberen Phase, die DNA in der organischen unteren und Interphase. Proteine sind in der organischen Phase enthalten. Durch das Guanidinisothiocyanat werden RNAsen effizient gehemmt, was eine Durchführung der Extraktion bei Raumtemperatur ermöglicht. Auf das Waschen der gefällten RNA mit 75%igem Ethanol wird verzichtet, um den Verlust von kleinen RNA's, die darin löslich sind, zu vermeiden. Man erhält qualitativ und quantitativ gute Ausbeuten an nicht degradiertes Gesamt-RNA.

5.6.2. Northern Blot

5.6.2.1. Herstellung eines harnstoffhaltigen Polyacrylamidgeles

Zur Herstellung von Polyacrylamidgelen für die Elektrophorese von RNA, wurde das SequaGel™-Kit (national diagnostics) benutzt. Dieses besteht aus 3 Komponenten (SequaGel™-Konzentrat, -Verdünner und -Puffer), die nach den Angaben in Tabelle 4 eingesetzt wurden. Die Lösungen in diesem Kit enthalten bereits alle notwendigen Inhaltsstoffe, insbesondere 7M Harnstoff, der eine Denaturierung der RNA zur Folge hat. Nach Zugabe von APS und TEMED wird der fertige Ansatz zwischen 2 Glasplatten (24 x 16,5 cm) gegossen, ein Kamm für 16 Taschen eingefügt und auspolymerisieren gelassen (vgl. auch 5.10.3.1).

Tabelle 4: Komponenten eines 12%igen Polyacrylamidgels zur Auftrennung von RNA

Komponente	Menge (12%)
SequaGel™-Konzentrat	24 ml
SequaGel™-Verdünner	21 ml
SequaGel™-Puffer	5 ml
APS (10%)	400 µl
TEMED	20 µl

5.6.2.2. Elektrophorese und Membrantransfer

Die Auftrennung der RNA erfolgte in 12%igen Polyacrylamidgelen (siehe 5.6.2.1). Die Konzentration der RNA wurde im Photometer bestimmt (siehe 5.3.2). Pro Tasche wurden standardmäßig 100 µg RNA aufgetragen, die zuvor mit dem gleichen Volumen eines 2x RNA-Bromphenolblau-Ladepuffers versetzt wurden. Als Laufpuffer wurde 1x TBE Puffer verwendet. Das Gel lief zuerst für 10 min mit einer Leistung von 10 W, um eine Konzentrierung der Proben zu erreichen. Dann wurde die Leistung für eine weitere Stunde auf 30 W erhöht. Die Bromphenolblau-Bande sollte dabei etwa $\frac{3}{4}$ des Gels durchlaufen haben. Um die RNA sichtbar zu machen wurde das Gel 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (100 ml 1x TBE + 10 µl Ethidiumbromidstammlösung [10 mg/ml]) gefärbt und anschließend unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm mit dem Geldokumentationssystem Gel Print 2000i (MWG Biotech) fotografiert.

Der anschließende Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (Hybond XL, Amersham) erfolgte nach dem Semidry-Elektroblot Verfahren in einer Semidry-Blotkammer (Star Lab GmbH, Ahrensburg). Hierzu wurden Whatmanpapier und Nylonmembran auf Gelgröße zurechtgeschnitten, mit TBE befeuchtet und wie folgt aufeinander gestapelt, wobei die Reihenfolge von Anode zu Kathode beschrieben wird. 5 Lagen Whatmanpapier, Nylonmembran, Polyacrylamidgel, 5 Lagen Whatmanpapier. Der Transfer wurde bei einer Stromstärke von 3 mA/cm² Membran für 30 min durchgeführt (die Spannung sollte 25 V nicht übersteigen). Um die RNA kovalent an die Nylonmembran zu binden, wurde ein UV-Crosslink im UV

Stratalinker™ 1800 (Stratagene) durchgeführt. Zuerst wurde die Rückseite der noch feuchten Membran 2x bei 120.000 μJ kreuzvernetzt („Auto Crosslink“). Dann wurde die Membran getrocknet und schließlich die Vorderseite der Membran, also auf der RNA-Seite, ebenso behandelt. Zum Schluss wurde die Membran im Wärmeschrank bei 80°C für 1 h gebacken um die Bindung der Sonden zu verbessern.

2x RNA-Bromphenolblau-Ladepuffer (30 ml):

Harnstoff	8 M
EDTA (ph 8,0)	50 mM
Bromphenolblau	0,3 mg/ml

5.6.2.3. Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden am 5'-Ende

Für die Detektion wurden DNA-Oligonukleotid-Sonden verwendet. Die Markierung erfolgte über den Transfer des radioaktiv markierten γ -Phosphates der Substanz γ^{32} -ATP (Hartmann Analytic) an das 5'-Ende des Oligonukleotids mit T4-Polynukleotidkinase (New England Biolabs). Der Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Komponente	Menge
Oligonukleotid (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1 μl
γ^{32} -ATP (6000 Ci/mmol)	5 μl
T4 PNK-Puffer (10x)	2 μl
T4 PNK	1 μl
H ₂ O	11 μl

Zum Stoppen der Reaktion wurden 30 μl einer 30 mM EDTA Lösung (pH 8,0) zugegeben. Um nicht eingebaute, radioaktive Nukleotide zu entfernen wurde der Ansatz mittels einer Zentrifugation über eine Sephadex G25 Spin Säule (Roche) aufgereinigt. Die verbliebene Polynukleotidkinase konnte durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 90-95°C für 1 min inaktiviert werden.

5.6.2.4. Herstellung radioaktiv-markierter RNA-Sonden mittels T7-RNA-Polymerase

Diese Methode wurde im späteren Verlauf der Arbeit benutzt. Durch den Einbau von mehreren radioaktiven Uracil Molekülen wird eine höhere spezifische Aktivität und durch die Tatsache, dass es sich um RNA-Sonden handelt eine bessere Bindung an die Ziel-RNA ermöglicht. Es wurde der *mirVana*TM miRNA Labeling Kit (Ambion) gemäß dem Herstellerprotokoll benutzt. Die entsprechenden DNA-Oligonukleotide wurden so bestellt, dass sie einen Überhang besaßen, der mit einem T7 Promotor Primer hybridisieren kann (vgl. 4.10). Für die Hybridisierung wurden 2 µl des T7 Promotor Primers mit 6 µl DNA-Hybridisierungspuffer und 2 µl DNA-Oligonukleotid (100 µM) gemischt, bei 70°C für 5 min inkubiert und bei RT für 5 min stehen gelassen. Im Anschluss wurde der Gegenstrang mit dem Enzym Exo-Klenow-DNA-Polymerase und dNTPs aufgefüllt nach folgendem Ansatz:

Komponente	Menge
10x Klenow Reaktionspuffer	2 µl
10x dNTP-Mix	2 µl
Nuklease freies H ₂ O	4 µl
Exo-Klenow	2 µl

Das resultierende Doppelstrang DNA Template konnte nun für die Transkriptionsreaktion eingesetzt oder bei -20°C eingelagert werden für spätere Anwendung. Die Transkription erfolgte mit ^{32}P -markiertem UTP in folgender Reihenfolge:

Komponente	Menge
Nuklease freies H_2O	7 μl
dsDNA-Template	1 μl
10x Transkriptionspuffer	2 μl
10 mM ATP	1 μl
10 mM CTP	1 μl
10 mM GTP	1 μl
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (3000 Ci/mmol)	5 μl
T7 RNA Polymerase	2 μl

Der Ansatz wurde gevortext, abzentrifugiert und dann 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde $1\mu\text{l}$ DNase I zu dem Ansatz zugegeben und 15 min bei 37°C inkubiert zum Verdau der verbliebenen DNA. Zur Entfernung der nicht eingebauten, radioaktiven Nukleotide wurde der Ansatz mittels einer Zentrifugation über eine Sephadex G25 Spin Säule (Roche) aufgereinigt.

5.6.2.5. Hybridisierung der Membran

Die RNA-tragende Membran wurde in eine spezielle zylindrische Flasche mit 30 ml Hybridisierungspuffer ohne Sonde gegeben und unter Rotieren im Hybridisierungssofen bei 50°C für 1 h prähybridisiert. Diese Lösung wurde dann gegen 30 ml der Hybridisierungslösung, in die vorher die Sonde (3.000.000 cpmA) pipettiert wurde ausgetauscht. Das Hybridisieren der Sonde an die RNA erfolgte schließlich über Nacht bei 50°C unter Rotation im Hybridisierungssofen.

Hybridisierungspuffer (30 ml)	:	20x SSC	7,5 ml
		10% SDS	21 ml
		1 M Na ₂ HPO ₄ (ph 7,2)	0,6 ml
		50x Denhardt's Solution	0,6 ml
		Heringssperma DNA (10 mg/ml)	0,3 ml

5.6.2.6. Waschen und Exposition

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung mit der enthaltenen Sonde aus der Flasche entfernt. Sie kann bei -20°C gelagert werden und für eine weitere Hybridisierungsreaktion verwendet werden. Um Reste der Sonde zu entfernen wurde die Membran 2x für je 15 min mit 30 ml der Waschlösung I (5x SSC/1% SDS) und anschließend 2x für je 15 min mit 30 ml der Waschlösung II (1x SSC/1% SDS) gewaschen. Alle Waschschrte erfolgten bei 50°C unter Rotation im Hybridisierungssofen. Zum Schluss wurde die Membran aus der Flasche entnommen, in Frischhaltefolie eingepackt und entweder ein Phosphor-Imager Screen oder ein X-OMat Röntgenfilm (Kodak) aufgelegt.

5.7. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein enzymatisches Verfahren, das es ermöglicht *in vitro* aus einem Gemisch von Nukleinsäurenmolekülen einen DNA-Bereich definierter Länge und Sequenz selektiv zu amplifizieren und somit anzureichern. Dieses Verfahren nutzt die Fähigkeit der DNA-Polymerase von einem freien 3'-Hydroxy-Ende eines Doppelstrangbereiches ausgehend einen zur einzelsträngigen DNA-Matrize (Template) komplementären Strang zu synthetisieren. Eingesetzt werden künstlich synthetisierte Oligonukleotide von definierter Sequenz als „Primer“. Für eine Polymerase-Kettenreaktion werden zwei solche Oligonukleotide benötigt. Die Auswahl erfolgt so, dass ein Primer den positiven und der andere den negativen Strang der denaturierten einzelsträngigen DNA bindet. Es muss also die DNA-Sequenz des Templates bekannt sein um die Primer spezifisch für den DNA-Bereich

auswählen zu können. Die PCR wird in automatisierten Thermocyclern durchgeführt, die nach entsprechender Programmierung automatisch die Reaktionsschritte bewerkstelligen. Erster Schritt der Amplifikation ist die Denaturierung (Melting) der ds-DNA Matrize (Template). Das Melting erfolgt durch Erhitzung auf eine Temperatur über dem Schmelzpunkt der Matrize (etwa 94°C). Nach einer folgenden Abkühlung können sich die synthetischen Oligonukleotide (Primer), die zu jeweils einem der Matrizenstränge komplementäre Bereiche besitzen, an diese anlagern (Annealing). Dafür wird eine Temperatur gewählt, die abhängig ist vom Schmelzpunkt und letztlich dem GC-Gehalt der verwendeten Primer-DNA. Sie wird für jeden Primer bestimmt und gemittelt. Meist liegen die Werte zwischen 51°C und 65°C. An dieser Stelle steht nun der DNA-Polymerase ein freies 3'-Ende zur Verfügung, welches als Ausgangspunkt für die Synthese eines zum Template komplementären Tochterstranges nicht definierter Länge dient. Diese Reaktion, die auch Elongation genannt wird, findet bei der für das Enzym optimalen Temperatur (72°C) und in Gegenwart der zur Synthese benötigten dNTP's (Desoxyribonukleosidtriphosphate) statt. Bei dem zweiten Reaktionszyklus (Denaturierung, Primeranlagerung und Synthese) wird die DNA wieder aufgeschmolzen. Es entstehen nun zwei Typen von Tochtersträngen: zum einen die beiden ursprünglichen einzelsträngigen DNA-Templates und zum anderen die neusynthetisierten Stränge, deren 5' Ende einer der beiden Primer darstellt. In diesem zweiten Zyklus dienen beide Typen als Template. Ab dem dritten Zyklus entstehen dann Fragmente, die die gewünschte Länge aufweisen und ab dem vierten Zyklus vermehrt sich die Zielsequenz exponentiell, weil jeder neu synthetisierte Strang als Matrize dient. Durch eine 20-40malige Wiederholung dieser Reaktion würde theoretisch nach 30 PCR-Zyklen eine 27millionenfache Amplifikation der Fragmente erwartet werden. Dieses Ergebnis wird allerdings nicht erreicht, weil limitierende Faktoren, wie abnehmende Enzymaktivität und steigende DNA-Konzentration zu ungünstigen Reaktionsbedingungen führen. Mittels einer PCR lassen sich auch spezifisch Mutationen in die DNA einfügen, da die Primer auch dann noch an das Template binden, wenn die Sequenz nicht vollkommen übereinstimmt. Verwendet werden so genannte „mutagene Primer“, die Mutationen in die Endbereiche der Amplifikate einbauen. Die eingesetzte Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase). Sie besitzt deshalb ein für Enzyme außergewöhnlich hohes

Temperaturoptimum von über 70°C und ist auch noch bei 95°C, wenn die DNA denaturiert, stabil und bleibt während allen Zyklen aktiv.

Bei der Auswahl der Primerpaare wurde berücksichtigt, dass die Primer möglichst ähnliche Schmelztemperaturen besaßen, keine Selbstkomplementarität aufwiesen und keine Sekundärstrukturen ausbilden konnten.

Zur Überprüfung auf eventuelle Kontaminationen wurde zusätzlich eine H₂O-Kontrolle, also ein kompletter Ansatz, aber ohne Matrizen-DNA, gemacht. Abschließend wurden 20 µl von jedem Ansatz in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Ein typischer PCR-Ansatz ist in Tabelle 2 aufgeführt und ein entsprechendes Programm in Tabelle 3.

Verwendete Reagenzien:

Taq (<i>Thermus aquaticus</i>)-Polymerase (Sigma):		5 U/µl
10× Polymerase-Reaktionspuffer (Sigma)	:	
	KCl	500 mM
	Tris-HCl, pH 8,3	100 mM
	Gelatine	1 mg/ml
	MgCl ₂ (Sigma)	25 mM
dNTPs (Boehringer Mannheim)	:	
	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je	10 mM

Tabelle 5: Pipettierschema eines 100 µl Standard-PCR-Ansatzes

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
MgCl ₂	2 µl	2 Mm
dNTP's	je 2 µl	je 200 µM
10×Reaktionspuffer	10 µl	1×
5'-Primer	1 µg	10 ng/µl
3'-Primer	1 µg	10 ng/µl
Matrizen DNA	0,1-1 µg	0,1-1 µg
Taq Polymerase	0,5 µl	2,5 U
H ₂ O _{bidest}	ad 100 µl	

Tabelle 6: Schema eines verwendeten PCR Standardprogramms

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	2 min.
Denaturierung	94°C	1 min.
Annealing	abhängig von Primern	1 min.
Extension	72°C	2 min.
		} x 30
Letzte Extension	72°C	10 min.

Die abschließende Extension dient dem Auffüllen von noch einzelsträngig vorhandener DNA. Im Anschluss an die PCR wurde die entstandene DNA im Agarosegel aufgetrennt. Eine entsprechende Bande ließ auf den Erfolg der Amplifikation schließen.

5.8. Real-Time-quantitative PCR

Die quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion wurde mit dem LightCycler™-Gerät (Roche, Mannheim) unter Verwendung des "LightCycler™ Faststart DNA Master Hybridization Probes" Kits (Roche, Mannheim) durchgeführt. Das Prinzip der PCR, nämlich eine Aufeinanderfolge von 3-phasischen Zyklen (Denaturierung, Annealing, Elongation), die die exponentielle Vervielfältigung einer definierten DNA-Sequenz bewirken, liegt auch dieser Methode zugrunde. Die Besonderheit besteht allerdings darin, dass dem Reaktionsansatz selektiv an das Reaktionsprodukt bindende Sonden zugefügt werden, die die Quantifizierung des Produkts und die simultane Beobachtung des Reaktionsablaufs ermöglichen. Die Sonden sind Oligonukleotide, die benachbart (max. 5 Nukleotide voneinander entfernt) am Amplifikat binden. Eines der Nukleotide trägt einen Donor Fluoreszenz-Farbstoff am 3'-Ende (Fluorescein) und das andere einen Akzeptor-Farbstoff am 5'-Ende (LC Red 640) und eine Phosphorylierung am 3'-Ende. Wenn beide Sonden an ein DNA-Molekül binden, wird Fluoreszenzlicht einer bestimmten Wellenlänge emittiert und durch den LightCycler detektiert. Damit ist neben der Quantifizierung auch die Spezifität des Produktes gesichert. Die PCR-Reaktion findet in Glaskapillaren statt, die über Luft erwärmt werden, was eine beträchtliche Verkürzung der einzelnen PCR-Zyklen im Vergleich zur konventionellen PCR gestattet.

Die DNA wurde mittels eines QiAmp DNA Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aus dem Virusüberstand isoliert. 8 µl von dieser DNA wurden anschließend in der PCR-Reaktion eingesetzt. Die verwendeten Primer und Sonden zum Nachweis der EBV-spezifischen p23-Sequenz (VCA-Gen) sind in Tabelle 7 dargestellt (Ibrahim et al., 2005).

Die Glaskapillare hat ein Endvolumen von 20 µl, wobei zuerst 18 µl PCR-Mix ohne DNA, bestehend aus: 1 µl des Vorwärtsprimers (10 µM), 1 µl des Rückwärtsprimers (10 µM), jeweils 1 µl der Sonden (1,5 µM), 2 µl des Enzym-Mix und 12 µl einer MgCl₂-Lösung in die Kapillare pipettiert wurden, und danach 2 µl der viralen DNA oder Wasser zugegeben wurde. Nach Verschließen der Kapillaren wurden diese kurz zentrifugiert und zügig in den LightCycler überführt. Jeder PCR-Lauf bestand aus vier Teilprogrammen: Denaturierung (75 s bei 95°C), Amplifikation (1 s bei 95°C, 10 s bei 60°C, 18 s bei 72 °C; 45 Zyklen), abschließende Extension (10 s bei 55°C) und Kühlung (30 s bei 40°C). Die Kopien/ml DNA wurden über eine Standardkurve, die mit einem p23-Plasmid erstellt wurde, ermittelt.

Tabelle 7: EBV-spezifische Primer für die Real-Time-quantitative PCR

Vorwärtsprimer (p23-LO)	5'-TGGCGTTGGGGTCGTTTGAT-3'
Rückwärtsprimer (p23-up)	5'-CGCCTGGCTCGCCTGGAGT-3'
Fluorescein Sonde (EBFL)	5'-GCGGAGGCACTGGAGCAGAAGGAACA-X-3'
LC Red 640 Sonde (EBLC)	5'-AGGTAGACGAGGCACAGGCACCCCCT-P-3'

5.9. Der Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Bei diesem Assay handelt es sich um eine sensitive und leicht zu handhabende Methode, die zur Untersuchung von Promotor- und Induktionsstudien dient, aber auch anderweitig einsetzbar ist. Die Luciferase ist ein Protein des Glühwürmchens (Lampyridae) mit einer Größe von 61 kDa („Firefly“-Luciferase). Dieses Protein benötigt keine posttranslationale Modifikation zum Erreichen der enzymatischen Aktivität. Die Luciferase katalysiert in einer ATP-abhängigen Reaktion die Oxidation des Substrates Luciferin unter Abgabe von Licht. Dabei ist die Lichtproduktion proportional zur Luciferasemenge, was eine quantitative Auswertung des Luciferase-

Reportergen-Assays möglich macht. Die Lichtemission (Lumineszenz) wird in einem Luminometer (Berthold) gemessen.

Die Zellen wurden typischerweise in 24-Loch Platten ausgesät und am folgenden Tag (siehe 5.2.3) mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert, zum einen die pGL3-Promotor Konstrukte mit den inklonierten 3'-UTRs und die miRNA's im Vektor pSG5. Zur späteren Kontrolle der Transfektionseffizienz im FACS wurde der pEGFP-Vektor, der das grün-fluoreszierende Protein EGFP exprimiert, kotransfiziert. In einem typischen Ansatz wurden jeweils 0,8 µg DNA des Effektoronstruktes (pSG5-miRNA), 0,2 µg DNA des Reporteronstruktes (pGL3-Prom-3'-UTR) und 0,2 µg DNA des pEGFP-C1 Vektors eingesetzt. Somit ergibt sich eine DNA Gesamtmenge von 1,2 µg pro Transfektionsansatz, die unter Umständen durch Heringssperma DNA ausgeglichen wurde. Pro Ansatz wurde eine Mock-Kontrolle mitgeführt, in der die Zellen nur mit 1,2 µg Heringssperma-DNA transfiziert wurden für die Bestimmung der lebenden Zellpopulation im FACS (siehe 5.2.6).

Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit Trypsin abgespült und zweimal mit PBS-Puffer (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) gewaschen. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden 100 µl für die FACS-Analyse abgenommen. Die restlichen Zellen wurden nach kurzem Antrocknen bei RT in 100 µl 1xCCLR-Puffer (Promega) lysiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert und der Überstand für die Messung der Luciferase-Aktivität verwendet. Dabei wurden 20 µl des Extraktes mit 20 µl Luciferin aus dem Luciferase Assay System von Promega gemischt und die Lichtemission im Lumat LB9501-Luminometer (Berthold) gemessen. Die Experimente wurden in der Regel drei Mal mit jeweils doppeltem Ansatz durchgeführt und durch die Verrechnung mit den Daten der FACS-Analyse bezüglich der Transfektionsrate der einzelnen Ansätze standardisiert. Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der Experimente wurde die Computersoftware Sigma Plot 10.0™ (SPSS) verwendet. Als statistisches Hilfsmittel zum Überprüfen der Signifikanz der Abweichungen wurde der in der Software integrierte t-Test benutzt und p-Werte <0,05 als statistisch signifikant angesehen.

5.10. Proteintechniken

5.10.1. Herstellung von 2x Sample-Buffer-Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen

(Maniatis, 1989)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gesamtzellextrakte aus Monolayerkulturen und Suspensionskulturen hergestellt. Von einer dicht gewachsenen 75 cm² Kulturflasche wurden die Monolayerzellen geerntet, indem sie mittels eines Zellschabers abgelöst und mit PBS abgespült wurden. Bei den Zellen, die in Suspension wachsen entfällt dieser Schritt. Die Zellen wurden 10 min bei 1200 rpm und 4°C abzentrifugiert (Megafuge 1.0 RF, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit sterilem, kaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in einer definierten Menge 2× SDS-Probenpuffer (siehe unter 2.2) resuspendiert. Der SDS-Probenpuffer enthält 3-Mercapto-1,2-Propandiol, das Disulfidbrücken spaltet und somit die Tertiärstruktur der Proteine zerstört. Durch die fehlende Tertiärstruktur ist die Wanderungstrecke der Proteine im Gel proportional zu ihrer Größe und die saubere Auftrennung der Proteine wird verbessert. Außerdem werden Protein-Protein-Interaktionen wegen der fehlenden nativen Struktur nicht mehr eingegangen. Der Zellaufschluss erfolgte durch eine Ultraschall-Behandlung von 20 sec. Nun wurden die Proben für 10 min bei 95°C gekocht und anschließend 10 min bei 13000 rpm (Sigma Kryofuge 202MK) abzentrifugiert, um nicht gelöste Zellbestandteile zu sedimentieren. Der proteinhaltige Überstand wurde bei -20°C gelagert. Bei Verwendung von 2× SDS-Proben-Puffer ohne Bromphenolblau konnte der Proteingehalt der Extrakte photometrisch bestimmt werden. Dazu wurde eine 1:50 Verdünnung in 0,1 M NaOH-Lösung hergestellt. Die gemessene Extinktion dieser Lösung bei 280 nm wurde in folgende Formel eingesetzt zum Errechnen der Proteinmenge, die in der Gelelektrophorese eingesetzt werden soll.

$$\frac{6,4}{E_{280}} = 15 \mu\text{g Protein}$$

E_{280} = Extinktion des Proteinextraktes bei 280 nm

Das Ergebnis der angegebenen Formel entspricht der Menge 2x Sample-Buffer-Extrakt (in μl), die man benötigt, um 15 μg Protein zu erhalten.

5.10.2. Herstellung nativer Proteinextrakte aus eukaryotischen Zellen

Bei diesen Proteinextrakten bleibt die Struktur der Proteine erhalten, da kein 3-Mercapto-1,2-Propandiol im Puffer vorhanden ist. Das resultierende Proteingemisch kann beispielsweise in der Immunpräzipitation eingesetzt werden. Zur Herstellung der Extrakte wurden die Zellen nach dem oben beschriebenen Ablauf behandelt (vgl. 5.10.1), dann aber zur Zellyse in Puffer K aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert und die Zelltrümmer durch einen Zentrifugationsschritt pelletiert (30 min, 13.000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Puffer K:	Tris/HCl	100 mM, pH 9,0
	NaCl	100 mM
	KCl	5 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
	CaCl ₂	1 mM
	NP-40	0,5% (v/v)
	PMSF	0,5 mM
	Aprotinin	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	Pepstatin A	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	Leupeptin	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5.10.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970 ; Maniatis, 1989)

In einer SDS-PAGE werden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. In dieser Arbeit wurde ausschließlich unter denaturierten Bedingungen gearbeitet und die Auftrennung der Proteine nur nach deren Molekulargewicht durchgeführt. Das negativ geladene SDS, das sich im Puffer und in der Gelmatrix im Überschuss

befindet, lagert sich an die hydrophoben Regionen der Proteine an. An der Aminosäurenkette lagert sich pro zwei Aminosäurenreste je ein SDS-Molekül an. Dadurch werden die positiven Ladungen der Proteine kompensiert und sie erhalten eine stark negative Ladung. Diese überlagert die Eigenladung des Proteins und ist zu dessen Masse ungefähr proportional. Mit dieser Vorgehensweise wird eine Wanderung der Proteine ausschließlich zur Anode und eine vollständige Denaturierung erreicht. Das SDS löst fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen und die Tertiärstruktur geht verloren. Die Matrix des Gels besteht aus Ketten polymerisierten Acrylamids, die durch N,N'-Methyl-Bisacrylamid quervernetzt sind. Gestartet wird die Polymerisation durch Ammoniumpersulfat (APS) und katalysiert durch N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Die Porengröße und somit die Auftrennungseigenschaften der chemisch inerten Polyacrylamid-Gelmatrix hängen direkt von den Mengenverhältnissen der eingesetzten Acrylamid- und Bisacrylamidkonzentration ab. Die Proteine wandern also in einem Gel geeigneter Porengröße entsprechend ihrer Molmasse, wobei die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine eine lineare Funktion des Logarithmus ihres Molekulargewichts darstellt. Um eine hohe Auflösung bei der Trennung zu erreichen, wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wird das zu analysierende Proteingemisch in einem Gel aufgetrennt, das aus zwei Gelsystemen mit unterschiedlicher Porengröße und unterschiedlichen pH-Werten besteht. Die Proteine laufen zuerst durch ein grobporiges Sammelgel („Uppergel“), in dem sie konzentriert werden und eine einheitliche Lauffront erreicht wird. Dann wandern sie in ein feinporiges Trenngel („Bottomgel“), in dem die Auftrennung erfolgt. Parallel zu den zu untersuchenden Proteinen wurden Markerproteine, deren Molekulargewicht bekannt ist, aufgetrennt um das relative Molekulargewicht der Proteine zu ermitteln.

5.10.3.1. Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels

Es wurden zwei Glasplatten (14,5 x 16,5 cm) verwendet, von denen eine an einer Seite eine Aussparung aufweist. Die Platten wurden vor der Verwendung mit Ethanol (70% [v/v]) gereinigt. An den drei Seiten ohne Aussparung wurde je einen Teflon-Abstandhalter eingelegt und die Platten dann mit Klammern aufeinander befestigt. Um zu verhindern, dass das SDS-Gel aus der Gießkammer ausläuft, wurden die

Ränder mit Agarose (1%) abgedichtet. Dann wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen (bis 3 cm unter den Rand) und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Um später die Proteinproben aufzutragen wurden Geltaschen mit einem Teflonkamm ausgespart. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden der Kamm sowie der Abstandhalter an der Unterseite des Trenngels entfernt. Danach wurde das Gel senkrecht in eine Elektrophoresekammer eingespannt. Diese besteht eigentlich aus zwei Kammern, die beide mit Laufpuffer gefüllt wurden. Das Gel bildet eine „Brücke“ für den Strom, der fließt, wenn Spannung an die Kammern angelegt wird. Die Proteinproben wurden mit Hilfe einer Hamilton-Mikropipette in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Sammelgel bei 24 mA und später im Trenngel bei 28 mA für 2,5 bis 3 h.

Tabelle 8: Komponenten für 10%iges und 12,5%iges Polyacrylamidgel

Komponente	Trenngel		Sammelgel
	10%	12,5%	
Sammelgelstock	-	-	1,25 ml
Trenngelstock	4,0 ml	4,0 ml	-
Acrylamid (30%)	5,3 ml	6,7 ml	750 μl
Bisacrylamid (2%)	2,12 ml	2,68ml	300 μl
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	4,58 ml	2,62 ml	2,7 ml
APS (10%)	140 μl	140 μl	50 μl
TEMED	14 μl	14 μl	10 μl

5.10.4. Western Blot (Immunoblot)

Beim Western Blot werden die zuvor in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen, wobei das nach der

Auftrennung entstandene Proteinmuster immobilisiert auf der Membran erhalten bleibt. Die Proteine binden bei niedriger Ionenstärke über hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran. Da sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine weitgehend erhalten bleibt, können diese durch den Einsatz spezifischer Antikörper immunologisch nachgewiesen werden (Immunoblot).

5.10.4.1. Proteintransfer

Vor dem Aufbau des Blots wurde die verwendete Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schuell) in PBS äquilibriert. Anschließend wurde der Blot in einer mit Transferpuffer gefüllten Wanne aufgebaut. Dazu wurde eine Vorrichtung verwendet, die aus zwei PVC-Gittern besteht, die zusammengesteckt werden können. Auf das erste Gitter wurde ein Wattetuch gelegt und darauf zwei Whatman-Papiere. Danach folgte das Polyacrylamidgel, das mit der Nitrocellulose-Membran bedeckt wurde. Zum Schluss folgten wieder zwei Whatman-Papiere und ein Wattetuch. Durch das zweite Gitter wurde der Blot luftblasenfrei abgeschlossen. Schließlich wurde er, in richtiger Orientierung zur Anode hin, in eine mit Transferpuffer gefüllte Kammer (LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit) eingespannt. Der Transfer wurde 1,5 h bei 330 mA durchgeführt oder alternativ über Nacht bei 35 mA. Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran zur unspezifischen Färbung aller Proteine ca. 10 min mit PonceauS™ (Sigma-Aldrich) gefärbt. Dieses verursacht eine reversible Färbung der Proteine auf der Membran, die mit Wasser wieder abgewaschen werden kann. Die Markerspur wurde mit einem Skalpell abgetrennt, 15 min in Amidoschwarz-Lösung angefärbt und anschließend entfärbt. Die restliche Membran wurde für 30 min bei Raumtemperatur in 5%iger PBS-Milch inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen („Blocken“).

5.10.4.2. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Der immunologische Nachweis wird mit Antikörpern gegen die zu untersuchenden Proteine durchgeführt. Die Detektion der gebundenen Antikörper kann radioaktiv erfolgen oder durch Chemilumineszenz. In dieser Diplomarbeit wurde ausschließlich

die chemilumineszente Detektion benutzt. Nach dem Blocken wurde die Nitrocellulosemembran mit dem entsprechenden Antikörper in 2-5 ml PBS-Milch (5%) luftblasenfrei in Klarsichthüllen eingeschweißt und auf einem Taumler über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 × 15 min in PBS-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran mit einem entsprechenden Sekundärantikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist in 2-5 ml PBS-Milch (5%) luftblasenfrei in Klarsichthüllen eingeschweißt und auf einem Schüttler 1 h bei 4°C inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten von 15 min in PBS-Puffer erfolgte die Detektion gebundener Sekundärantikörper mit Hilfe des ECL™-Kits (Enhanced Chemoluminescence, Amersham). Bei der Detektion erfolgt eine durch Peroxidase-katalysierte Reduktion von H₂O₂ und gleichzeitig eine Oxidation von Luminol, was eine Licht-Emission der Wellenlänge $\lambda=428$ nm zur Folge hat, die durch einen blaulichtempfindlichen ECL™-Film (Hyperfilm ECL™, Amersham) dokumentiert werden kann. Dazu wurde die Membran in einer Kunststoffschale mit den kurz vorher 1:1 gemischten ECL™-Lösungen 1 und 2 (je 3 ml) für eine Minute inkubiert, mit Whatman-Papier getrocknet und der ECL™-Film für die entsprechende Expositionszeit aufgelegt. Der Film wurde anschließend entwickelt, fixiert und zum Trocknen aufgehängt.

5.10.4.3. Entfernung gebundener Antikörper nach ECL™-Färbung („Stripping“)

Nach manchen Versuchen erschien es sinnvoll dieselbe Membran mit einen anderen Antikörper noch mal zu färben, sei es aus Vergleichszwecken oder auch nur, weil der Antikörper nicht gut genug gebunden oder zu unspezifisch war. Dazu wurde die Membran nach erfolgter ECL™-Färbung 30 min in ca. 100 ml „Stripping“-Puffer bei 55°C im Wasserbad geschüttelt („gestrippt“). Durch das enthaltene SDS und 3-Mercapto-1,2-propandiol werden die kovalenten Protein-Antikörper-Bindungen gelöst. Anschließend wurde die Membran 2×15 und 4×5 min in PBS auf dem Schüttler gewaschen, in 5%iger PBS-Milch geblockt und wie unter 3.7.3.2 beschrieben weiterbehandelt.

Stripping-Puffer (nach ECL™-Färbung): Tris (pH 6,7)	62,5 mM
SDS	2%
3-Mercapto-1,2-Propandiol (frisch zugegeben)	100 mM

5.10.4.4. Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation können Proteine mittels Antikörpern spezifisch aus einem Proteingemisch herauspräzipitiert und später im Western Blot nachgewiesen werden. Das Proteingemisch ist üblicherweise ein nativer Gesamtzellextrakt. Dazu wurden 10^7 Raji-Zellen in 500 μ l nativem Lyse-Puffer K (vgl. 5.10.2) lysiert und die Extrakte 1 h bei 4°C mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Simultan erfolgte zur Absättigung unspezifischer Bindungen die Inkubation von 30 μ l Protein-G-Sepharose mit 2% (v/v) BSA in 500 μ l PBs 1 h bei 4°C auf dem Drehrad. Nach einer Zentrifugation (1 min, 1500 rpm, 4°C) wurde dem Sepharose-Pellet die Protein-Antikörper Suspension zugegeben und 1 – 2 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Gebundene Immunkomplexe wurden 8x (4x mit 1 M NaCl, 4x ohne NaCl) in RIPA-Puffer (10 mM Tris/HCl [pH 7,5], 0,5% [v/v] Na-Desoxycholat, 0,5% [v/v] NP40, 0,1% SDS, 0,1 mM EDTA, 5 mM DTT, 5 μ g/ml Aprotinin, 0,5 mM PMSF, 10 μ g/ml Pepstatin A, 5 μ g/ml Leupeptin) gewaschen, durch 5 min Kochen in 80 μ l SDS-Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE analysiert.

5.11. Indirekte Immunfluoreszenz

Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird im ersten Schritt ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf die zu untersuchenden Zellen aufgebracht. Im zweiten Schritt wird der Sekundärantikörper aufgetragen, der sich gegen den ersten Antikörper richtet und an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Mit dem Ergebnis lässt sich die Lokalisation von Proteinen in Zellen darstellen.

Zur Untersuchung in der Immunfluoreszenz wurden auf Deckgläschen gewachsene 293T-Zellen in 6-Loch Platten mit 8 μ g DNA der jeweiligen Plasmide nach der Nanofectin™-Methode (siehe 5.2.3) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen einmal

mit PBS-Puffer (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) gewaschen und 15 min mit 4% Paraformaldehyd/PBS bei RT fixiert. Nach anschließender Permeabilisierung in 0,2% Triton-X-100/PBS (2 min bei 4°C) wurden unspezifische Bindungsstellen mit 2% BSA/PBS für 15 min bei 37°C in einer feuchten Kammer geblockt. Die Primärantikörper wurden in 3 µg/ml BSA/PBS verdünnt (Verdünnungen: anti BALF5 [4C12], 1:10; anti BZLF1 [BZ-1], 1:100) und die Zellen darin für 45 min bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach vier Waschschritten (je 10 min bei RT auf dem Schüttler: 3x in PBS, 1x in 0,03% Triton-X-100/PBS) wurden die Zellen 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer mit den in 3µg/ml BSA/PBS verdünnten anti-Ratte- oder anti-Maus-Sekundärantikörpern inkubiert (TRITC-konjugiert, [1:50]) und nochmals wie oben beschrieben gewaschen. Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Zellen 5 min in 0,2 µg/ml DAPI/Methanol inkubiert, anschließend einmal in Methanol gewaschen und in Elvanol-Lösung (3% [w/v] Elvanol-Polyvinylalkohol, 30% [v/v] Glycerol in PBS) auf Objektträger gebracht, versiegelt und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Die Immunfluoreszenzen wurden in 60facher Vergrößerung mit Hilfe eines Leica DM IRB/E Fluoreszenzmikroskops angeschaut und mit der Kamera Axio-Cam Color (Zeiss) dokumentiert.

6. Ergebnisse

Das humane Epstein-Barr Virus (EBV) induziert die infektiöse Mononukleose und ist an der Entstehung verschiedener Tumorerkrankungen ursächlich beteiligt. Es persistiert nach Infektion lebenslang in ruhenden B-Zellen unter Etablierung einer Latenz. In den letzten Jahren wurden in mehreren Studien insgesamt 23 micro RNA's, die von EBV kodiert werden identifiziert und durch computergestützte Methoden entsprechende potenzielle Zielgene sowohl viraler, als auch humaner Herkunft vorhergesagt. Die EBV kodierte miR-BART2 wird in antisense Orientierung zur 3'-UTR der viralen DNA-Polymerase BALF5 transkribiert und besitzt somit eine 100%ige Sequenzkomplementarität zu dieser. BALF5 wirkt bei der lytischen Replikation als DNA-Polymerase und wird ausschließlich im lytischen Zyklus exprimiert. Davon ausgehend lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die miR-BART2 eine Spaltung der mRNA von BALF5 vermitteln kann und somit als Regulator der BALF5-Proteinexpression wirkt, was möglicherweise zur Aufrechterhaltung der Latenz von EBV beiträgt. In Luciferase-Reportergeräten Experimenten sollte untersucht werden, ob die miRNA-BART2 in der Lage ist an die BALF5-3'-UTR spezifisch zu binden und eine translationale Inhibition zu vermitteln, die durch eine reduzierte Luciferase-Aktivität messbar wäre. Zum Nachweis des Proteins sollte ein BALF5-spezifischer monoklonaler Antikörper hergestellt und etabliert werden, mit dem dann untersucht werden könnte, ob die miR-BART2 gezielt die Proteinmenge von BALF5 reduziert. Mit Hilfe von „Locked Nucleic Acids“ (LNA's) sollte die miR-BART2 inhibiert und somit versucht werden, die Spaltung der BALF5-mRNA zu verhindern, was zu einer gesteigerten Proteinexpression führen würde. Da BALF5 nur im lytischen Zyklus exprimiert wird, wäre es denkbar, dass die miR-BART2 in diesem Fall nicht mehr benötigt wird und in ihrer Menge abnimmt. Aus diesem Grund sollte in weiteren Northern Blots die Expression der miR-BART2 in latenten Zellen und in Zellen, die sich im lytischen Zyklus befinden, verglichen werden. Das BALF5-Protein fungiert als DNA Polymerase von EBV und es könnte sein, dass sich eine verminderte oder unterdrückte Expression auf die Virusneuproduktion auswirkt. Deshalb sollte in Real-Time-PCR Experimenten nachgewiesen werden, ob eine Überexpression der miR-BART2 im lytischen Zyklus zur Abnahme der Virusproduktion führt.

6.1. Expression der miRNA-Konstrukte pSG5-miR-BART2 und pSG5-miR-155

Die Expression der hergestellten miRNA Konstrukte wurde im Northern Blot getestet. HeLa-Zellen wurden transient mit den miRNA Konstrukten pSG5-miR-BART2 und pSG5-miR-155 transfiziert. Nach 48 h wurde Gesamt-RNA aus den Zellen mit dem Trifast™-Verfahren (PeqLab) isoliert. Parallel dazu wurde nach dem gleichen Verfahren Gesamt RNA aus EBV-negativen BL41- und EBV-positiven BL41-B95.8-Zellen isoliert, die als negative bzw. positive Kontrolle diente. Die RNA wurde elektrophoretisch über ein 12%iges Polyacrylamidgel (Sequagel™, Biozym/National Diagnostics) aufgetrennt und anschließend auf eine Hybond-XL™-Membran (Amersham) im „Semi Dry“-Verfahren geblottet. Die Membran wurde über Nacht mit einer 5'-³²P-endmarkierten Sonde (vgl. 5.6.2.3) gegen miR-BART2 hybridisiert und am nächsten Tag gewaschen. Auf einem X-Omat™ Röntgenfilm (Kodak) wurde die hybridisierte Sonde und somit die miRNA sichtbar gemacht.

In Abbildung 13 ist das Ergebnis gezeigt. Untransfizierte HeLa-Zellen, sowie EBV-negative BL41-Zellen weisen keine Expression der virusspezifischen miR-BART2 auf (Spur 1 und 2). Bei den EBV-positiven B95.8-Zellen ist eine leichte Expression zu sehen (Spur 3) und die transfizierten HeLa-Zellen zeigen eine stärkere ektoische Expression (Spur 4). Hier ist im Gegensatz zu den B-Zellen auch die Vorläufer-RNA (pre-miRNA) detektierbar.

Das Ergebnis zeigt, dass die miR-BART2 ektoisch exprimierbar ist und insbesondere auch, dass die Prozessierung zur reifen miRNA über den Precursor in den Zellen stattfindet.

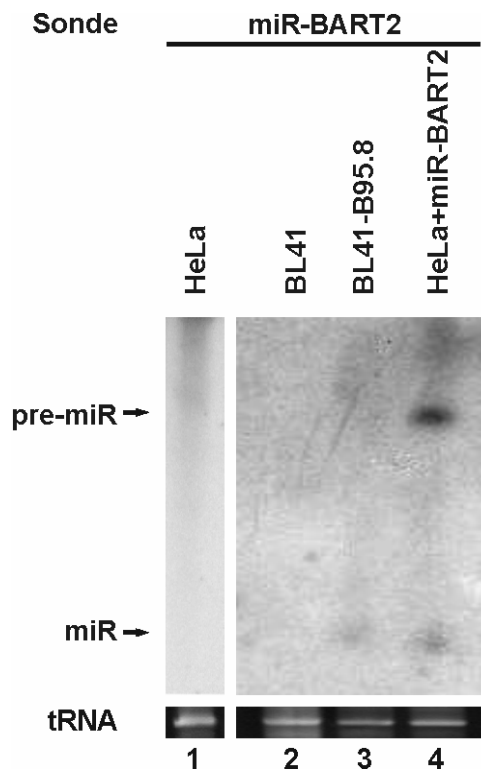


Abbildung 13: Northern Blot zum Nachweis der ektopischen Expression der miR-BART2

HeLa-Zellen wurden mit dem Plasmid pSG5-miR-BART2 transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde Gesamt-RNA isoliert und zusammen mit Gesamt-RNA aus untransfizierten HeLa-, BL41- und BL41-B95.8-Zellen im Northern Blot analysiert. In den transfizierten HeLa-Zellen wird sowohl die Vorläufer RNA (oben) als auch die reife miRNA-BART2 exprimiert (Spur 4). Eine Expression ist ebenfalls in den EBV-positiven BL41-B95.8-Zellen (Spur 3) sichtbar, aber nicht in den EBV-negativen BL41-Zellen (Spur 2) und in den untransfizierten HeLa-Zellen (Spur 1). Im unteren Teil ist ein Gelausschnitt mit der Ethidiumbromid-gefärbten tRNA als Ladekontrolle gezeigt.

Die Expression der miR-155 wurde ebenfalls im Northern Blot nach der oben beschriebenen Methode nachgewiesen. In diesem Fall wurde allerdings die Sonde nach dem miRvana™-Verfahren (Ambion) markiert (vgl. 5.6.2.4). Bei dieser Methode wird eine RNA-Sonde mit radioaktiv markierten UTP-Molekülen hergestellt. Dies bietet einige Vorteile gegenüber einer endmarkierten DNA-Sonde. Zum einen wird durch den Einbau mehrerer UTP-Moleküle eine höhere spezifische Aktivität der Sonde erreicht und zum anderen ist die Hybridisierung von RNA an RNA wesentlich stabiler, was die Methode sensitiver macht.

Der Northern Blot in Abbildung 14 zeigt in Spur 1 HeLa-Zellen, in denen die miR-155 nicht exprimiert wird. In Spur 2 ist die RNA aus HeLa-Zellen aufgetragen, die mit pSG5-miR-155 transfiziert wurden. Deutlich zu erkennen ist die Expression der reifen

miRNA und auch des Vorläufermoleküls. Somit lässt sich auch hier feststellen, dass die Prozessierung des artifiziellen miRNA-Konstruktes in den Zellen korrekt abläuft.

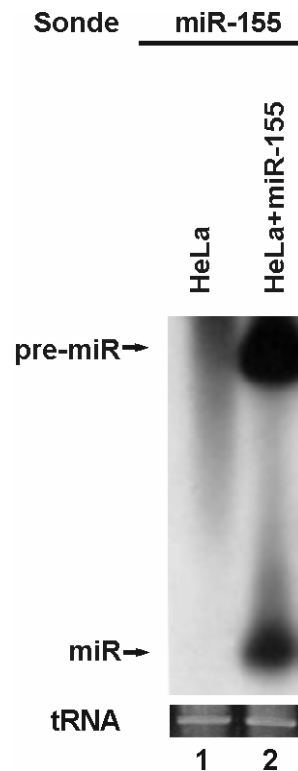


Abbildung 14: Northern Blot zum Nachweis der ektopischen Expression der miR-155

HeLa Zellen wurden mit dem Plasmid pSG5-miR-155 transfiziert und nach 48 h die Gesamt-RNA isoliert. Als Kontrolle wurde im Northern Blot untransfizierte HeLa-Gesamt-RNA verwendet. Die miR-155 wird ektopisch in HeLa Zellen exprimiert (Spur 2), während untransfizierte Zellen keine Expression aufweisen (Spur 1). Der untere Gelausschnitt zeigt die tRNA als Ladekontrolle.

Es wurde für die miR-155 immer eine relativ starke Expression beobachtet. Im Gegensatz dazu führte die ektopische Expression der miR-BART2 immer zu niedrigeren Mengen an RNA in den transfizierten Zellen.

6.2. Luciferase-Reportergen-Experimente

Die 3'UTR der mRNA der EBV Polymerase BALF5 gilt als potenzielles Ziel der miR-BART2 (Pfeffer et al., 2004). Somit sollte eine Bindung der miRNA an ihre

Zielsequenz zu einer translationalen Repression bzw., wegen der vollständigen Sequenzkomplementarität, zu einer Degradation der mRNA führen. Um dieses nachzuweisen wurden Luciferase-Reporter-Experimente durchgeführt.

Die Experimente wurden in 293T-Zellen durchgeführt. Die zuvor hergestellten Plasmide wurden in die Zellen transfiziert und die Aktivität der Luciferase nach 48 h gemessen. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz im Durchflusszytometer wurde der Vektor pEGFP-C1 kotransfiziert.

6.2.1. Einfluss der miR-BART2 auf die BALF5-3'-UTR

In dem klonierten Reporter-Konstrukt pGL3-BALF5-3'-UTR befindet sich die 3'-UTR von BALF5 direkt hinter dem offenen Leserahmen des Luciferase-Gens. Bei Kotransfektion von pSG5-BART2 sollte also die miRNA-BART2 exprimiert werden, an die vorhergesagte Zielsequenz in der 3'-UTR von BALF5 binden und die Translation der Luciferase verhindern bzw. verringern. Messbar wird dies durch die Aktivität der Luciferase.

In Abbildung 15 ist die Interaktion der miR-BART2 an die potenzielle Zielsequenz in der BALF5 3'UTR schematisch gezeigt.

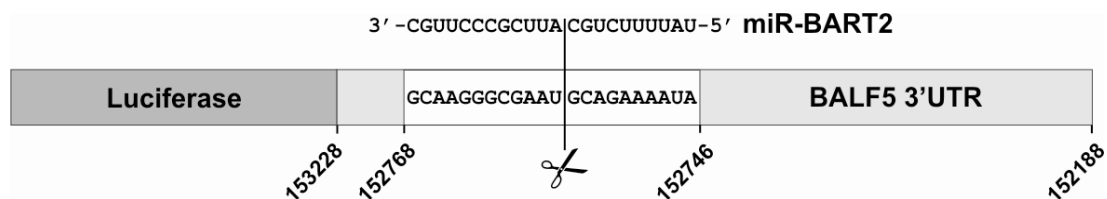


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Interaktion von miRNA und 3'-UTR

Dargestellt ist das hergestellte Luciferase-Konstrukt, welches die BALF5 3'UTR mit der vorhergesagten Zielsequenz enthält. Die senkrechte Linie markiert die Stelle, an der die mRNA potenziell gespalten werden sollte. Die Zahlenangaben entsprechen der Lokalisation im Genom von EBV (AJ507799).

In dem Balkendiagramm in Abbildung 16 ist das Ergebnis des Luciferase Experimentes zum Nachweis des Einflusses von miR-BART2 auf die BALF5 3'UTR gezeigt. Es sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen, die

im doppelten Ansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Transfektion der Zellen mit der miR-BART2 alleine führte zu keiner messbaren Luciferase-Aktivität. Die gemessene Aktivität bei dem BALF5 3'UTR-Luciferase-Konstrukt wurde auf 100% normiert. Eine Kotransfektion dieses Konstruktes mit der miRNA führt zu einer Abnahme der Luciferase-Aktivität auf etwa 60%. Die miR-BART2 ist also tatsächlich in der Lage in diesem Experiment die Aktivität der Luciferase signifikant um etwa 40% zu reduzieren ($p=0,00000066$). Daraus lässt sich schließen, dass eine translationale Inhibition bzw. Spaltung durch Bindung dieser miRNA an die BALF5 3'UTR stattfindet.

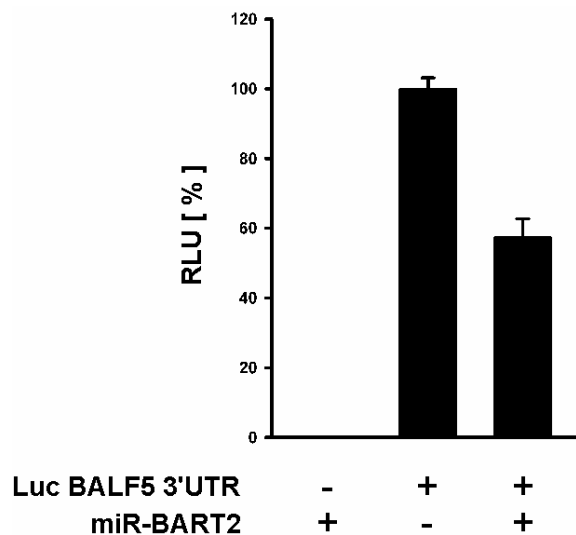


Abbildung 16: Einfluss der miR-BART2 auf die BALF5-3'-UTR

Das Reporterplasmid pGL3-BALF5-3'UTR, das für die Luciferase kodiert und das Effektorplasmid pSG5-miR-BART2 zur Expression der miR-BART2 wurden in 293T-Zellen in den angegebenen Kombinationen transfiziert. Nach 48 h wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt, mittels FACS-Analyse standardisiert und für das Reporter gen alleine auf 100% gesetzt. Koexpression der miR-BART2 führte zu einer Abnahme der Luciferase-Aktivität um ca. 40%. Die miR-BART2 alleine besitzt keine Aktivität. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von sechs unabhängigen Experimenten mit doppelten Ansätzen unter Angabe des mittleren Fehlers des Mittelwertes (SEM, Standard Error of the Mean). RLU=Relative Luciferase Aktivität (Relative Light Units).

6.2.2. Einfluss der miR-BART2 auf die mutierte BALF5-3'-UTR

Es stellte sich nun die Frage, ob der reduzierende Effekt, der in Abbildung 16 zu sehen ist wirklich dadurch zustande kommt, dass die miR-BART2 spezifisch an die

potenzielle Zielsequenz bindet oder ob es sich um einen unspezifischen Effekt handelt. Mit der hergestellten Deletionsmutante pGL3-BALF5-3'-UTR-mut, bei der die komplette potenzielle Zielsequenz in der BALF5 3'UTR fehlt (Abbildung 17), sollte dies gezeigt werden.

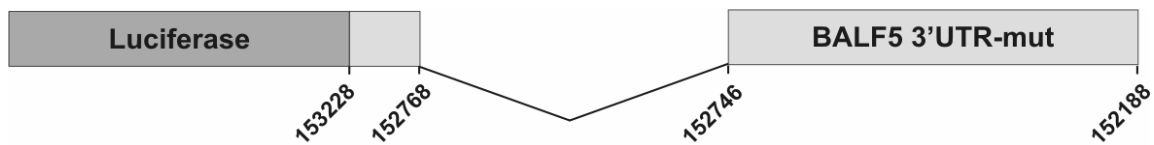


Abbildung 17: Schematische Darstellung des pGL3-BALF5-3'-UTR-mut

Bei dem Konstrukt pGL3-BALF5-3'-UTR-mut wurde die komplette potenzielle Zielsequenz der miR-BART2 in der BALF5-3'UTR deletiert (Position 152746-152768, AJ507799).

Das Balkendiagramm in Abbildung 18 zeigt den Einfluss der miR-BART2 auf die BALF5 3'UTR, in der die Zielsequenz deletiert wurde. Es wurden 4 unabhängige Experimente durchgeführt und die Mittelwerte für die graphische Darstellung verwendet. Auch hier zeigt die Transfektion der miRNA alleine in den Zellen keine Aktivität. Die gemessene Aktivität bei Transfektion des BALF5-3'-UTR-mut-Konstruktes wurde auf 100% gesetzt. Eine Kotransfektion der mutierten BALF5-3'-UTR und der miR-BART2 ließ die Luciferase-Aktivität um etwa 20% ansteigen, was allerdings statistisch nicht signifikant ist ($p=0,257$). Daraus lässt sich folgern, dass die miR-BART2 tatsächlich an die vorhergesagte Zielsequenz bindet und bei einer Deletion dieser Sequenz der in 6.2.1 beobachtete reprimierende Effekt aufgehoben wird.

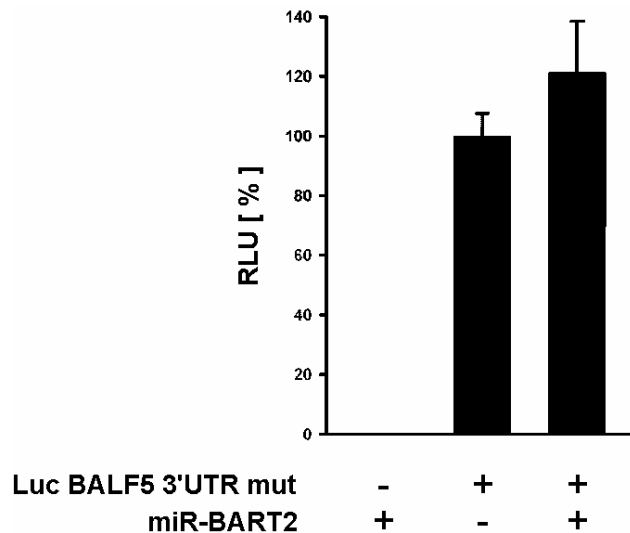


Abbildung 18: Einfluss der miR-BART2 auf die mutierte BALF5-3'-UTR

Die Deletionsmutante pGL3-BALF5-3'UTR-mut und pSG5-miR-BART2 wurden in 293T-Zellen in den angegebenen Kombinationen transfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h später gemessen, mit FACS-Analyse standardisiert, und für das Reporter-gen alleine auf 100% gesetzt. Koexpression der miR-BART2 führte zu einer insignifikanten Steigerung der Luciferase-Aktivität um ca. 20% ($p=0.257$). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten mit doppelten Ansätzen unter Angabe des mittleren Fehlers des Mittelwertes. RLU=Relative Luciferase Aktivität (Relative Light Units).

6.2.3. Einfluss der miR-BART2 auf die 3'UTR des latenten EBV-Membranproteins LMP2A

In diesem Experiment sollte gezeigt werden, dass die Interaktion der miR-BART2 mit ihrer Zielsequenz spezifisch ist. Dazu wurde ein Luciferase-Konstrukt, das die 3'UTR des EBV-kodierten LMP2A-Gens hinter der Luciferase trägt, in Kombination mit pSG5-miR-BART2 in 293T Zellen transfiziert und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, hat die miRNA keinen reduzierenden Einfluss auf die Luciferase-Aktivität. Es ist ein leichter Anstieg zu beobachten, der jedoch statistisch nicht als signifikant zu betrachten ist ($p=0,29$). Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die Bindung der miR-BART2 an die BALF5-3'UTR und die damit verbundene Inhibition der Translation spezifisch ist.

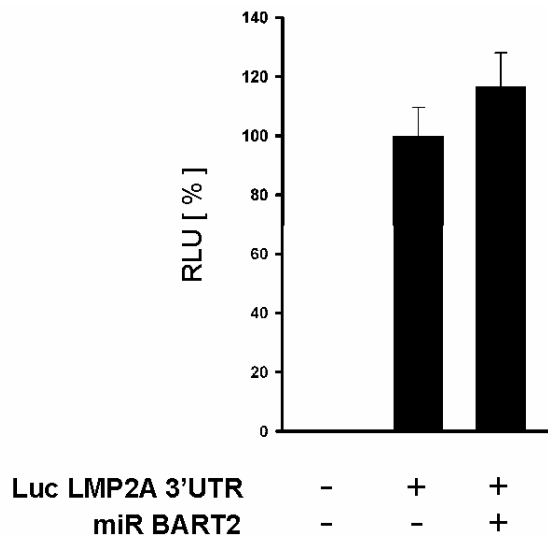


Abbildung 19: Einfluss der miR-BART2 auf die LMP2A-3'UTR

293T-Zellen wurden mit dem Plasmid Luc LMP2A 3'UTR und pSG5-miR-BART2 in den angegebenen Kombinationen exprimiert. Nach 48 h wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt und die Aktivität des Reporters alleine auf 100% gesetzt nach einer Normierung im FACS. Die Koexpression von miR-BART2 führte zu einer Steigerung der Luciferase-Aktivität, die statistisch nicht signifikant ist ($p=0,29$). Es wurden vier unabhängige Experimente in Doppelansätzen durchgeführt, die Werte gemittelt und der mittlere Fehler des Mittelwertes bestimmt. RLU=Relative Luciferase Aktivität (Relative Light Units).

6.2.4. Einfluss der miR-BART2 auf den pGL3-Vektor

Um auszuschließen, dass die miR-BART2 einen Effekt auf den pGL3-Promoter-Ausgangsvektor ausübt, wurde ein weiteres Kontrollexperiment durchgeführt.

In Abbildung 20 ist das Ergebnis aus 4 unabhängigen, mit Doppelansätzen durchgeführten Experimenten graphisch dargestellt. Aufgetragen sind die Mittelwerte. In Zellen, die untransfiziert, bzw. mit pSG5-miR-BART2 transfiziert waren, konnte keine Luciferase-Aktivität gemessen werden. Die mittlere Luciferase-Aktivität des pGL3-Ausgangsvektors wurde auf 100% normiert. Kotransfektion der miR-BART2 führte zu einem leichten Anstieg von etwa 10%, was allerdings statistisch nicht signifikant war ($p=0,27$). Dieses Ergebnis lässt also erkennen, dass die miR-BART2 keinen Effekt auf den verwendeten pGL3-Promoter Vektor ausübt.

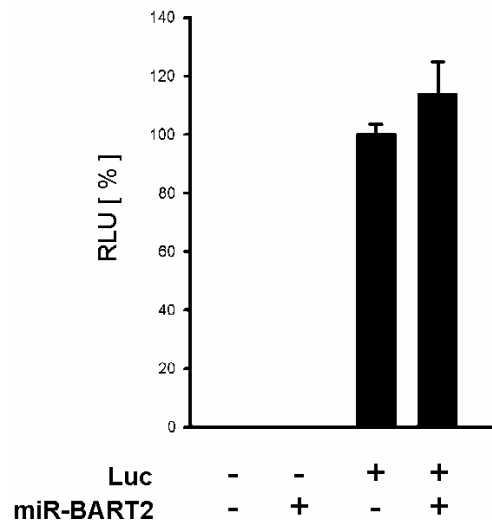


Abbildung 20: Einfluss der miR-BART2 auf den pGL3-Promoter-Ausgangsvektor

Die miRNA und der leere pGL3-Reportervektor wurden in 293T-Zellen in den beschriebenen Kombinationen transfiziert und die Luciferase-Aktivität 48 h später gemessen. Nach einer FACS-Analyse wurde die Aktivität für den pGL3-Leervektor alleine auf 100% festgesetzt. Die Koexpression der miR-BART2 hatte nur einen insignifikanten Einfluss auf die Aktivität der Luciferase ($p=0,27$). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten, die in Doppelansätzen durchgeführt wurden. Es ist der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben. RLU=Relative Luciferase Aktivität (Relative Light Units).

6.2.5. Einfluss der zellulären miR-155 auf die BALF5-3'-UTR

Eine weitere Frage, die noch geklärt werden musste war, ob es sich bei der translationalen Inhibition der Luciferase um einen miRNA-BART2-spezifischen Effekt handelt oder ob auch eine andere miRNA den gleichen Effekt hervorruft. Dazu wurde ein Luciferase-Experiment durchgeführt, bei dem das Konstrukt pSG5-miR-155, welches für die zelluläre miR-155 kodiert, eingesetzt wurde (siehe Abbildung 12).

In dem Diagramm in Abbildung 21 ist das Ergebnis von 4 unabhängigen Experimenten in doppeltem Ansatz dargestellt. In den beiden Kontrollen, bei denen entweder untransfizierte oder nur mit miR-155 transfizierte 293T-Zellen gemessen wurden, konnte keine Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden. Die Transfektion der BALF-3'-UTR in dem pGL3-Vektor resultiert in einer messbaren Aktivität, die auf 100% gesetzt wurde. Bei Kotransfektion von miR-155 und BALF5-3'-UTR ist ein nicht signifikanter Anstieg der Aktivität zu sehen ($p=0,0923$). Hieraus kann also

geschlossen werden, dass die 3'-UTR von BALF5 nicht durch die unspezifische zelluläre miR-155 zu beeinflussen ist, sondern dass es sich um einen spezifischen Effekt der miR-BART2 und ihrer entsprechenden Zielsequenz in der 3'-UTR von BALF5 handelt.

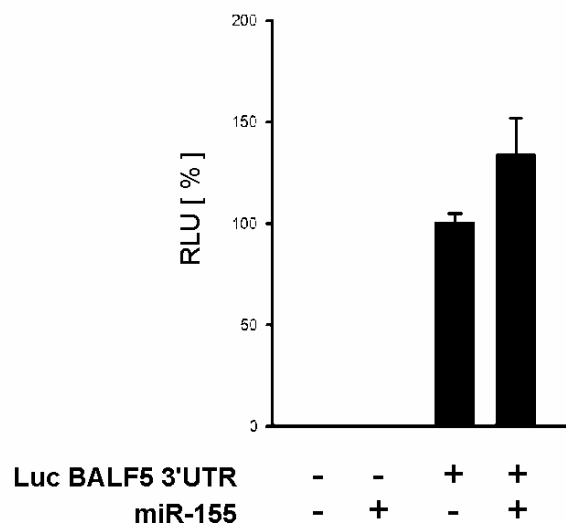


Abbildung 21: Einfluss der unspezifischen miR-155 auf die BALF5-3'-UTR

In 293T-Zellen wurden der Reporter Luc BALF5 3'UTR und die miR-155 in den angegebenen Kombinationen exprimiert und nach 48 h die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Aktivität des Reporters alleine wurde auf 100% gesetzt. Koexpression der miR-155 führte zu einer Steigerung der Luciferase-Aktivität, die statistisch nicht signifikant ist ($p=0,092$). Es wurden vier unabhängige Experimente in Doppelansätzen durchgeführt, die Werte gemittelt und der mittlere Fehler des Mittelwertes bestimmt. RLU=Relative Luciferase Aktivität (Relative Light Units).

Die Luciferaseanalysen ergaben zusammengefasst folgende Ergebnisse. Koexpression der miR-BART2 führte zu einer Reduktion der Aktivität eines Luciferase-BALF5 3'UTR Konstruktes um ca. 40%. Die miR-BART2 zeigte keinen Effekt bei Verwendung eines Reporters mit deletierter miRNA-Bindungsstelle. Mit der miR-BART2 war auch kein Effekt auf das Ausgangsplasmid pGL3-Promoter nachweisbar. Schlussendlich hatte die als Kontrolle eingesetzte zelluläre miRNA miR-155 keinen Einfluss auf die Aktivität des pGL3-Ausgangsvektors bzw. des pGL3-BALF5 3'UTR Reporters.

Daraus lässt sich schließen, dass die miR-BART2 eine translationale Repression oder Spaltung durch die Bindung an ihre Zielsequenz in der 3'UTR der BALF5-mRNA vermittelt.

6.3. Nachweis des BALF5-Proteins mit dem monoklonalen Antikörper 4C12

Nachdem in den oben beschriebenen Versuchen erste Hinweise auf eine Regulation der Translation von BALF5 durch die miR-BART2 gewonnen worden waren, sollte in weiteren Experimenten der Einfluss der miR-BART2 auf die Menge an BALF5-Protein untersucht werden. Für die EBV DNA Polymerase BALF5 ist bislang nur ein polyklonales Serum beschrieben, welches nicht zur Verfügung stand (Gilligan et al., 1991). Daher sollte ein monoklonaler Antikörper gegen das BALF5-Protein hergestellt werden.

Von der Firma Peptide Specialty Laboratory (PSL) in Heidelberg wurde ein synthetisches Peptid hergestellt, das den internen Aminosäuren 66-87 von BALF5 entspricht. Das Peptid wurde in zwei Versionen, einmal als BSA-Konjugat und einmal gebunden an Ovalbumin, geliefert. Mit dem Peptid-BSA-Konjugat wurden von unserer Kooperationspartnerin Elisabeth Kremmer (GSF, München) Ratten immunisiert und anschließend monoklonale Antikörper hergestellt. Positive Klone wurden mithilfe des Peptid-Ovalbumin-Konjugats im ELISA-Verfahren detektiert. Die positiven Antikörperklone wurden unter meiner Anleitung von Frau Claudia Ehses im Rahmen ihrer veterinärmedizinischen Doktorarbeit getestet. Von den getesteten Antikörperklonen lieferte der Antikörper 4C12 das beste Ergebnis.

6.3.1. Western Blot

Der BALF5-spezifische Antikörper 4C12 wurde im Western Blot Verfahren analysiert. Da BALF5 nur im lytischen Zyklus exprimiert wird, wurden B95.8-Zellen mit TPA behandelt, was u.a. zu einer Stimulation des BZLF1-Proteins führt und somit die Zellen in die lytische Phase treibt (vgl. 3.2.4.1). Nach 48 h wurden aus den Zellen Extrakte hergestellt, auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine

Nitrocellulosemembran transferiert und mit den Antikörpern 4C12, BZ-1 und β -Actin angefärbt. Die Detektion erfolgte mit ECL. In Abbildung 22 ist das Ergebnis des Western Blots gezeigt. B95.8 Zellen in der Latenz („TPA-“) zeigten keine BALF5-Expression, während im lytischen Zyklus („TPA+“) deutlich eine spezifische BALF5-Bande mit dem Antikörper 4C12 nachweisbar war. Die Bande hatte das zu erwartende Molekulargewicht von ~110 kDa im SDS-Gel. Das lytische Protein BZLF1 wurde nachgewiesen um zu zeigen, dass der lytische Zyklus tatsächlich durch TPA induziert worden war. Als Ladekontrolle wurde β -Actin verwendet.

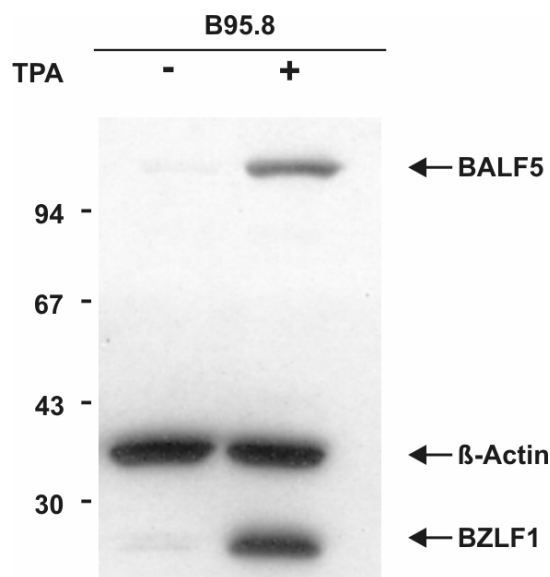


Abbildung 22: Nachweis des BALF5 Proteins in B95.8-Zellen mit dem mAk 4C12

Sample-Buffer Extrakte aus B95.8 Zellen, die 48 h mit TPA behandelt wurden (TPA+) bzw. unbehandelt waren (TPA-) wurden im Western Blot mit Hilfe des neuen mAk 4C12 auf die Expression des BALF5-Proteins getestet. Eine BALF5-spezifische Proteinbande konnte im lytischen Zyklus (TPA+) detektiert werden. Zum Nachweis des lytischen Zyklus wurde BZLF1 mit dem BZ-1- und als Ladekontrolle mit einem β -Actin-Antikörper gefärbt.

Das BALF5-Protein sollte auch in 293EBV-Zellen nachgewiesen werden, die in weiteren Experimenten zum Einsatz kamen. Dazu wurden 293EBV-Zellen mit dem Plasmid p509, das für BZLF1 kodiert, transfiziert und nach 48 h Zellextrakte hergestellt, die dann im Western Blot untersucht wurden. Die Färbung erfolgte mit den Antikörpern 4C12, BZ-1 und β -Actin und die Detektion mit ECL. In Abbildung 23 ist der Blot zu sehen. Nach Auslösen des lytischen Zyklus („p509+“) ist eindeutig

wieder das BALF5-Protein mit einem Molekulargewicht von ~110 kDa nachweisbar, aber erwartungsgemäß nicht im latenten Stadium („p509-“). Als Ladekontrolle wurde wieder β -Actin verwendet. Auch BZLF1 konnte identifiziert werden, was bedeutet, dass die ektopische Expression von BZLF1 über das Plasmid p509 erfolgreich war. Zusammenfassend bedeuten diese Ergebnisse, dass der neu hergestellte Antikörper 4C12 das BALF5-Protein im Western Blot in den Zelllinien B95.8 und 293EBV nach Auslösen des lytischen Zyklus erkennt.

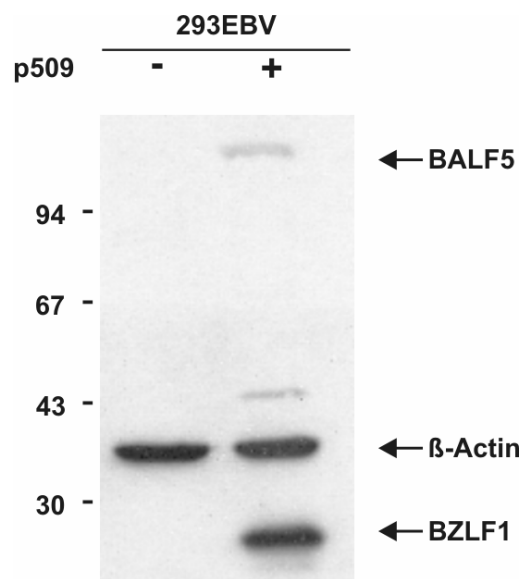


Abbildung 23: Nachweis des BALF5-Proteins in 293EBV-Zellen mit dem mAk 4C12

293EBV-Zellen wurden transfiziert mit dem Vektor p509, der für BZLF1 kodiert und den lytischen Zyklus auslöst. 48 h später wurden Sample-Buffer Extrakte aus diesen und untransfizierten 293EBV-Zellen hergestellt und im Western Blot mit dem mAk 4C12 gegen BALF5 angefärbt. Der Nachweis des lytischen Zyklus erfolgte mit dem BZ-1 Antikörper, der BZLF1 erkennt und als Ladekontrolle diente β -Actin.

6.3.2. Immunpräzipitation

In diesem Experiment sollte nun gezeigt werden, dass der Antikörper 4C12 nicht nur zum Western Blot-Nachweis des BALF5-Proteins verwendet werden kann, sondern dass dieser auch in der Lage ist, das native, nicht denaturierte Protein zu präzipitieren.

Zu diesem Zweck wurde in Raji-Zellen der lytische Zyklus mit TPA ausgelöst und daraus native Proteinextrakte hergestellt. Diese Extrakte wurden mit dem BALF5-spezifischen Antikörper 4C12 und zur Kontrolle mit einem Antikörper gegen das Borna-Virus (BDV)-Protein p40 (5F11) inkubiert (Sauder et al., 1996). Nach entsprechenden Waschschritten wurden die präzipitierten Proteine auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem BALF5 Antikörper 4C12 angefärbt.

In Abbildung 24 ist die Immunpräzipitation dargestellt. In der Spur, die als „Input“ bezeichnet ist, wurde das unbehandelte Zelllysate aufgetragen. Dabei handelte es sich um den reinen Proteinextrakt aus TPA-induzierten Raji-Zellen, der für die Präzipitation eingesetzt wurde. Bei ~110 kDa ist das BALF5-Protein in Raji-Zellen eindeutig nachweisbar. Der eingesetzte Kontroll-Antikörper 5F11, der spezifisch das Borna-Virusprotein p40 erkennt, sollte nicht in der Lage sein, BALF5 zu präzipitieren. Erwartungsgemäß ist hier keine Bande sichtbar. Das präzipitierte BALF5-Protein konnte mit dem Antikörper 4C12 nachgewiesen werden. Auf dem Blot sieht man außerdem die schweren und leichten Ketten der zur Präzipitation eingesetzten Antikörper.

Das Ergebnis zeigt, dass der neu entwickelte monoklonale Antikörper 4C12 das BALF5-Protein nicht nur im Western Blot, sondern auch in der Immunpräzipitation erkennen kann und somit äußerst spezifisch ist.

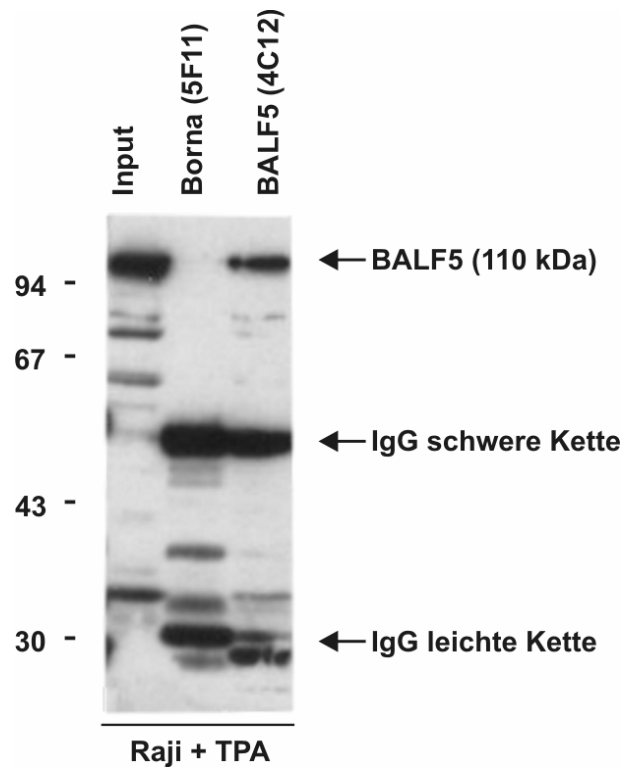


Abbildung 24: Immunpräzipitation von BALF5 mit dem mAk 4C12

Nativer Proteinextrakt aus Raji-Zellen, die 48 h mit TPA behandelt waren, wurde inkubiert mit dem BALF5 spezifischen Antikörper 4C12 bzw. mit dem unspezifischen Borna Antikörper 5F11. Die gebildeten Immunkomplexe wurden mittels Protein-G-Sepharose aufgereinigt und im Western Blot mit dem BALF5 Antikörper 4C12 nachgewiesen. Als Inputkontrolle wurde Sample-Buffer Extrakt aus den induzierten Raji-Zellen vor der Präzipitation verwendet (Input). Auf dem Blot sind außerdem die schweren und leichten Ketten der Antikörper zu erkennen.

6.3.3. Immunfluoreszenz

In diesem Experiment sollte die zelluläre Lokalisation des BALF5-Proteins untersucht werden und außerdem die Frage geklärt werden, ob der neue monoklonale Antikörper 4C12 geeignet ist, das BALF5-Protein in der Immunfluoreszenz spezifisch anzufärben. BALF5 wird als „early“-Protein in der frühen Phase des lytischen Zyklus exprimiert. Deshalb wurden 293EBV-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und 24 h danach mit dem BZLF1-Expressionsplasmid p509 transfiziert, was ein Auslösen des lytischen Zyklus in den hauptsächlich latent-infizierten 293EBV-Zellen zur Folge hat. 24 h später wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit den Antikörpern 4C12 gegen BALF5 und BZ-1 gegen BZLF1 durchgeführt. 293EBV-Zellen sind stabil mit einem Plasmid transfiziert, welches ein rekombinantes EBV-Genom exprimiert. Dieses

Plasmid exprimiert auch EGFP, das in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden kann und als Indikator für EBV-positive Zellen dient. Aus diesem Grund wurden für den Nachweis von BALF5 und BZLF1 TRITC-konjugierte Sekundärantikörper verwendet. Abbildung 25 zeigt das Ergebnis der Immunfluoreszenz. EBV-positive Zellen zeigen eine grüne Färbung der kompletten Zelle (A, D, G). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (C, F, I). In der Kontrolle wurden untransfizierte Zellen mit BZLF1- und BALF5-Antikörper angefärbt (B). Es ist hier nur eine unspezifische Hintergrundfärbung erkennbar. Das BZLF1-Protein kann erwartungsgemäß im Kern nachgewiesen werden (E) und zeigt auch, dass der lytische Zyklus durch die Transfektion von p509 induziert wurde. Das BALF5-Protein weist ebenfalls eine Kernfärbung auf, was zu erwarten war, da es dem EBV im Kern als DNA-Polymerase dient. Der Vergleich mit GFP zeigt, dass BALF5 und BZLF1 nicht in allen EBV-positiven Zellen nachweisbar sind. Möglicherweise tritt nur ein Teil der Zellen in den lytischen Zyklus über, es ist aber auch so, dass nicht alle 293EBV-Zellen auch eine GFP-Fluoreszenz besitzen, weil unter bestimmten Umständen das EGFP-Gen verloren geht, die Zellen dann aber immer noch EBV-positiv sein können.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich schließen, dass die EBV-DNA-Polymerase BALF5 ein Kernprotein ist, welches ausschließlich im lytischen Zyklus exprimiert wird. Außerdem ist zu vermerken, dass der neue Antikörper 4C12 zusätzlich zu Western Blot und Immunpräzipitation auch in der Immunfluoreszenz einsetzbar ist und das Protein spezifisch erkennt.

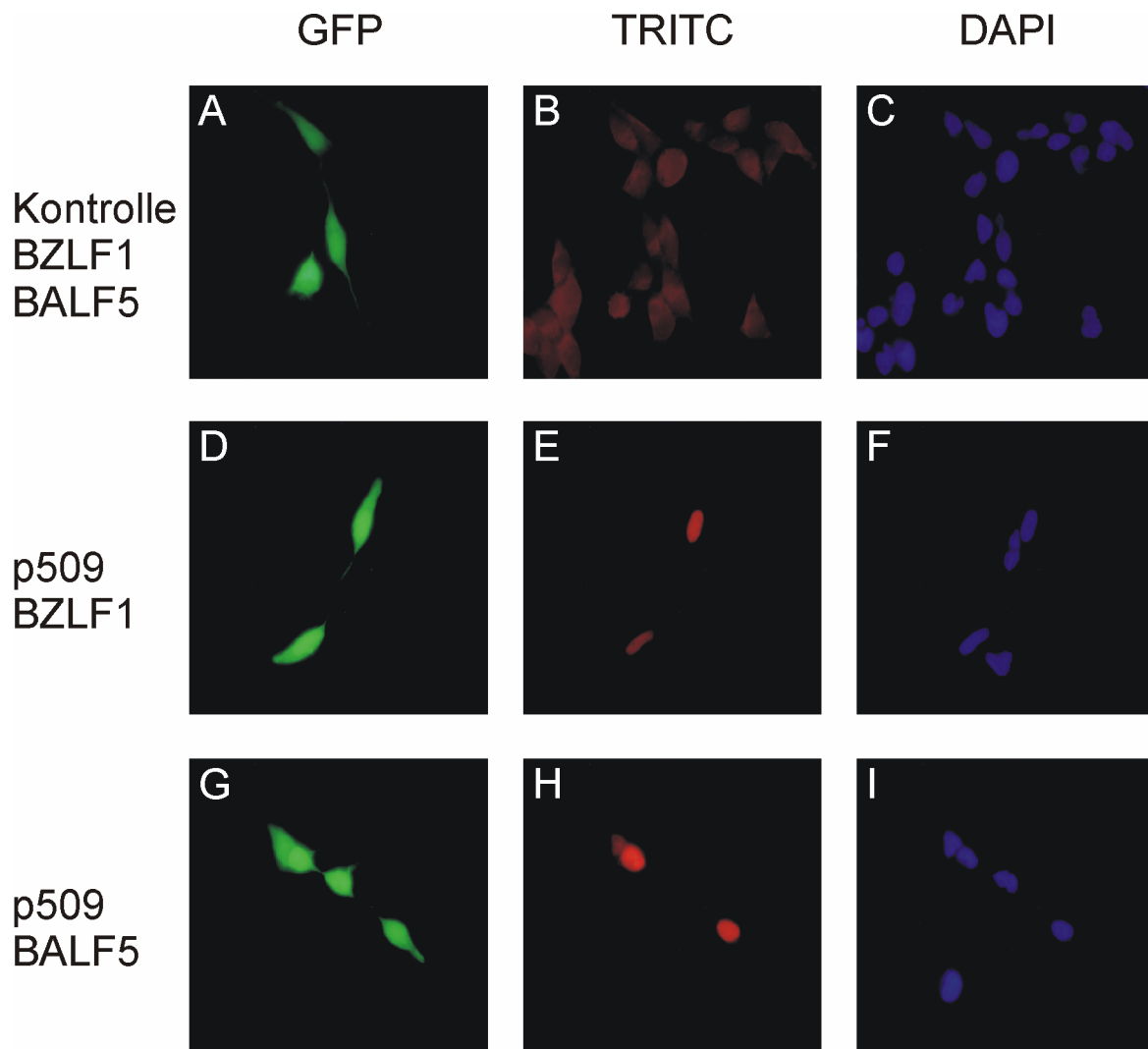


Abbildung 25: Immunfluoreszenz von BALF5

In 293EBV-Zellen wurde der lytische Zyklus induziert durch Transfektion des BZLF1-Expressionsplasmids p509. Die Zellen wurden mit BALF5-Antikörper (H) und mit BZLF1-Antikörper (E) angefärbt. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen mit beiden Antikörpern angefärbt (B). Für die Fluoreszenz wurden TRITC-konjugierte Sekundärantikörper verwendet. Die Fluoreszenz von GFP zeigt die Expression des EBV-Plasmids, mit dem die 293EBV-Zellen stabil transfiziert sind (A, D, G). Die Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (C, F, I). Die Bilder wurden bei einer 60fachen Vergrößerung aufgenommen.

6.4. Einfluss der miR-BART2 auf die BALF5 Proteinmenge

In den vorhergehenden Experimenten (vgl. 6.2.1) wurde gezeigt, dass die miR-BART2 in der Lage ist, durch Bindung an die Zielsequenz in der BALF5-3'-UTR eine Reduktion der Translation zu vermitteln. Da es sich bei der Messung der Luciferase-Aktivität um ein artifizielles System handelt, sollten diese Ergebnisse auf

Proteinebene mit Hilfe des neu generierten BALF5-spezifischen mAk 4C12 *in vivo* validiert werden. In dem folgenden Experiment wurde also untersucht, ob die ektopisch exprimierte miR-BART2 die BALF5-Proteinmenge vermindern kann. Da BALF5 ein lytisches Protein ist, wurde in den 293EBV-Zellen BZLF1 (p509) zur Induktion des lytischen Zyklus exprimiert (vgl. auch 6.3.3). Die Plasmide pSG5-miR-BART2 zur ektopischen Expression von miR-BART2 bzw. pSG5-Leervektor als Kontrolle wurden entsprechend kotransfiziert. Die Proteine wurden in Western Blots mit dem BALF5-spezifischen Antikörper 4C12 und dem β -Actin-Antikörper angefärbt. Der Western Blot in Abbildung 26 zeigt das Ergebnis. Die Expression von BALF5 ist erwartungsgemäß nur im lytischen Zyklus nachweisbar (Spur 2 und 4), und nicht in der Latenz (Spur 1 und 3). Bei Überexpression von miR-BART2 (Spur 4) kommt es zu einer deutlich sichtbaren Abnahme der Proteinmenge von BALF5 im Vergleich zur unspezifischen miR-155 (Spur 2).

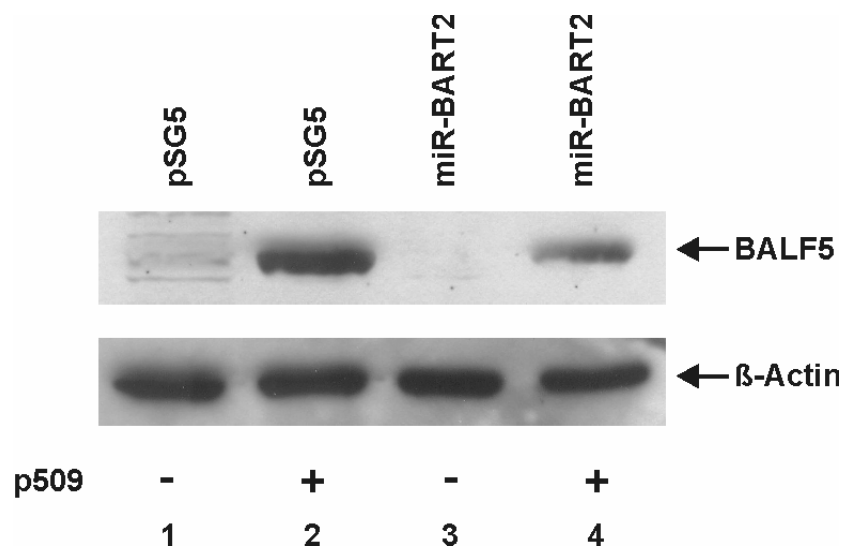


Abbildung 26: Western Blot zur Verringerung der BALF5-Proteinmenge durch die miR-BART2

293EBV-Zellen wurden mit dem BZLF1-Expressionsplasmid p509 in Kombination mit dem miR-BART2 Expressionsplasmid oder mit dem pSG5-Leervektor als Kontrolle transfiziert. Nach 48 h wurden Sample-Buffer Extrakte hergestellt, die dann im Western Blot mit dem monoklonalen Antikörper 4C12, zum Nachweis des BALF5-Proteins und mit einem β -Actin Antikörper als Ladekontrolle angefärbt wurden.

Die Banden von drei voneinander unabhängig durchgeführten Western Blots wurden quantifiziert und eine Statistik erstellt, die in Abbildung 27 grafisch dargestellt ist. Die

BALF5-Proteinmenge unter Verwendung des pSG5-Leervektors wurde auf 100% gesetzt. Wie aus dem Diagramm ersichtlich ist, konnte eine durchschnittliche Reduktion der BALF5-Proteinmenge von etwa 40% ermittelt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der Luciferase-Experimente, bei denen ebenfalls eine 40%ige Reduktion messbar war (vgl. Abbildung 16).

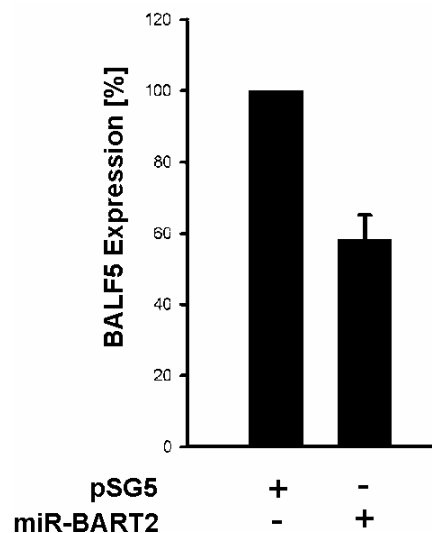


Abbildung 27: Reduktion der BALF5-Proteinmenge durch die miR-BART2

Die Proteinbanden von drei voneinander unabhängig durchgeführten Western Blots wurden quantifiziert und statistisch ausgewertet. Die BALF5-Proteinmenge in den Zellen, die mit der Kontroll-miR-155 transfiziert waren, wurde auf 100% gesetzt. Die Reduktion der Proteinmenge von etwa 40% durch die miR-BART2 war signifikant ($p=0,0037$). Der lytische Zyklus wurde ausgelöst durch Kotransfektion des BZLF1-Expressionsplasmids p509.

In einem Kontrollexperiment wurde getestet, ob sich die BALF5-Proteinmenge auch durch die ektopische Expression der unspezifischen miR-155 im lytischen Zyklus verändert. In Abbildung 28 ist der Western Blot gezeigt. In den latenten 293EBV-Zellen wird erwartungsgemäß kein BALF5 exprimiert (Spur 1 und 2). Es wird deutlich, dass kein Unterschied der Proteinexpression detektierbar war bei Expression von miR-155 (Spur 4) im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Zellen (Spur 3). Auch dieses Ergebnis stimmt mit den Daten der Luciferase-Experimente überein, in denen auch keine Reduktion, sondern eher ein kleiner Anstieg der Luciferase-Aktivität messbar war (vgl. Abbildung 21).

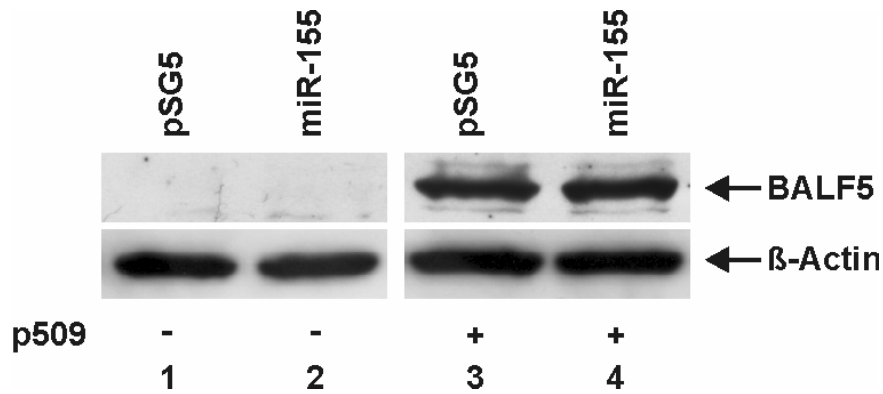


Abbildung 28: Einfluss der unspezifischen miR-155 auf die BALF5-Proteinmenge

293EBV-Zellen wurden mit p509 in Kombination mit pSG5-miR-155 oder mit pSG5-Leervektor als Kontrolle transfiziert. Nach 48 h wurden Sample-Buffer Extrakte hergestellt, die dann im Western Blot mit dem BALF5-spezifischen mAk 4C12 und mit einem β -Actin Antikörper als Ladekontrolle angefärbt wurden.

Aus den Ergebnissen der Western Blots lässt sich also schließen, dass die miR-BART2 tatsächlich auch *in vivo* eine translationale Inhibition durch Bindung an ihre Zielsequenz in der 3'UTR der BALF5 mRNA vermittelt, was zur Folge hat, dass die BALF5-Proteinmenge vermindert wird. Dieser Effekt tritt bei Expression der unspezifischen miR-155 nicht auf.

6.5. Hemmung der miR-BART2 durch „Locked Nucleic Acids“ (LNA's)

Um die Funktion von microRNA's spezifisch zu hemmen, wurden in den letzten Jahren verschiedene Verfahren entwickelt, bei denen „Anti-miRNA's“ zum Einsatz kommen. Dies sind sequenzspezifische Oligonukleotide, die selektiv miRNA's blockieren können. Um eine bessere Stabilität der Oligonukleotide zu gewährleisten werden verschiedene Modifikationen in das Rückgrat der Nucleinsäure eingefügt. Eine recht neue Methode miRNA's zu inhibieren sind LNA-Oligonukleotide („Locked nucleic acid“), in welchen der Zucker-Anteil auf besondere (nicht natürliche) Weise chemisch modifiziert ist (Kauppinen et al., 2006). Das C2- und C4-Atom der Ribose sind über eine Sauerstoff-Methylen-Brücke verbunden. Dadurch wird die Ribose in der 3'-endo-Konformation fixiert. LNA ist dadurch strukturell weniger flexibel und

hybridisiert sehr gut an die Zielsequenz (Alvarez-Garcia & Miska, 2005; Castoldi et al., 2006). Durch eine miR-BART2-spezifische LNA sollte die miRNA inhibiert werden, was zu einer erhöhten Expression des BALF5-Proteins im lytischen Zyklus führen könnte und ein weiterer Hinweis auf die Spezifität der miRNA zu ihrem Zielgen wäre. Dazu wurden ein LNA-Oligonukleotid, das direkt an die reife miR-BART2 binden kann und ein Kontroll-LNA-Oligonukleotid, das aus einer zufälligen Sequenz besteht und die miR-BART2 nicht inhibieren sollte, verwendet. Die LNA's wurden in 293EBV-Zellen transfiziert, nach 24 und 48 h Gesamt-RNA isoliert und diese im Northern-Blot auf die Expression von miR-BART2 untersucht. In Abbildung 29 ist das Ergebnis dieses Blots dargestellt. Die Expression der miR-BART2 lässt sich durch die spezifische LNA in 293EBV-Zellen deutlich um ca. 95% im Vergleich zur RNA aus untransfizierten Zellen reduzieren. Allerdings führt auch die „Scrambled LNA“ mit unspezifischer Sequenz zu einer Reduktion von etwa 80%. Nach 48 h lässt sich keine Reduktion der miR-BART2 mehr feststellen, weder durch die miR-BART2 spezifische, als auch durch die „Scrambled-LNA“. Somit scheint die Hemmung der miRNA nach 24 h am effektivsten zu sein.

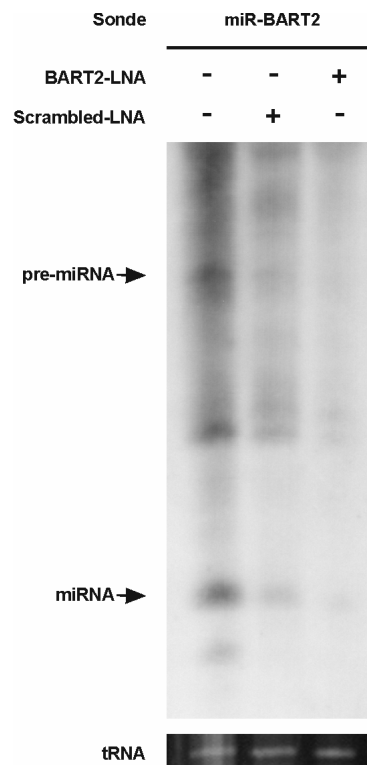


Abbildung 29: Northern Blot zum Nachweis der Hemmung von miR-BART2 durch ein sequenzspezifisches LNA-Oligonukleotid

293EBV-Zellen wurden transfiziert mit LNA-Oligonukleotiden gegen miR-BART2 und einer Kontroll-LNA mit zufälliger Sequenz („Scrambled-LNA“). Nach 24 h wurde RNA aus den Zellen isoliert, auf einem 12%igen Acrylamidgel aufgetrennt, geblottet und mit einer radioaktiven Sonde gegen miR-BART2 hybridisiert.

Um nun zu untersuchen, ob sich die Proteinmenge nach Transfektion der LNA verringert, wurden Western Blots durchgeführt. In 293EBV-Zellen wurde der lytische Zyklus durch Expression von BZLF1 ausgelöst und die BART2-LNA bzw. Scrambled-LNA kotransfiziert. In Abbildung 30 ist das Ergebnis des Western Blots dargestellt. Die Expression des BALF5-Proteins in 293EBV-Zellen bleibt unbeeinflusst bei Transfektion der BART2-LNA im Vergleich zu Zellen, die mit p509 oder Scrambled-LNA-transfiziert waren.

Zusammenfassend kann daraus also geschlossen werden, dass die miR-BART2 durch die spezifische LNA nahezu ausgeschaltet werden kann, aber dies keine gesteigerte BALF5-Proteinexpression im lytischen Zyklus zur Folge hat.

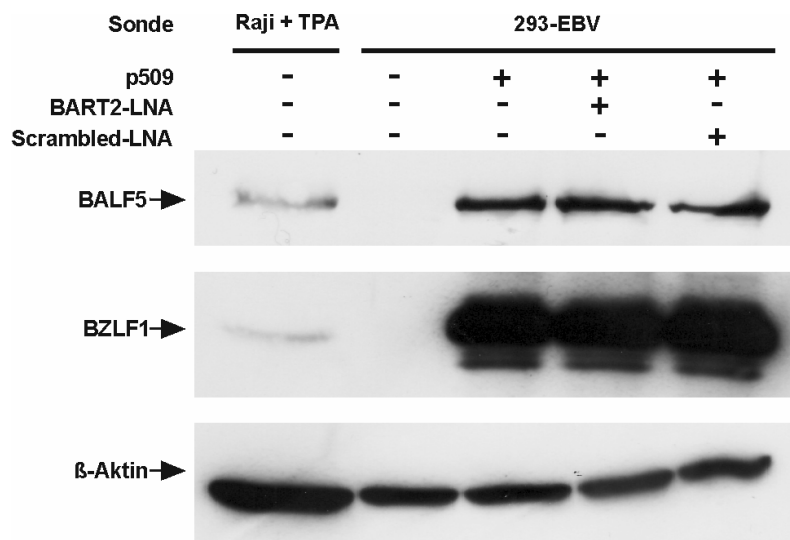


Abbildung 30: Einfluss einer miR-BART2-spezifischen LNA auf die Expression des Proteins BALF5

293EBV-Zellen wurden mit p509 und einer LNA gegen miR-BART2 bzw. einer unspezifischen „Scrambled-LNA“ transfiziert. Nach 48 h wurden Proteinextrakte hergestellt, die im Western Blot mit dem BALF5-spezifischen mAk 4C12 angefärbt wurden. Es war keine stärkere BALF5-Proteinexpression bei Transfektion der miR-BART2-LNA zu detektieren. Mit TPA induzierte Raji-Zellen dienten als Kontrolle und es wurde BZLF1 zum Nachweis des lytischen Zyklus bzw. β -Actin als Ladekontrolle angefärbt.

6.6. Einfluss des lytischen Zyklus auf die Expression der EBV miR-BART2

Die vorangegangenen Ergebnisse in 6.4 hatten eine Reduktion der BALF5-Proteinmenge durch die Überexpression der miR-BART2 in Zellen, in denen der lytische Zyklus angeschaltet war, gezeigt.

Daraus ergibt sich nun die Frage, wie sich die endogene miR-BART2 in Zellen, bei denen der lytische Zyklus ausgelöst wird, verhält. Zu erwarten wäre eine Abnahme der miR-Menge, da es zu einer vermehrten Expression von BALF5-Protein kommt. Um diese Frage zu klären wurden verschiedene Northern-Blot Analysen durchgeführt. In EBV-negativen BL41- und in EBV-positiven Jijoye- bzw. B95.8-Zellen wurde der lytische Zyklus durch Zugabe von TPA induziert. Nach 48 h wurde Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert, die dann auf einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend geblottet wurde. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv-markierten, miR-BART2-spezifischen Sonde (miRVana™-Markierung).

Der Northern-Blot in Abbildung 31 zeigt das Ergebnis. In EBV-negativen BL41-Zellen, die als Kontrolle dienten, war erwartungsgemäß keine miR-BART2 nachweisbar (Spur 1 und 2). In unbehandelten Jijoye-Zellen ist die miRNA etwas geringer exprimiert, als in entsprechenden B95.8-Zellen (Spur 3 und 5). Die Northern Blots wurden mit Hilfe eines Phosphormagers (Molecular Dynamics) sichtbar gemacht und die Intensität mit der Software Image Quant 5.1 (Molecular Dynamics) quantifiziert. Der Vergleich von unbehandelten mit den TPA behandelten Jijoye-Zellen zeigt eine Abnahme der miR-BART2 Menge um etwa 33% (Spur 3 und 4). Ebenso zeigen auch die B95.8-Zellen nach Induktion des lytischen Zyklus eine reduzierte Expression der miR-BART2 um etwa 36% (Spur 5 und 6).

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich also tatsächlich eine Abnahme der miR-BART2 Menge in Zellen, die sich im lytischen Zyklus befinden, was wiederum zur Folge hat, dass das BALF5-Protein in höherem Maße exprimiert werden kann, da die Translation nicht mehr reprimiert, bzw. die mRNA nicht mehr gespalten wird.

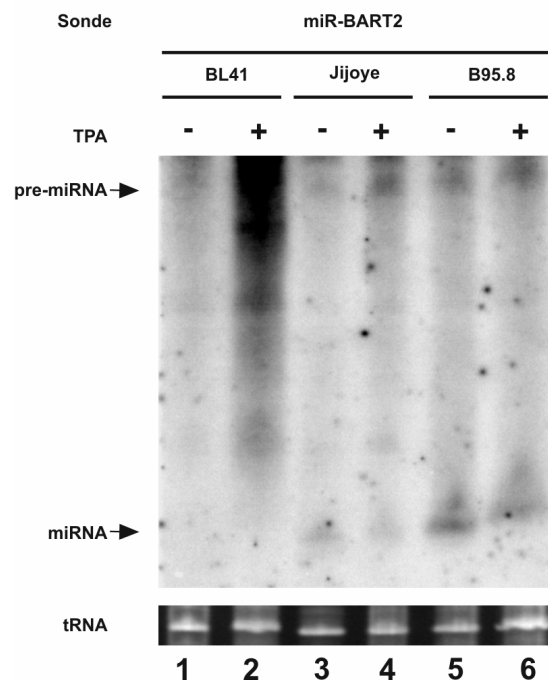


Abbildung 31: Northern Blot zum Nachweis der miR-BART2 Menge im lytischen Zyklus

EBV-negative BL41- und EBV-positive Jijoye-, bzw. B95.8-Zellen wurden mit TPA behandelt und 48 h später Gesamt-RNA isoliert, die dann im Northern Blot mit einer RNA-Sonde gegen miR-BART2 analysiert wurde. Zu sehen ist die Expression der miR-BART2 von unbehandelten (TPA-) im Vergleich zu induzierten (TPA+) Zellen. BL41-Zellen wiesen keine Expression auf (Spur 1 und 2). In den EBV-positiven Jijoye- und B95.8-Zellen wurde die miR-BART2 nachgewiesen und eine Abnahme der Expression um ~33% bei Jijoye- und um ~36% bei B95.8-Zellen nach TPA-Induktion festgestellt. Als Ladekontrolle ist die tRNA nach Ethidiumbromidfärbung gezeigt.

In einem Kontrollexperiment wurde als Sonde die miR-155 eingesetzt, die ebenfalls wie oben beschrieben radioaktiv markiert wurde. Das Ergebnis dieses Northern-Blots ist in Abbildung 32 dargestellt. BL41-Zellen weisen eine nur geringe Expression der zellulären miR-155 auf, die nur leicht durch TPA-Induktion erhöht wird (Spur 1 und 2). In den EBV-positiven Jijoye-Zellen ist die Expression etwas stärker (Spur 3). Der Vergleich von unbehandelten mit den mit TPA-induzierten Jijoye-Zellen zeigt eine Steigerung der miR-155 von 75% (Spur 3 und 4). Am deutlichsten ist die Expression der miR-155 in B95.8-Zellen (Spur 5) zu erkennen. Die Induktion des lytischen Zyklus führt hier zu einem enormen Anstieg der miR-155 Menge um etwa 96% (Spur 6). Ein Anstieg der Menge an miR-155 wurde in der Literatur beschrieben für EBV-negative HL60-Zellen nach TPA-Induktion (Kasashima et al., 2004) und EBV-positive Burkitt-Lymphom Zellen (Mrazek et al., 2007).

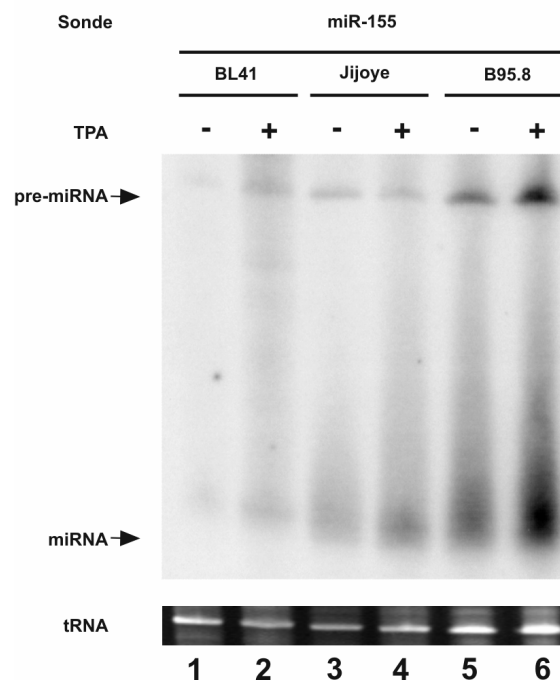


Abbildung 32: Northern Blot zum Nachweis der miR-155-Menge im lytischen Zyklus

EBV-negative BL41- und EBV-positive Jijoye-, bzw. B95.8-Zellen wurden mit TPA behandelt und 48 h später Gesamt-RNA isoliert, die dann im Northern Blot mit einer RNA-Sonde gegen miR-155 untersucht wurde. Die miR-155 wurde in allen getesteten Zelllinien exprimiert. Auch die pre-miRNA war sichtbar. Die mit TPA induzierten Zellen (TPA+) weisen durchgehend eine gesteigerte Menge an miR-155 auf im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (TPA-). Bei BL41-Zellen beträgt diese Steigerung ~360% (Spur 1 und 2), bei Jijoye-Zellen ~75% (Spur 3 und 4) und bei B95.8-Zellen ~96% (Spur 5 und 6). Die Ethidiumbromid-gefärbte tRNA wurde als Ladekontrolle verwendet.

In einem weiteren Northern Blot wurde die Expression der miR-BART1 getestet, die im Genom vor der B95.8-Deletion kodiert wird. Dazu wurden ebenfalls die oben beschriebenen Zellen mit TPA behandelt. Im Northern Blot in Abbildung 33 wurde die RNA mit einer RNA-Sonde gegen miR-BART1 hybridisiert. In den BL41-Zellen ist keine Expression der miR-BART1 nachweisbar (Spur 1 und 2). Jijoye- und B95.8-Zellen zeigen eine deutliche Expression der mi-RNA. Der Vergleich von unbehandelten Zellen mit den TPA behandelten Zellen zeigt eine Abnahme der miR-BART1-Menge im lytischen Zyklus. Diese Reduktion beträgt bei den Jijoye-Zellen etwa 27% (Spur 3 und 4) und bei den B95.8-Zellen ebenfalls etwa 27% (Spur 5 und 6).

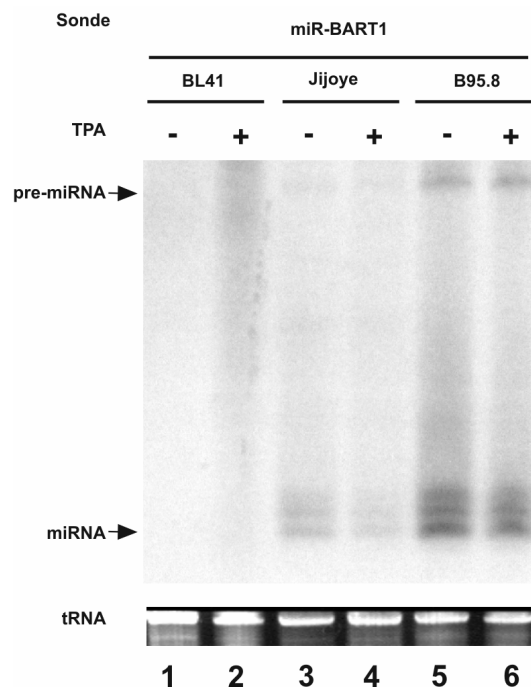


Abbildung 33: Northern Blot zum Nachweis der miR-BART1 Menge im lytischen Zyklus

EBV-negative BL41- und EBV-positive Jijoye-, bzw. B95.8-Zellen wurden mit TPA behandelt und 48 h später Gesamt-RNA isoliert, die dann im Northern Blot mit einer RNA-Sonde gegen miR-BART1 analysiert wurde. Zu sehen ist die Expression der miR-BART1 von unbehandelten (TPA-) im Vergleich zu induzierten (TPA+) Zellen. BL41-Zellen wiesen keine Expression auf (Spur 1 und 2). In den EBV-positiven Jijoye- und B95.8-Zellen wurde die miR-BART1 nachgewiesen und eine Abnahme der Expression um ~27% bei Jijoye- (Spur 3 und 4), als auch bei B95.8-Zellen (Spur 5 und 6) nach TPA-Induktion ermittelt. Als Ladekontrolle ist die tRNA nach Ethidiumbromidfärbung abgebildet.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass ein Anschalten des lytischen Zyklus in verschiedenen EBV-positiven Zellen dazu führt, dass die Menge an miR-BART2 und auch die der miR-BART1 reduziert wird. Daraus lässt sich folgern, dass diese miRNA's im lytischen Zyklus nicht gebraucht werden und deshalb in geringerem Maße exprimiert werden. Im Falle der Interaktion von miR-BART2 mit ihrem Ziel der EBV Polymerase BALF5 würde das eine potenzielle Regulation von BALF5 bedeuten. In der Latenz ist die miR-BART2 stark exprimiert und BALF5 ausgeschaltet und im lytischen Zyklus wird das BALF5-Protein exprimiert und die miR-BART2 Menge nimmt ab.

6.7. Reduzierung der Repression („De-Repression“) der BALF5 3'UTR im lytischen Zyklus

Es konnte gezeigt werden, dass die miR-BART2 Menge durch das Anschalten des lytischen Zyklus reduziert wird. Die miR-BART2 liegt also in verringerter Menge in lytischen Zellen vor und kann vermutlich nicht mehr die Translation der BALF5 3'UTR inhibieren, zumindest nicht mehr in so starkem Ausmaß. Nach Induktion des lytischen Zyklus sollte also eine geringere Repression der Translation auftreten („De-Repression“), weil nicht mehr so viele miR-BART2 Moleküle in der Zelle vorhanden sind, die an die BALF5 3'UTR binden.

Der Einfluss der infolge einer Induktion des lytischen Zyklus reduzierten miR-BART2 Menge auf die BALF5 3'UTR wurde in einem Luciferase-Reporter-Experiment untersucht. Dazu wurde das Plasmid pGL3-BALF5 3'UTR alleine und zusammen mit dem BZLF1-Expressionsplasmid p509 zum Auslösen des lytischen Zyklus in 293EBV-Zellen transfiziert und nach 48 h die Luciferase-Aktivität gemessen. In Abbildung 34 ist das Ergebnis graphisch dargestellt. Die gemessene Luciferase-Aktivität in den latenten Zellen, die nur mit der BALF5 3'UTR transfiziert waren wurde auf 100% gesetzt. Wie eindeutig zu sehen ist, führt ein Auslösen des lytischen Zyklus (p509+) zu einem signifikanten 7,7-fachen Anstieg der Luciferase-Aktivität ($p=0,003$). Durch die verringerte Menge miR-BART2 im lytischen Zyklus wird also die reprimierende Wirkung auf die BALF5-3'UTR aufgehoben („De-Repression“).

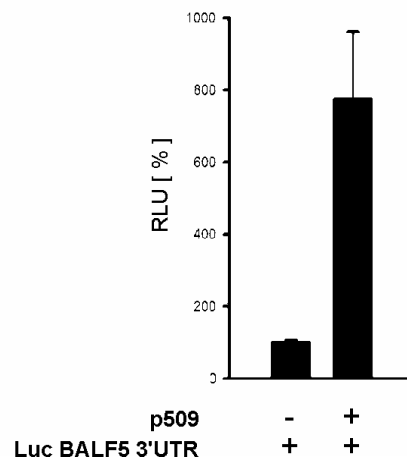


Abbildung 34: Einfluss der reduzierten miR-BART2 Menge auf die BALF5 3'UTR im lytischen Zyklus

Das Reporterplasmid pGL3-BALF5-3'UTR und der BZLF1-Expressionsvektor p509 wurden in 293EBV-Zellen in den angegebenen Kombinationen transfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h später gemessen, mit FACS normiert, und für die BALF5 3'UTR alleine auf 100% gesetzt. Koexpression von BZLF1 führte zu einer Steigerung der Luciferase-Aktivität auf etwa 800%. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von sechs unabhängigen, in Doppelansätzen durchgeführten Experimenten, unter Angabe des mittleren Fehlers des Mittelwertes. RLU=Relative Luciferase Aktivität (Relative Light Units).

In einem Kontrollexperiment wurde die mutierte BALF5 3'UTR, in der die komplette Zielsequenz deletiert ist alleine oder zusammen mit BZLF1 in 293EBV-Zellen exprimiert. In dem Balkendiagramm in Abbildung 35 wurde die Luciferase-Aktivität nach Transfektion des Luc BALF5 3'UTR-Konstrukts auf 100% gesetzt. Kotransfektion von p509, was den lytischen Zyklus induziert, führt zu einer statistisch insignifikanten Steigerung der Aktivität um das 1,6-fache ($p=0,07$).

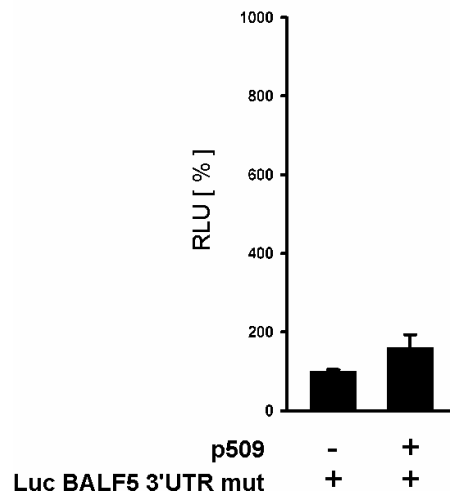


Abbildung 35: Einfluss der reduzierten miR-BART2 Menge auf die mutierte BALF5 3'UTR im lytischen Zyklus

Das mutierte Reporterplasmid pGL3-BALF5-3'UTR-mut, das eine Deletion der Zielsequenz aufweist und der BZLF1-Expressionsvektor p509 wurden in 293EBV-Zellen in den angegebenen Kombinationen transfiziert. Nach 48 h wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt, die Werte mittels FACS-Analyse standardisiert und für die BALF5 3'UTR-Mutante alleine auf 100% festgesetzt. Koexpression von BZLF1 führte zu einer Steigerung der Luciferase-Aktivität auf etwa 160%, welche allerdings statistisch nicht signifikant war ($p=0,07$). In dem Diagramm sind die Mittelwerte von sechs unabhängigen Experimenten, die in Doppelansätzen durchgeführt wurden, unter Angabe des mittleren Fehlers des Mittelwertes dargestellt. RLU=Relative Luciferase Aktivität (Relative Light Units).

Die Koexpression der Luc-BALF5-3'UTR mit p509 führt also zu einer etwa 8-fachen Steigerung der Luciferase-Aktivität, während die mutierte Luc-BALF5-3'UTR zusammen mit p509 immerhin noch zu einer ca. 2-fachen Steigerung führt. Vergleicht man beide Aktivitäten kommt es also zu einer ungefähren Steigerung der Abnahme der Repression („De-Repression“) um das Vierfache.

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass durch die reduzierte miR-BART2 Menge im lytischen Zyklus tatsächlich die translationale Inhibition bzw. Spaltung der BALF5-mRNA abnimmt und somit erwartungsgemäß mehr BALF5-Protein exprimiert werden kann.

6.8. Einfluss der miR-BART2 auf die Virusneuproduktion

Das BALF5-Protein stellt die DNA Polymerase des EBV dar, d.h. sie wird benötigt zur Replikation des Genoms im lytischen Zyklus. Die zuvor gezeigten Ergebnisse zeigen nun eine Interaktion der miR-BART2 und der BALF5 mRNA mit einer Abnahme der Translation und einer daraus folgenden Reduktion der Proteinsynthese. Daraus ergab sich die Frage wie sich eine Überexpression von miR-BART2 im lytischen Zyklus auf die Produktion von neuen Viruspartikeln auswirkt. Es ist zu erwarten, dass die miR-BART2 die Expression der DNA-Polymerase BALF5 hemmt, was zu einer verringerten Virusneubildung führen sollte.

Um die Virusmenge im Überstand zu bestimmen wurden 293EBV-Zellen zur Induktion des lytischen Zyklus mit dem BZLF1-Expressionsplasmid p509 und mit pSG5-miR-BART2 bzw. der Kontrolle pSG5-miR-155 kotransfiziert. 48 h später wurde die DNA aus dem Überstand isoliert und eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt. Das Ergebnis dieser PCR ist in dem Diagramm in Abbildung 36 dargestellt. Die Menge an Virus, die von Leervektor-transfizierten Zellen gebildet wurde, wurde auf 100% normiert. Eine Transfektion der miR-BART2 führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Virusmenge im Überstand von etwa 20% ($p=0,0039$). Die Kontroll miR-155 reduzierte die Virusmenge ebenfalls, aber nur in einem geringen Maß, das statistisch als nicht signifikant betrachtet werden kann ($p=0,155$).

Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass die miR-BART2 am Lebenszyklus des Virus beteiligt ist und vermutlich zur Aufrechterhaltung der Latenz in infizierten Zellen beiträgt, indem sie nicht nur die Synthese des BALF5-Proteins, sondern, als Folge davon, auch die Replikation und somit die Neubildung von Virus reduziert.

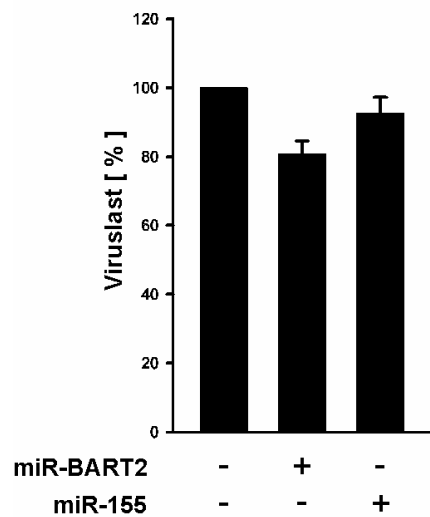


Abbildung 36: Einfluss der ectopischen Expression der miR-BART2 auf die Viruslast im lytischen Zyklus

293EBV-Zellen wurden transfiziert mit p509 zur Expression von BZLF1 in Kombination mit pSG5-miR-BART2 bzw. pSG5-miR-155. Die Viruslast im Überstand der Zellen wurde mit quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Virusmenge der untransfizierten Zellen wurde auf 100% normiert. Überexpression von miR-BART2 im lytischen Zyklus führt zu einer Abnahme der Viruslast von ~20% ($p=0,0039$), während die Kontroll miR-155 nur eine geringe, insignifikante Reduktion der Virusmenge verursacht ($p=0,155$). In der Grafik sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten enthalten unter Angabe des mittleren Fehlers des Mittelwertes.

7. Diskussion

Das Epstein-Barr Virus ist ein Tumovirus, das B-Zellen *in vitro* transformieren kann und an der Entstehung von lymphoproliferativen Tumoren (Burkitt- und Hodgkin-Lymphom) sowie epithelialen Tumoren (Nasopharynxkarzinom) beteiligt ist. In mehreren Publikationen wurden bislang 23 EBV-kodierte miRNA's beschrieben und diverse potenzielle virale und zelluläre Zielgene vorhergesagt (Cai et al., 2006; Grundhoff et al., 2006; Pfeffer et al., 2004). Bei dieser computergestützten Vorhersage wurde für die EBV miR-BART2 die EBV DNA-Polymerase BALF5 als potenzielles Zielgen beschrieben. Da die miR-BART2 vom Gegenstrang des BALF5-Transkripts abgelesen wird, ist sie 100% komplementär zu ihrem Zielgen. Eine Bindung der miRNA sollte demzufolge also zu einer Spaltung der BALF5-mRNA und einer Verringerung der Proteinmenge führen. Die mRNA von BALF5 hat normalerweise eine Größe von 5,1 kB, in B95.8-Zellen lässt sich jedoch eine verkürzte mRNA von 3,7 kB nachweisen. Es wurde vermutet, dass ein viraler Faktor für die Spaltung der mRNA verantwortlich ist (Furnari et al., 1993). Die Position, an der die BALF5-mRNA gespalten wird, entspricht exakt der Bindungsstelle der miR-BART2 (Pfeffer et al., 2004), was darauf hindeutet, dass es sich bei der miR-BART2 um den viralen Faktor handelt, der für die Spaltung verantwortlich ist. Das BALF5 Protein wird ausschließlich im lytischen Zyklus exprimiert und ist als DNA-Polymerase an der Replikation des viralen Genoms beteiligt. Der lytische Zyklus des Epstein-Barr Virus wird ausgelöst durch die Expression der immediate early Gene, insbesondere BZLF1, welches bei Überexpression auch eingesetzt werden kann, um in latent infizierten EBV-positiven B-Zellen oder 293EBV-Zellen den lytischen Zyklus auszulösen. Nach der Expression der sehr frühen Gene wird kaskadenartig die Expression der frühen Gene und der späten Gene ausgelöst. Nachdem der Zyklus angeschaltet wurde, lässt er sich nicht mehr anhalten. Bis heute ist allerdings immer noch weitestgehend ungeklärt, wie der Übergang vom latenten Status einer EBV-infizierten Zelle hin zum Start des lytischen Zyklus reguliert ist und welche Vorgänge und Faktoren für diese Regulation verantwortlich sind. Es wird vermutet, dass bestimmte zellspezifische Faktoren und RNA-vermittelte Hemmmechanismen die Aktivierung der lytischen Genexpression verhindern können, um den latenten Status in den Zellen aufrecht zu erhalten.

Die Entdeckung, dass EBV miRNA's kodiert, für die entsprechende virale Zielgene vorhergesagt wurden (hauptsächlich lytische Gene), könnte ein erstes Anzeichen für eine RNA-vermittelte Regulation der Genexpression im lytischen Zyklus sein. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse liefern dabei erste Hinweise auf die Funktion der miR-BART2 als Regulator des BALF5-Proteins und somit des Übergangs von der Latenz zum lytischen Zyklus.

7.1. Expression der miRNA-Konstrukte

Die Expression der beiden klonierten Konstrukte pSG5-miR-BART2 und pSG5-miR-155 konnte in Northern-Blot Analysen gezeigt werden. Auffällig war hierbei, dass die endogene miR-BART2 nur in sehr geringem Maß in EBV-infizierten BL41-B95.8-Zellen exprimiert war (Abbildung 13). Auch nach ektopischer Expression in HeLa-Zellen war nur eine wenig stärkere Menge detektierbar, allerdings konnte die Vorläufer-RNA der miR-BART2 gezeigt werden. In den Northern Blots, die später zum Nachweis der miR-BART2 unter Einfluss des lytischen Zyklus durchgeführt wurden, zeichnet sich ein ähnliches Bild ab. Die miR-BART2 ist dort ebenfalls in den EBV-positiven Zellen nicht sehr stark exprimiert. Die B95.8-Zellen zeigen eine etwas höhere Menge an miR-BART2 (Abbildung 31). Hier ist zusätzlich auch die Vorläufer-RNA sichtbar. In den beiden Northern Blots wurden unterschiedliche Verfahren zur Sondenmarkierung verwendet. Im ersten Falle (Abbildung 13) die Endmarkierung einer DNA-Sonde und im zweiten Falle (Abbildung 31) die Markierung der Sonde mit radioaktiv markierten UTPs, die über Transkription in die RNA-Sonde eingebaut wurden (miRVana™-Verfahren). Da dieses Verfahren aufgrund der höheren spezifischen Aktivität der Sonde und der stabilen RNA-RNA Interaktion sensitiver ist, könnte es sein, dass deshalb in dem Blot in Abbildung 31 ein etwas deutlicheres Signal der nativen miR-BART2 sichtbar wird, als in Abbildung 13. Neben dem stärkeren Signal wird auch die Vorläufer-RNA nachweisbar. Eine nur geringe Expression ohne Nachweis des Vorläufers der miR-BART2 in BL41-B95.8-Zellen wurde auch schon in der Literatur beschrieben (Pfeffer et al., 2004). Die Expression der miR-BART2 ist auch abhängig vom Latenztyp der Zelle. Die miR-BART2 ist nur in von NPC abgeleiteten Zelllinien, die dem Latenztyp II angehören stark exprimiert,

aber nicht in lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) und in den meisten Burkitt-Lymphom-Zelllinien, die sich im Latenzstadium I und III befinden (Cai et al., 2006).

Die miR-155 lässt sich durch pSG5-miR-155 wesentlich stärker in HeLa-Zellen exprimieren (Abbildung 14), als miR-BART2. Über die Regulation der miRNA Expression ist bislang wenig bekannt, es ist aber denkbar, dass die Sekundärstruktur bzw. die Sequenz des Vorläufermoleküls eine effektive Prozessierung begünstigen bzw. behindern könnte. Die flankierenden Sequenzen (etwa 80 bp stromauf bzw. – abwärts), die bei der Klonierung berücksichtigt wurden, könnten Elemente enthalten, die regulatorisch eingreifen und eine weniger effektive Prozessierung bei der miR-BART2 verursachen. Auch der Anteil an G:U Paarungen trägt hierzu wahrscheinlich bei. In den Northern Blots (Abbildung 13, Abbildung 14) ist der Precursor in großer Menge vorhanden und nur zu einem kleinen Teil zu reifer miRNA prozessiert. Es wäre also möglich, dass die Vorläufer-RNA in einer großen Menge prozessiert wird und quasi als Reservoir für die Prozessierung einer definierten Menge an reifer miRNA dient. Allerdings ist über die Regulation eines solchen Mechanismus bislang nichts bekannt.

7.2. Translationale Repression und Verringerung der BALF5 Proteinmenge durch die miR-BART2

In den Luciferase-Reportergen Experimenten wurde ein inhibitorischer Effekt der ektopisch exprimierten miR-BART2 auf ein Konstrukt, bei dem sich die BALF5-3'UTR mit der entsprechenden Zielsequenz hinter der Luciferase befindet, festgestellt. Die Abnahme der Luciferase-Aktivität von etwa 40% war signifikant und ein solcher Effekt ließ sich bei Verwendung einer Mutante mit deletierter Zielsequenz oder des pGL3-Promoter-Ausgangsvektors nicht nachweisen. Auch eine Ko-Expression der unspezifischen miR-155 hatte keinen reduzierenden Einfluss. Die Translation von BALF5 wurde also nicht vollständig durch die miR-BART2 aufgehoben, was auch hinsichtlich der Proteinmenge beobachtet wurde. In Western Blots konnte bei Überexpression der miR-BART2 im lytischen Zyklus die Proteinmenge von BALF5 um etwa 40% reduziert werden (Abbildung 26). Dies könnte bedeuten, dass die miR-BART2 nicht alleine für die Hemmung der Expression von BALF5 in der Latenz verantwortlich ist, sondern auch noch andere Faktoren beteiligt sind. Auch die

auffällig geringe Expression der miRNA, die in den Zellen nachweisbar ist, deutet darauf hin (Abbildung 13). Es ist denkbar, dass die miR-BART2 hier als Regulator fungiert, indem sie in latenten EBV-Zellen dafür sorgt, dass aberrante BALF5-Transkripte entfernt werden und somit ein Einleiten des lytischen Zyklus verhindert wird. Aber auch eine nur geringe Expression der miRNA bedeutet nicht, dass dies nicht ausreicht um die BALF5-Expression effektiv zu regulieren, weil miRNA's im RISC-Komplex nach der Spaltung von der Zielsequenz wegdissoziieren und eine neue Spaltung vermitteln können (Chen & Meister, 2005).

Neben der Mutante, bei der die komplette Zielsequenz deletiert war, wurde auch noch eine Mutante kloniert, die 2 Basenaustausche in der „Seed-Sequenz“ der miR-BART2 enthielt. Mit dieser sollten ebenfalls Luciferase Experimente durchgeführt werden, allerdings ließ sich die miRNA nicht in Zellen exprimieren und konnte nicht im Northern Blot nachgewiesen werden. Der Grund dafür ist vermutlich eine unkorrekte Prozessierung, weil durch die Mutation in der „Seed-Sequenz“ wahrscheinlich kein Vorläufermolekül mit entsprechender „Stem-Loop“ Struktur gebildet werden konnte. Es ist anzunehmen, dass die Prozessierung zur reifen miRNA eine spezifische Struktur der Vorläufer-RNA voraussetzt, die in diesem Fall nicht gegeben war.

7.3. Spaltung der BALF5-mRNA durch die miR-BART2

Wie oben schon beschrieben besitzt die miR-BART2 eine vollständige Komplementarität zu ihrer Zielsequenz in der 3'UTR der BALF5-mRNA. Dies sollte nicht nur zu einer translationalen Repression sondern sogar zu einer Spaltung und dem Abbau der RNA führen. Aus diesem Grund wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Gunter Meister (Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried) so genannte „RNA Cleavage Assays“ durchgeführt. In diesen Experimenten lässt sich die Spaltung einer definierten Sequenz in einer RNA durch die Bindung einer miRNA nachweisen. In unserem Labor wurden EBV-positive B95.8- bzw. Jijoye-Zellen zur Induktion des lytischen Zyklus mit TPA behandelt und nach 48 h Zellextrakte hergestellt. Als Kontrolle wurde ein Extrakt aus unbehandelten EBV-negativen BJAB-Zellen hergestellt. Mittels Ago2-spezifischer Antikörper wurde im Labor der Arbeitsgruppe Meister das Argonaut Protein Ago2 und somit der gesamte Proteinkomplex RISC, in

dem sich auch die miRNA's befinden, präzipitiert. Durch *in vitro*-Translation wurde eine RNA hergestellt, die am 5'-Ende mit ^{32}P markiert ist und entweder die Zielsequenz der viralen miR-BART2 oder die Zielsequenz der zellulären miR-19b als Kontrolle enthält. Die erhaltenen Präzipitate wurden mit den RNA's inkubiert, die RNA auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. In Abbildung 37 ist das Ergebnis dieses Experimentes zu sehen. Im linken Teil sind die Ergebnisse für miR-BART2, im rechten die Ergebnisse für die Kontroll-miR-19b gezeigt. In BJAB-Zellen war erwartungsgemäß keine Spaltung durch die miR-BART2 zu beobachten (Spur 6). In den beiden EBV-positiven Zelllysaten wird die RNA deutlich gespalten, allerdings wesentlich stärker in den mit TPA behandelten Zellen (Spur 3 & 5) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Spur 2 & 4). Dem gegenüber ist eine Spaltungsaktivität der Kontroll-miR-19b in allen Zelllinien in gleicher Stärke nachweisbar (Spur 9-13).

Daraus lässt sich schließen, dass die virale miR-BART2 nicht nur an die vorhergesagte Zielsequenz in der BALF5-3'UTR bindet und eine translationale Inhibition vermittelt, sondern tatsächlich auch eine Spaltung der mRNA bewirkt. Interessanterweise nimmt diese Spaltungsaktivität nach Auslösen des lytischen Zyklus ab. Die durchgeführten Northern Blot Analysen, bei denen gezeigt wurde, dass die Expression der endogenen miR-BART2 im lytischen Zyklus abnimmt, unterstützen dieses Ergebnis (vgl. Abbildung 31). Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass die miR-BART2 Menge im lytischen Zyklus abnimmt, damit die mRNA von BALF5 nicht gespalten wird und es zu einer Expression der DNA-Polymerase kommen kann.

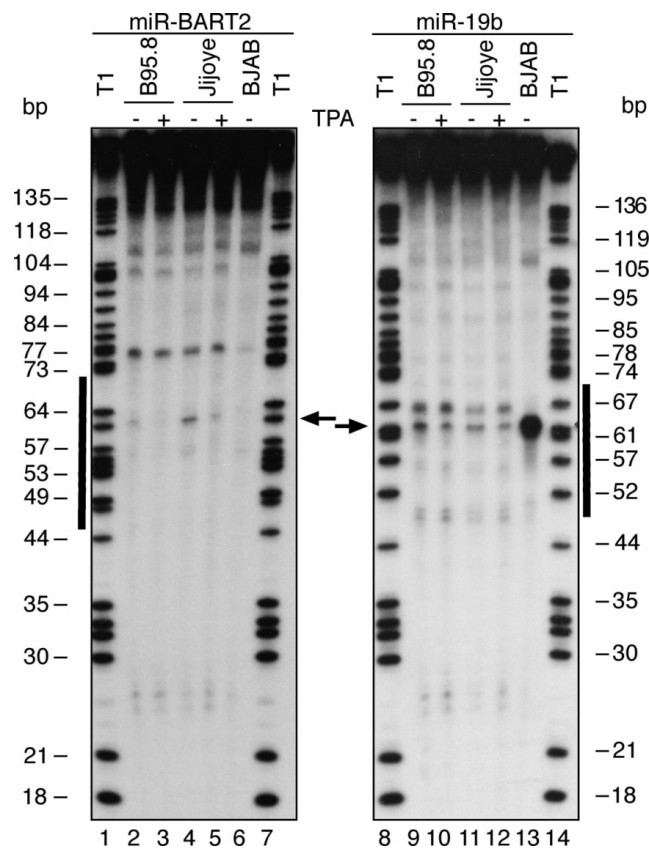


Abbildung 37: Reduktion der Spaltungsaktivität von miR-BART2 im lytischen Zyklus

Aus Zellextrakten von EBV-negativen BJAB-Zellen und EBV-positiven B95.8 bzw. Jijoye Zellen, die zur Induktion des lytischen Zyklus mit TPA behandelt wurden, wurde eine Immunpräzipitation mit Ago2-spezifischen-Antikörper durchgeführt. Nach einer Inkubation der Präzipitate mit *in vitro* translaterter, ^{32}P -Cap markierter RNA, die Sequenzen enthält, die vollständig komplementär zur viralen miR-BART2 (links) bzw. der zellulären miR-19b (rechts) sind, wurde die RNA in einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die radioaktiven Banden auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Als Größenmarker diente ein Verdau des RNA-Substrates mit Nuklease T1 („T1“). Die schwarzen Pfeile zeigen die gesplattene RNA an.

7.4. Spezifische Hemmung der miR-BART2

Zur spezifischen Hemmung der miR-BART2 wurden verschiedene Experimente durchgeführt. In einem ersten Ansatz wurden 2'-O-Methyl-RNA Oligonukleotide eingesetzt. Diese enthalten eine Methylgruppe an der 2'-Position der Ribose, was sie stabiler und weniger toxisch für die Zelle macht (Crooke & Bennett, 1996). Zum Unterbinden der Interaktion der miR-BART2 mit der BALF5-3'UTR wurden 293EBV-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von 2'-O-Methyl-RNA transfiziert und der Effekt auf die BALF5-3'UTR in Luciferase-Experimenten untersucht (siehe auch 6.2).

Als Ergebnis konnte allerdings kein signifikanter Abfall der Luciferase Aktivität bei Ko-Transfektion der Luc-BALF5-3'UTR und der miR-BART2-spezifischen 2'-O-Methyl-RNA ermittelt werden. Auch in Western Blots ließ sich die Proteinmenge von BALF5 durch Transfektion der 2'-O-Methyl-RNA gegen miR-BART2 im lytischen Zyklus nicht erhöhen. Die Gründe dafür sind nicht ganz klar. Manche miRNA's scheinen sich von 2'-O-Methyl-RNA-Oligonukleotiden, trotz ihrer hohen Spezifität, einfach nicht blockieren zu lassen.

Um dennoch die miR-BART2 zu inhibieren, wurden weitere Versuche mit LNA's durchgeführt. In den Experimenten ist zwar eine Abnahme der miR-BART2 Menge zu beobachten, allerdings lässt sich die Proteinexpression durch das Ausschalten der miRNA nicht erhöhen (6.5). In dem Northern Blot in Abbildung 29 ist auch zu erkennen, dass die Scrambled-LNA alleine schon eine Reduktion der miR-BART2-Menge verursacht. In dem LNA-Experiment war es notwendig, den lytischen Zyklus in den 293EBV-Zellen auszulösen, weil nur dann BALF5 auch exprimiert wird. Wie nun in Abbildung 31 zu sehen ist führt alleine das Auslösen des lytischen Zyklus schon zu einem Rückgang der miR-BART2-Menge um etwa 40%. Die Transfektion einer miR-BART2-spezifischen LNA sollte die Restmenge der miR-BART2 wegregulieren und somit zu einer verstärkten Proteinexpression führen, im Vergleich zu der Scrambled-LNA. Allerdings reduziert auch diese die endogene miR-BART2 auf nahezu das gleiche Expressionsniveau, wie die miR-BART2-spezifische LNA. Die miR-BART2 wird also in beiden Fällen durch den lytischen Zyklus und durch die LNA so stark reduziert, dass ein Unterschied in der Proteinmenge nur schwer im Western Blot zu detektieren ist.

Um das Problem mit der Verringerung der miR-BART2 Menge durch die Kontroll-LNA zu lösen, könnten Oligonukleotide mit anderen Sequenzen eingesetzt werden. Es gibt aber auch noch andere Formen stabilisierten Oligonukleotide, die eine Blockierung der miRNA ermöglichen und eventuell besser funktionieren würden. Die „Peptide Nucleic Acids“ (PNA) enthalten ein synthetisches Peptid-Rückgrat, welches die Bindung stabilisiert und vor enzymatischem Abbau der RNA schützt (Elayadi & Corey, 2001; Nielsen, 2000). Bei den Phosphorothioat- (PS-) Oligonukleotiden ist eines der nichtbrückenbildenden Sauerstoffatome durch ein Schwefelatom ersetzt, was ein Angreifen der Endo- und Exonukleasen effektiv verhindert (Dias & Stein, 2002). Außerdem sind noch die Morpholino-Oligonukleotide (MF) verbreitet, bei denen die Ribose durch einen Morpholinrest ersetzt ist (Nasevicius & Ekker, 2000).

Eine andere Möglichkeit der miRNA-Inhibition bieten die „Antagomirs“, kurze einzelsträngige RNA-Moleküle, die zur Stabilisierung der RNA und Verringerung der Zelltoxizität mit Cholesterol konjugiert sind (Krutzfeldt et al., 2005). Das Ausschalten der miRNA durch „Antagomirs“ ist spezifisch, effizient und hält lange an, was sie auch zu einem vielversprechenden Therapeutika machen könnte, um beispielsweise onkogene miRNA durch entsprechende Medikamente zu blockieren. Da virale miRNA's vermutlich auch zur Etablierung und Aufrechterhaltung einer Infektion beitragen, wäre es in Zukunft vielleicht auch möglich „Antagomirs“ zu entwickeln, die spezifisch virale miRNA's blockieren und somit als Virus-Therapeutika in Frage kämen.

7.5. Einfluss des lytischen Zyklus auf die Expression der miR-BART2

In Northern Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass die Menge an miR-BART2 in EBV-positiven Zellen nach Auslösen des lytischen Zyklus abnimmt (Abbildung 31). Dieses Ergebnis und die Abnahme der BALF5 Proteinmenge bei Überexpression von miR-BART2 im lytischen Zyklus stützen die Hypothese der regulatorischen Beteiligung der EBV-kodierten miR-BART2 bei der Aufrechterhaltung der Latenz in EBV-infizierten Zellen. In der Tat wurde auch in einem weiteren Northern Blot gezeigt, dass die Expression der EBV-miR-BART1 nach Induktion des lytischen Zyklus in EBV-positiven Zellen reduziert wird (Abbildung 33) und somit auch an der Regulation des viralen Lebenszyklus beteiligt sein könnte. Bei anderen Herpesviren wurden ebenfalls regulatorische Funktionen der von ihnen kodierten miRNA's und des viralen Lebenszyklus vermutet. Das Kaposi Sarkom assoziierte Herpesvirus (Humanes Herpes Virus 8, KSHV/HHV8) kodiert für 11 miRNA's, von denen eine, die miRNA K12-10 ihren Ursprung im ORF des Kapsin-Gens hat, welches für die Transformation von Zellen verantwortlich ist. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Prozessierung der miRNA die Translation der Kapsin mRNA reduziert (Cai et al., 2005; Pfeffer et al., 2005).

In weiteren Luciferase-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Induktion des lytischen Zyklus zu einer verminderten Repression („De-Repression“) der Luc-BALF5-3'UTR führt (Abbildung 34). Dies ist auf die verringerte miR-BART2 Menge,

die in den Northern Blots nach Auslösen des lytischen Zyklus deutlich nachweisbar war, zurückzuführen.

In einem weiteren Northern Blot wurde die Expression der zellulären miRNA-155 nach Auslösen des lytischen Zyklus untersucht. Dieser Blot diente als Kontrolle um zu zeigen, dass der reduzierende Effekt der EBV-miRNA's spezifisch ist. Es wurde ein Anstieg der miRNA-155 nach TPA-Induktion in allen Zelllinien beobachtet. Insbesondere in B95.8-Zellen war dieser Anstieg enorm (Abbildung 32). Die miR-155 wird aus der, nicht für Protein kodierenden, *BIC*-RNA prozessiert (Eis et al., 2005). Die *BIC*-RNA ist in normalen lymphoiden Geweben nur schwach, aber in Hodgkin-Lymphomen und in Burkitt-Lymphomen bei Kindern sowie in *in vitro*-aktivierten B- und T-Zellen sehr stark exprimiert (Haasch et al., 2002; Metzler et al., 2004; van den Berg et al., 2003). Eine Konsequenz dieser erhöhten Expression der *BIC*-RNA in Lymphomen ist auch eine erhöhte Expression der miR-155. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von Zellen mit Lipopolysacchariden (LPS) zu einer verstärkten Expression von miR-155 führt (Tili et al., 2007). Auch eine Transformation von primären B-Lymphozyten durch EBV führt zu einem starken Anstieg der miR-155 (Mrazek et al., 2007). Wir konnten außerdem zeigen, dass die Infektion von Burkitt-Lymphom Zellen mit EBV zu einer Induktion von miR-155 führt (Motsch et al., 2007). Die miR-155 steht noch in einem anderen Zusammenhang mit Herpesviren. Es wurde kürzlich beschrieben, dass die „Seed-Sequenz“ von miR-155 komplett homolog zu der miR-K12-11 von KSHV ist, was zu der Hypothese führt, dass beide miRNA's wahrscheinlich in der Lage sind, die gleichen Zielgene zu regulieren und somit eine gemeinsame biologische Funktion erfüllen (Skalsky et al., 2007).

Aber auch für andere zelluläre miRNA's kann ein Effekt auf die Expression durch EBV-Infektion gezeigt werden (Mrazek et al., 2007). So wird beispielsweise die humane miR-146a sehr stark in EBV infizierten B95.8-Zellen gefunden. Diese miRNA ist auch in einer Reihe von Tumoren stark exprimiert und spielt eine Rolle bei der angeborenen Immunität (Taganov et al., 2007). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das von EBV kodierte, latente Membranprotein LMP1 in der Lage ist, die Expression von miR-146a über den Faktor NF- κ B zu induzieren (Motsch et al., 2007). Daraus lässt sich folgern, dass das Virus über eine Interaktion mit der zellulären miR-146a möglicherweise die Immunantwort beeinflussen könnte, um so eine Latenz in den Zellen zu etablieren.

7.6. Viruslast

Das Epstein-Barr Virus repliziert sein Genom im lytischen Zyklus mit Hilfe verschiedener Proteine. Ein Schlüsselprotein stellt die EBV DNA Polymerase BALF5 sowie ihr akzessorisches Protein BRF1 dar. Eine Reduktion der BALF5-Menge durch Überexpression der miR-BART2 führte in 293EBV-Zellen zu einer verringerten Virusneuproduktion nach Induktion des lytischen Zyklus (Abbildung 36).

Zur Bestimmung der Viruslast in Überständen aus 293EBV-Zellen wurden quantitative Real-Time-PCR Experimente durchgeführt. Der Überstand von 293EBV-Zellen, in denen durch BZLF1-Expression der lytische Zyklus induziert wurde, zeigte eine Verdoppelung der Virusneuproduktion im Vergleich zu Virusüberstand aus uninduzierten Zellen. Hier wäre ein deutlich höherer Anstieg um etwa das 10-fache zu erwarten gewesen und es ist unklar, warum nur dieser relativ geringe Anstieg der Virusproduktion zu beobachten war.

Außer der quantitativen Real-Time-PCR wurde noch eine andere Methode, die Virusneuproduktion in 293EBV Zellen zu bestimmen, getestet. Aus dem Überstand von 293EBV Zellen wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt und Raji-Zellen mit diesen Verdünnungen infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen im FACS untersucht. Mit rekombinanten EBV infizierte Zellen werden im FACS messbar, da sie das Fluoreszenzprotein EGFP exprimieren, das in dem EBV-Plasmid der 293EBV Zellen kodiert ist. Aus der Anzahl der EGFP-positiven Zellen kann auf die Viruslast zurückgeschlossen werden. Diese Methode lieferte allerdings auch nur eine etwa 2-fache Steigerung der Viruslast nach Induktion des lytischen Zyklus und führte bei Überexpression der miR-BART2 ebenfalls nur zu einer Abnahme der Viruslast um ca. 20%.

Der nur geringe Effekt der miR-BART2 auf die Virusneuproduktion lässt sich darauf zurückführen, dass sie sicherlich nicht alleine für die Regulation der Replikation des EBV-Genoms verantwortlich ist. BALF5 stellt die katalytische Untereinheit der EBV DNA-Polymerase dar und ist zusammen mit der akzessorischen Untereinheit BRF1 und einem Helicase/Primase-Komplex, bestehend aus den Proteinen BBLF4, BSLF1, BBLF2/3 und BALF2 für die Replikation im lytischen Zyklus zuständig (Fujii et al., 2000). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass BALF5 alleine schon als Polymerase wirken kann ohne Interaktion mit BRF1 (Tsurumi et al., 1993). Möglicherweise kann BRF1 alleine bzw. zusammen mit anderen viralen Proteinen

die Funktion der Polymerase übernehmen, vielleicht sogar durch Rekrutierung von zellulären Faktoren. Außerdem ist der Übergang in den lytischen Zyklus ein sehr komplexer Vorgang, der noch nicht vollends aufgeklärt ist, und an dem eine ganze Reihe von Proteinen beteiligt ist. Auch Wirtszellfaktoren spielen hierbei sehr wahrscheinlich eine Rolle. In den durchgeführten Experimenten wurde nur die miR-BART2 überexprimiert. Es könnte sein, dass noch andere EBV-miRNA's, insbesondere solche, die lytische Proteine als potenzielle Zielgene haben, oder womöglich sogar zelluläre miRNA's in der Regulation des viralen Lebenszyklus eine Rolle spielen. Hier kommen beispielsweise zelluläre miRNA's in Frage, die durch eine EBV-Infektion in der Expression hochreguliert werden, wie beispielsweise miR-21, miR-146a und miR-155 (Mrazek et al., 2007).

7.7. Bedeutung der EBV-miRNA's für das Virus

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen die Frage auf, welchen Stellenwert die EBV-kodierten miRNA's für das Virus haben. Ein Punkt, der für eine wesentliche Bedeutung der EBV miRNA's spricht, ist in der evolutionären Konservierung zu finden. Das Rhesus Lymphokryptovirus (rLCV) ist ein in Primaten persistierendes Virus, welches sich vor mehr als 13 Mio. Jahren von EBV abgespalten hat (Gerner et al., 2004; Rivaller et al., 2002). Auch bei diesem wurden mittlerweile 21 miRNA's beschrieben, die ebenfalls in 2 Clustern, den *BHRF1*- und *BART*-Genclustern, vorliegen (Cai et al., 2006). Einige dieser miRNA's weisen eine auffällige Konservierung hinsichtlich der EBV-miRNA's auf. Außerdem findet man die EBV miRNA's stark in latenten Zellen exprimiert. Die starke Konservierung der miRNA's, die ausgeprägte Expression in latenten Zellen und die Daten der vorliegenden Arbeit bezüglich der Regulation der BALF5-Expression durch die miR-BART2 stützen die Hypothese, dass ihnen eine eminente Rolle im viralen Lebenszyklus bei der Regulation des Übergangs von der Latenz in den lytischen Zyklus zukommen könnte. Es gibt Beispiele in der Literatur, die ebenfalls einen entsprechenden Zusammenhang von Virus-kodierten miRNA's mit dem eigenen viralen Lebenszyklus herstellen. Das Marek's Disease Virus (MDV) ist ein Herpesvirus, das Hühner befällt und aggressive T-Zell Lymphome verursacht. Es kodiert für 8 miRNA's, die in latent infizierten, vom Virus transformierten Zellen sehr stark exprimiert werden. Drei dieser

miRNA's sind antisense zum viruseigenen „sehr frühen“ („immediate early“) Gen ICP4, welches für die Regulation der Transkription durch die RNA-Polymerase II verantwortlich ist (Smith et al., 1993). Die Expression aller acht miRNA's konnte in MDV infizierten LCL's und MDV-induzierten Tumoren nachgewiesen werden. Diese führen in den Zellen wahrscheinlich zu einer translationalen Inhibition des ICP4-Proteins. Dadurch wird die RNA-Polymerase in ihrer Funktion gestört, es kann keine Transkription mehr stattfinden und der Eintritt in den lytischen Zyklus ist unterbunden (Burnside et al., 2006)

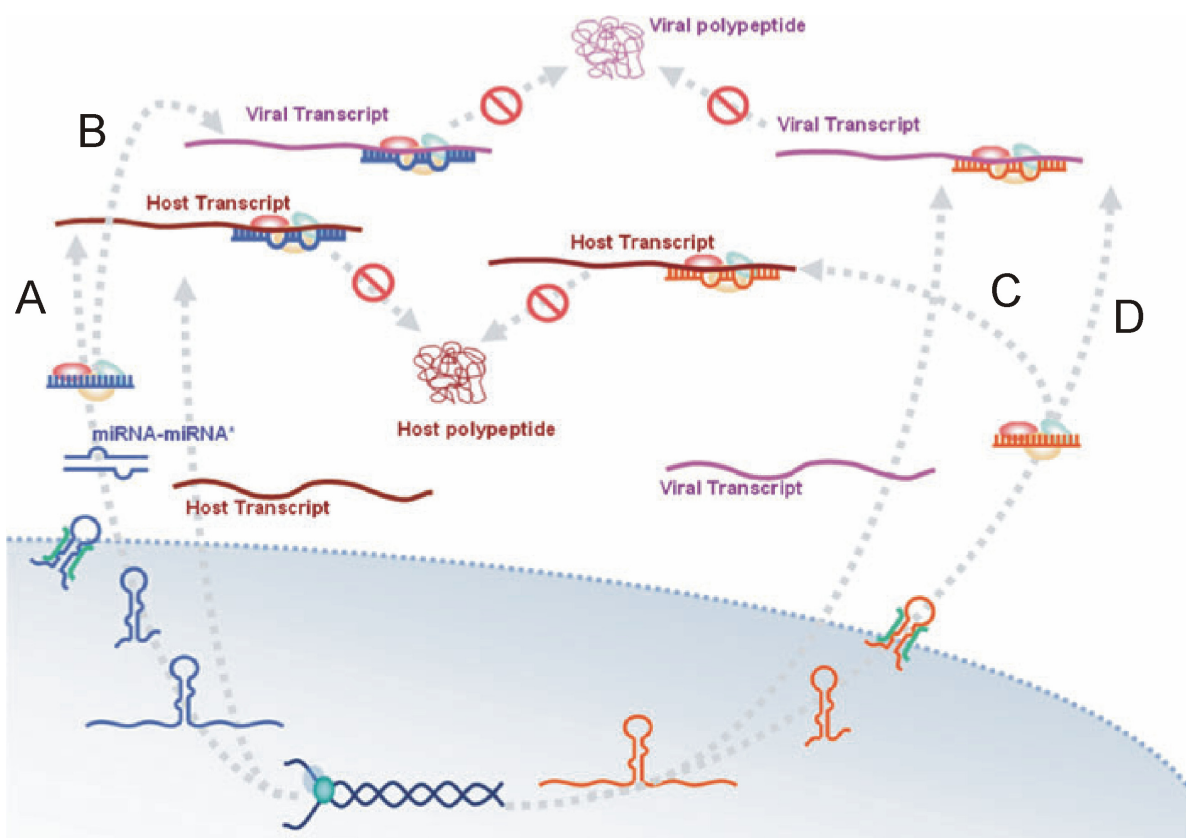


Abbildung 38: miRNA-vermittelte Wirt-/Virus-Interaktionen

Gezeigt sind 4 verschiedene Modelle der Interaktion zwischen zellulären/viralen Transkripten und miRNA's. Zelluläre Transkripte (dunkelrot) können als Ziel eigener zellulärer (A) oder viraler (C) miRNA's fungieren und eine translationale Repression auslösen (z.B. bei miRNA's von HSV-1 und EBV). Umgekehrt werden virale Transkripte (violett) durch zelluläre (B) oder virale (D) miRNA's translational reprimiert (z.B. humane miRNA's, die das *nef*-Transkript von HIV als Ziel haben). Virale miRNA's sind in rot dargestellt, zelluläre in blau (modifiziert nach (Scaria et al., 2007))

Es gibt aber nicht nur direkte Interaktionen der viralen miRNA's auf virale Zielgene, sondern auch eine Einflussnahme von viralen miRNA's auf Wirtsgene oder Interaktionen von miRNA's der Wirtszelle mit viralen Zielgenen. Eine Zusammenfassung der möglichen Virus-Wirt Interaktionen ist in Abbildung 38 schematisch dargestellt. Für das Hepatitis-C-Virus (HCV) konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein Blockieren der Leberzellspezifischen humanen miR-122 zu einer Abnahme der autonomen Replikation von HCV-RNA führt (Jopling et al., 2005). Bemerkenswerterweise bindet die miR-122 nicht an die 3'-, sondern an die 5'-UTR der viralen RNA und führt nicht zu einer Hemmung, sondern zu einer Aktivierung der Replikation der viralen RNA. Eine Inhibition der miR-122 könnte also ein potenzielles antivirales Werkzeug sein, um ein Ausbreiten von HCV in Leberzellen zu verhindern. Wie schon erwähnt, wurden auch für die EBV-miRNA's nicht nur potenzielle virale, sondern auch eine Reihe an zellulären Zielgenen, die an Apoptose, Zellproliferation, Transkriptionskontrolle, Immunantwort und Signaltransduktion beteiligt sind, *in silico*, vorhergesagt (Pfeffer et al., 2004). Zu diesen gehören prominente Vertreter, wie das Tumorsuppressorprotein p53, ein potenzielles Zielgen von miR-BHRF1-1, der Apoptose Regulator BCL-2 als Zielgen von miR-BART1 oder die Phosphatidylinositol 3-Kinase regulatorische Alpha-Untereinheit (PIK3-R1). Diese Vielfalt an möglichen Zielgenen lässt die Annahme zu, dass die EBV miRNA's die Tumorentstehung durch eine Inhibition von essenziellen zellulären Signalwegen, die die Apoptose oder eine adäquate Immunantwort vermitteln, fördern.

In unserer Arbeitsgruppe wurde beispielsweise versucht den Einfluss der miR-BHRF1-1 auf das potenzielle Zielgen p53 zu untersuchen. Es ließ sich dabei allerdings keine Reduktion von p53 auf RNA- bzw. Proteinebene zeigen. Das Tumorsuppressorprotein p53 ist in sehr viele zelluläre Prozesse involviert und es wäre deshalb möglich, dass die miRNA wiederum durch andere Faktoren blockiert oder sogar abgebaut wird. Es ist auch vorstellbar, dass die Bindung von miR-BHRF1-1 und p53 nicht adäquat für die translationale Inhibition durch die miRNA ist und erst gar keine Bindung und auch keine Stilllegung stattfindet. Da die computergestützte Vorhersage der Zielgene auf vorgegebenen Algorithmen beruht, ist damit zu rechnen, dass nicht alle Ergebnisse die nativen Vorgänge in der Zelle widerspiegeln. Insbesondere die konservierte „Seed-Sequenz“ wird durch Computerprogramme besonders berücksichtigt und eine perfekte Basenpaarung als Voraussetzung für die miRNA-Funktion angenommen. Dass dies nicht unbedingt so sein muss, zeigten

Didiano und Hobert bei der miRNA Isy-6, die von *C. elegans* kodiert wird. Sie fanden heraus, dass zum einen auch G:U-Paarungen („Wobbles“) bei der Bindung von Isy-6 an ihr Zielgen *cog-1* toleriert werden, und dass zu einer Repression von *cog-1* zwar die Bindung an die „Seed-Sequenz“ benötigt wird, aber trotzdem die ganze Zielsequenzbindung vorhanden sein muss (Didiano & Hobert, 2006).

Viren stellen einen der Hauptfaktoren dar, der zur Proliferation und Malignität von Zellen führen kann. Etwa 15% der Krebserkrankungen beim Menschen sind mit Virusinfektionen assoziiert (Humane Papillomaviren (HPV), Hepatitis-B und -C Virus (HBV, HCV), Humane Herpesviren (EBV, HHV8)). Viren besitzen unterschiedliche Strategien, die Wirtszelle zu ihren Gunsten zu verändern. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass auch die von Viren kodierten miRNA's in nicht unerheblichem Maße zu diesen Modifikationen beitragen. Es gibt auch schon erste Hinweise, dass viral kodierte miRNA's in Zusammenhang mit Onkogenese stehen (Pfeffer & Voinnet, 2006). Neben EBV ist das Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV) ein weiterer prominenter Vertreter der tumorigenen Herpesviren. Es kodiert in seinem Genom 12 miRNA's, die in einem 5kb großen Cluster lokalisiert sind, in dem auch das Kaposin-Gen liegt, welches das Kaposin Protein K12 exprimiert, das zur Transformation von Zellen befähigt ist (Cai & Cullen, 2006; Grundhoff et al., 2006; Pfeffer et al., 2005; Samols et al., 2005). Alle 12 miRNA's werden von einem Promotor als Primärtranskript synthetisiert und später zu den reifen miRNA's prozessiert (Pearce et al., 2005). Es wäre möglich, dass die miRNA's auf die Expression der verschiedenen Isoformen des Kaposin-Proteins eingreifen und so als Modulatoren der Tumorentstehung durch KSHV dienen.

Dass miRNA's tatsächlich in der Lage sind in die Tumorentstehung einzugreifen, hat man bei zellulären miRNA's schon zeigen können. Interessanterweise liegen mehr als 50% der Gene, die für miRNA's kodieren, in Regionen des Genoms, die mit Krebsentstehung assoziiert werden bzw. instabil sind (Calin et al., 2004). Es ist vorstellbar, dass Änderungen in der miRNA-Expression zu einer Modulation der Expression von Proteinen, die an Zellproliferation oder Überlebensprozessen beteiligt sind, führen und so die Tumorentstehung begünstigen. Aber es wurden auch miRNA's beschrieben, die direkt als Onkogen bzw. Tumorsuppressor wirken können (Esquela-Kerscher & Slack, 2006). Diese sogenannten „Oncomirs“ sind in verschiedenen Tumoren sehr stark exprimiert und liegen in genomischen Regionen, die in Krebszellen oftmals deletiert, verändert oder mutiert sind. Beispielsweise findet

man die humane miRNA miR-21 in verschiedenen Tumoren, wie Brustkrebs (Iorio et al., 2005; Si et al., 2007), Glioblastoma (Chan et al., 2005) und Pankreaskrebs (Lee et al., 2007; Roldo et al., 2006) sehr stark überexprimiert. Eine Stilllegung der miR-21 durch Transfektion von Antisense-Oligonukleotiden in Brustkrebs- oder Glioblastomazellen führt zu einer reduzierten Proliferationsrate der Zellen und einem Anstieg der Apoptose (Chan et al., 2005; Si et al., 2007). Auch bei den onkogenen miRNA's ist auffällig, dass diese oftmals in Clustern organisiert im Genom vorliegen. Der genomische Locus 13q21 ist bekannt dafür, dass er oftmals bei hämatologischen Tumoren, z.B. B-Zell Lymphome, aber auch bei soliden Tumoren verändert vorliegt. In dieser Region wird das miR17-92-Polycistron kodiert, das sechs miRNA's enthält, die mit Onkogenese in Zusammenhang gebracht werden (He et al., 2005). Die vorhandenen Daten zu zellulären miRNA's lassen also vermuten, dass auch virale miRNA's, insbesondere von Tumoviren wie EBV, an der Entstehung von Krebs beteiligt sein könnten.

Viren haben durch miRNA's vermutlich einen großen Vorteil. Sie können mit ihrer Hilfe zelluläre Prozesse regulieren, ohne dass vorher ein Protein synthetisiert werden muss. Beispielsweise kodiert das α -Herpesvirus Herpes-Simplex-Virus-1 (HSV-1) für die miRNA miR-LAT (Latency Associated Transcript), welche antiapoptotisch wirkt um die latente Infektion aufrecht zu erhalten (Cui et al., 2006; Gupta et al., 2006). Dazu inhibiert die miR-LAT die mRNA des transformierenden Wachstumsfaktors β (TGF β) und des SMAD3, die beide Apoptose in infizierten Zellen über den TGF β -Signalweg induzieren. Die Expression des Wirtsgens kann also direkt über die miRNA ohne Expression eines viralen Proteins gesteuert werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass Nukleinsäuren nicht immunogen sind, d. h. sie werden vom Immunsystem nicht erkannt und das Virus kann mit ihrer Hilfe „unentdeckt“ in zelluläre Vorgänge eingreifen. Ein Beispiel, wie das Virus durch miRNA Expression versucht dem Immunsystem zu entgehen, findet sich beim Simian Virus 40 (SV40), das zu den Polyomaviren zählt. Die viruskodierten miRNA's werden zu späten Zeiten der Virusinfektion exprimiert und binden an frühe virale Transkripte, die als Tumor- (T-) Antigene wirken, und spalten diese. Dadurch wird die Expression der T-Zell Antigene reduziert und das Virus entgeht der Erkennung durch die cytotoxischen T-Zellen (Sullivan et al., 2005).

Die genannten Beispiele zeigen die verschiedenartigen Möglichkeiten auf, wie ein Virus von der Expression von eigenen oder zellulären miRNA's profitieren kann.

Auch für EBV haben die eigens kodierten miRNA's vermutlich mehr Bedeutung, als nur die Steuerung des viralen Lebenszyklus.

7.8. Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten bieten zwar schon einen ersten Einblick, wie der Lebenszyklus des Epstein-Barr Virus durch die eigenen miRNA's, in diesem Falle miR-BART2 beeinflusst werden könnte. Allerdings sind die nachgewiesenen Effekte, z.B. bei der Reduktion der Proteinmenge von BALF5 und bei der Virusneuproduktion unter Einfluss der miR-BART2 teilweise nur gering. Dies liegt sehr wahrscheinlich auch daran, dass hier nur eine von 23 bislang entdeckten EBV-miRNA's untersucht wurde und wahrscheinlich auch andere noch zur Regulation des viralen Lebenszyklus gebraucht werden. Um dies nachzuweisen, müssen weitere Experimente durchgeführt werden, bei denen mehrere EBV-miRNA's gleichzeitig und auch in verschiedenen Kombinationen überexprimiert werden. Eine weitere Schwierigkeit stellte das Inhibieren der miR-BART2 mit Hilfe von LNA-Oligonukleotiden bzw. mit 2'-O-Methyl RNA Molekülen dar. In zusätzlichen Experimenten könnten noch weitere synthetische Anti-miRNA Oligonukleotide getestet werden, aber die effektivste Möglichkeit dieses Problem zu lösen wäre, eine 293-Zelllinie herzustellen, die stabil mit einem rekombinanten EBV-Plasmid infiziert ist, das eine Deletion der miR-BART2 bzw. anderer EBV-miRNA's aufweist, sodass diese gar nicht exprimiert werden.

Eine weitere Möglichkeit miRNA's zu hemmen bietet das Protein P19, das aus einem Pflanzenvirus isoliert wurde (Dunoyer et al., 2004). Es hemmt die Prozessierung der Vorläufermoleküle zu miRNA's bzw. siRNA's. Durch die Expression dieses Proteins in EBV-positiven Zellen könnten die EBV-miRNA's blockiert werden und die Einflüsse auf z.B. Proteinexpression und Viruslast untersucht werden. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass es sich um eine unspezifische Hemmung handelt, bei der auch die zellulären miRNA's entfernt werden. Dies könnte möglicherweise auch noch zu ganz anderen Veränderungen in der Zelle führen, die nicht mehr dem „Normalzustand“ entsprechen und eventuell keine aussagekräftigen Ergebnisse liefern.

Es ist zu erwarten, dass noch weitere EBV-miRNA's entdeckt werden. Interessant wäre hierbei auch, wie es sich mit den beiden nicht kodierenden EBER-RNA's verhält. Denkbar wäre, dass diese auch regulatorische Funktionen übernehmen und so dem Virus einen Nutzen bringen. Außerdem wird vermutet, dass diese onkogenes Potenzial haben und an der virusvermittelten Tumorentstehung beteiligt sind. Ähnliche kurze, doppelsträngige RNA Moleküle findet man auch beim Adenovirus, die sogenannten Virus-Assoziierten- (VA-) RNA's. Diese weisen eine ähnliche Struktur, wie Vorläufer-miRNA's auf und werden auch über Exportin 5 aus dem Zellkern ausgeschleust. Sie binden an das Ago 2-Protein und führen zu einer Inhibition von Reportergenen mit komplementären Sequenzen (Aparicio et al., 2006). Somit scheinen die VA-RNA's des Adenovirus gleiche Funktionen wie miRNA's auszuüben und es wäre möglich, dass gleiches für die EBER-RNA's von EBV gilt. In weiteren Projekten könnte der Einfluss der EBV-miRNA's auf vorausgesagte zelluläre Zielgene untersucht werden. Es ist nicht auszuschließen, dass auch EBV die miRNA's für regulative Prozesse in der Wirtszelle verwendet, da sie direkt und ohne aufwändige Proteinexpression und ohne immunogen zu sein, in das Geschehen in der Zelle eingreifen können.

8. Literaturverzeichnis

- Abrahante, J.E., Daul, A.L., Li, M., Volk, M.L., Tennessen, J.M., Miller, E.A. and Rougvie, A.E.** (2003), 'The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs', *Dev Cell*, 4, 5, 625-37.
- Aiyar, A., Tyree, C. and Sugden, B.** (1998), 'The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element', *Embo J*, 17, 21, 6394-403.
- Alvarez-Garcia, I. and Miska, E.A.** (2005), 'MicroRNA functions in animal development and human disease', *Development*, 132, 21, 4653-62.
- Ambros, V.** (2003), 'MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing', *Cell*, 113, 6, 673-6.
- Ambros, V., Lee, R.C., Lavanway, A., Williams, P.T. and Jewell, D.** (2003), 'MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*', *Curr Biol*, 13, 10, 807-18.
- Aparicio, O., Razquin, N., Zaratiegui, M., Narvaiza, I. and Fortes, P.** (2006), 'Adenovirus virus-associated RNA is processed to functional interfering RNAs involved in virus production', *J Virol*, 80, 3, 1376-84.
- Aravin, A.A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J. and Tuschl, T.** (2003), 'The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development', *Dev Cell*, 5, 2, 337-50.
- Babcock, G.J., Decker, L.L., Volk, M. and Thorley-Lawson, D.A.** (1998), 'EBV persistence in memory B cells in vivo', *Immunity*, 9, 3, 395-404.
- Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Seguin, C. and et al.** (1984), 'DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome', *Nature*, 310, 5974, 207-11.
- Bangsow, C., Rubins, N., Glusman, G., Bernstein, Y., Negreanu, V., Goldenberg, D., Lotem, J., Ben-Asher, E., Lancet, D., Levanon, D. and Groner, Y.** (2001), 'The *RUNX3* gene--sequence, structure and regulated expression', *Gene*, 279, 2, 221-32.
- Bartel, D.P.** (2004), 'MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function', *Cell*, 116, 2, 281-97.
- Bashirullah, A., Pasquinelli, A.E., Kiger, A.A., Perrimon, N., Ruvkun, G. and Thummel, C.S.** (2003), 'Coordinate regulation of small temporal RNAs at the onset of *Drosophila* metamorphosis', *Dev Biol*, 259, 1, 1-8.
- Baskerville, S. and Bartel, D.P.** (2005), 'Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes', *Rna*, 11, 3, 241-7.

- Basyuk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonne, R. and Bertrand, E.** (2003), 'Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products', *Nucleic Acids Res*, 31, 22, 6593-7.
- Bauer, G., Hofler, P. and Zur Hausen, H.** (1982), 'Epstein-Barr virus induction by a serum factor. I. Induction and cooperation with additional inducers', *Virology*, 121, 1, 184-94.
- Beisel, C., Tanner, J., Matsuo, T., Thorley-Lawson, D., Kezdy, F. and Kieff, E.** (1985), 'Two major outer envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus are encoded by the same gene', *J Virol*, 54, 3, 665-74.
- Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979), 'A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA', *Nucleic Acids Res*, 7, 6, 1513-23.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. and Gorlich, D.** (2004), 'Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs', *Rna*, 10, 2, 185-91.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P., Betlach, C. Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.K.H. and Falkow, S.** (1977), 'Construction and characterization of new cloning vesicles II. A multipurpose cloning system.' *Gene*, 2, 95-101.
- Bornkamm, G.W. and Hammerschmidt, W.** (2001), 'Molecular virology of Epstein-Barr virus', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356, 1408, 437-59.
- Bornkamm, G.W., Hudewentz, J., Freese, U.K. and Zimmer, U.** (1982), 'Deletion of the nontransforming Epstein-Barr virus strain P3HR-1 causes fusion of the large internal repeat to the DSL region', *J Virol*, 43, 3, 952-68.
- Burkitt, D.** (1958), 'A sarcoma involving the jaws in African children', *Br J Surg*, 46, 197, 218-23.
- Burnside, J., Bernberg, E., Anderson, A., Lu, C., Meyers, B.C., Green, P.J., Jain, N., Isaacs, G. and Morgan, R.W.** (2006), 'Marek's disease virus encodes MicroRNAs that map to meq and the latency-associated transcript', *J Virol*, 80, 17, 8778-86.
- Cai, X. and Cullen, B.R.** (2006), 'Transcriptional origin of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNAs', *J Virol*, 80, 5, 2234-42.
- Cai, X., Lu, S., Zhang, Z., Gonzalez, C.M., Damania, B. and Cullen, B.R.** (2005), 'Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 15, 5570-5.
- Cai, X., Schafer, A., Lu, S., Bilello, J.P., Desrosiers, R.C., Edwards, R., Raab-Traub, N. and Cullen, B.R.** (2006), 'Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed', *PLoS Pathog*, 2, 3, e23.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. and Croce, C.M.** (2004),

- 'Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 9, 2999-3004.
- Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q. and Hannon, G.J.** (2002), 'The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis', *Genes Dev*, 16, 21, 2733-42.
- Castoldi, M., Schmidt, S., Benes, V., Noerholm, M., Kulozik, A.E., Hentze, M.W. and Muckenthaler, M.U.** (2006), 'A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA)', *Rna*, 12, 5, 913-20.
- Cerutti, L., Mian, N. and Bateman, A.** (2000), 'Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain', *Trends Biochem Sci*, 25, 10, 481-2.
- Chaconas, G., van de Sande, J.H.** (1980), 'Labelling of RNA and DNA restriction fragments.' *Enzymol.*, 65, 75-85.
- Chan, J.A., Krichevsky, A.M. and Kosik, K.S.** (2005), 'MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells', *Cancer Res*, 65, 14, 6029-33.
- Chen, H.L., Lung, M.M., Sham, J.S., Choy, D.T., Griffin, B.E. and Ng, M.H.** (1992), 'Transcription of BamHI-A region of the EBV genome in NPC tissues and B cells', *Virology*, 191, 1, 193-201.
- Chen, P.Y. and Meister, G.** (2005), 'microRNA-guided posttranscriptional gene regulation', *Biol Chem*, 386, 12, 1205-18.
- Coller, J. and Parker, R.** (2005), 'General translational repression by activators of mRNA decapping', *Cell*, 122, 6, 875-86.
- Crooke, S.T. and Bennett, C.F.** (1996), 'Progress in antisense oligonucleotide therapeutics', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36, 107-29.
- Cui, C., Griffiths, A., Li, G., Silva, L.M., Kramer, M.F., Gaasterland, T., Wang, X.J. and Coen, D.M.** (2006), 'Prediction and identification of herpes simplex virus 1-encoded microRNAs', *J Virol*, 80, 11, 5499-508.
- Cullen, B.R.** (2004), 'Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs', *Virus Res*, 102, 1, 3-9.
- Cullen, B.R.** (2006), 'Viruses and microRNAs', *Nat Genet*, 38 Suppl, S25-30.
- Delecluse, H.J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R. and Hammerschmidt, W.** (1998), 'Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 14, 8245-50.
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F. and Hannon, G.J.** (2004), 'Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex', *Nature*, 432, 7014, 231-5.

- Dias, N. and Stein, C.A.** (2002), 'Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms', *Mol Cancer Ther*, 1, 5, 347-55.
- Didiano, D. and Hobert, O.** (2006), 'Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions', *Nat Struct Mol Biol*, 13, 9, 849-51.
- Dostie, J., Mourelatos, Z., Yang, M., Sharma, A. and Dreyfuss, G.** (2003), 'Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs', *Rna*, 9, 2, 180-6.
- DuBridg, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. and Calos, M.P.** (1987), 'Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system', *Mol Cell Biol*, 7, 1, 379-87.
- Dugaiczyk, A., Boyer, H.W., Goodman, H.M.** (1975), 'Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures.' *J. Mol. Biol.*, 96, 171-84.
- Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C. and Voinnet, O.** (2004), 'Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing', *Plant Cell*, 16, 5, 1235-50.
- Eis, P.S., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, M.F., Lund, E. and Dahlberg, J.E.** (2005), 'Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 10, 3627-32.
- Elayadi, A.N. and Corey, D.R.** (2001), 'Application of PNA and LNA oligomers to chemotherapy', *Curr Opin Investig Drugs*, 2, 4, 558-61.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T.** (2001), 'Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate', *Embo J*, 20, 23, 6877-88.
- Enright, A.J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C. and Marks, D.S.** (2003), 'MicroRNA targets in *Drosophila*', *Genome Biol*, 5, 1, R1.
- Epstein, M.A., Achong, B.G. and Barr, Y.M.** (1964), 'Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma', *Lancet*, 15, 702-3.
- Epstein, M.A., Achong, B.G., Barr, Y.M., Zajac, B., Henle, G. and Henle, W.** (1966), 'Morphological and virological investigations on cultured Burkitt tumor lymphoblasts (strain Raji)', *J Natl Cancer Inst*, 37, 4, 547-59.
- Esquela-Kerscher, A. and Slack, F.J.** (2006), 'Oncomirs - microRNAs with a role in cancer', *Nat Rev Cancer*, 6, 4, 259-69.
- Faggioni, A., Zompetta, C., Grimaldi, S., Barile, G., Frati, L. and Lazdins, J.** (1986), 'Calcium modulation activates Epstein-Barr virus genome in latently infected cells', *Science*, 232, 4757, 1554-6.
- Fahraeus, R., Fu, H.L., Ernberg, I., Finke, J., Rowe, M., Klein, G., Falk, K., Nilsson, E., Yadav, M., Busson, P. and et al.** (1988), 'Expression of Epstein-

- Barr virus-encoded proteins in nasopharyngeal carcinoma', *Int J Cancer*, 42, 3, 329-38.
- Feederle, R., Kost, M., Baumann, M., Janz, A., Drouet, E., Hammerschmidt, W. and Delecluse, H.J.** (2000), 'The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators', *Embo J*, 19, 12, 3080-9.
- Fixman, E.D., Hayward, G.S. and Hayward, S.D.** (1992), 'trans-acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori-Lyt', *J Virol*, 66, 8, 5030-9.
- Fixman, E.D., Hayward, G.S. and Hayward, S.D.** (1995), 'Replication of Epstein-Barr virus oriLyt: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays', *J Virol*, 69, 5, 2998-3006.
- Flemington, E.K., Goldfeld, A.E. and Speck, S.H.** (1991), 'Efficient transcription of the Epstein-Barr virus immediate-early BZLF1 and BRLF1 genes requires protein synthesis', *J Virol*, 65, 12, 7073-7.
- Fujii, K., Yokoyama, N., Kiyono, T., Kuzushima, K., Homma, M., Nishiyama, Y., Fujita, M. and Tsurumi, T.** (2000), 'The Epstein-Barr virus pol catalytic subunit physically interacts with the BBLF4-BSLF1-BBLF2/3 complex', *J Virol*, 74, 6, 2550-7.
- Furnari, F.B., Adams, M.D. and Pagano, J.S.** (1993), 'Unconventional processing of the 3' termini of the Epstein-Barr virus DNA polymerase mRNA', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 2, 378-82.
- Gerber, P., Lucas, S., Nonoyama, M., Perlin, E. and Goldstein, L.I.** (1972), 'Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis', *Lancet*, 2, 7785, 988-9.
- Gergely, L., Klein, G. and Ernberg, I.** (1971), 'Host cell macromolecular synthesis in cells containing EBV-induced early antigens, studied by combined immunofluorescence and radioautography', *Virology*, 45, 1, 22-9.
- Gerner, C.S., Dolan, A. and McGeoch, D.J.** (2004), 'Phylogenetic relationships in the Lymphocryptovirus genus of the Gammaherpesvirinae', *Virus Res*, 99, 2, 187-92.
- Gilligan, K.J., Rajadurai, P., Lin, J.C., Busson, P., Abdel-Hamid, M., Prasad, U., Tursz, T. and Raab-Traub, N.** (1991), 'Expression of the Epstein-Barr virus BamHI A fragment in nasopharyngeal carcinoma: evidence for a viral protein expressed in vivo', *J Virol*, 65, 11, 6252-9.
- Golden, H.D., Chang, R.S., Prescott, W., Simpson, E. and Cooper, T.Y.** (1973), 'Leukocyte-transforming agent: prolonged excretion by patients with mononucleosis and excretion by normal individuals', *J Infect Dis*, 127, 4, 471-3.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R.** (1977), 'Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5', *J Gen Virol*, 36, 1, 59-74.

- Gratama, J.W., Oosterveer, M.A., Zwaan, F.E., Lepoutre, J., Klein, G. and Ernberg, I.** (1988), 'Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 22, 8693-6.
- Greenspan, J.S., Greenspan, D., Lennette, E.T., Abrams, D.I., Conant, M.A., Petersen, V. and Freese, U.K.** (1985), 'Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion', *N Engl J Med*, 313, 25, 1564-71.
- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. and Shiekhattar, R.** (2004), 'The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs', *Nature*, 432, 7014, 235-40.
- Grundhoff, A., Sullivan, C.S. and Ganem, D.** (2006), 'A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses', *Rna*, 12, 5, 733-50.
- Gupta, A., Gartner, J.J., Sethupathy, P., Hatzigeorgiou, A.G. and Fraser, N.W.** (2006), 'Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript', *Nature*, 442, 7098, 82-5.
- Haasch, D., Chen, Y.W., Reilly, R.M., Chiou, X.G., Koterski, S., Smith, M.L., Kroeger, P., McWeeny, K., Halbert, D.N., Mollison, K.W., Djuric, S.W. and Trevillyan, J.M.** (2002), 'T cell activation induces a noncoding RNA transcript sensitive to inhibition by immunosuppressant drugs and encoded by the proto-oncogene, BIC', *Cell Immunol*, 217, 1-2, 78-86.
- Hammerschmidt, W. and Sugden, B.** (1988), 'Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus', *Cell*, 55, 3, 427-33.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H. and Kim, V.N.** (2004), 'The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing', *Genes Dev*, 18, 24, 3016-27.
- He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J. and Hammond, S.M.** (2005), 'A microRNA polycistron as a potential human oncogene', *Nature*, 435, 7043, 828-33.
- Henderson, A., Ripley, S., Heller, M. and Kieff, E.** (1983), 'Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 7, 1987-91.
- Henle, G., Henle, W. and Diehl, V.** (1968), 'Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 59, 1, 94-101.
- Henle, W., Diehl, V., Kohn, G., Zur Hausen, H. and Henle, G.** (1967), 'Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells', *Science*, 157, 792, 1064-5.

- Hinuma, Y., Konn, M., Yamaguchi, J., Wudarski, D.J., Blakeslee, J.R., Jr. and Grace, J.T., Jr.** (1967), 'Immunofluorescence and herpes-type virus particles in the P3HR-1 Burkitt lymphoma cell line', *J Virol*, 1, 5, 1045-51.
- Hitt, M.M., Allday, M.J., Hara, T., Karran, L., Jones, M.D., Busson, P., Tursz, T., Ernberg, I. and Griffin, B.E.** (1989), 'EBV gene expression in an NPC-related tumour', *Embo J*, 8, 9, 2639-51.
- Houbaviy, H.B., Murray, M.F. and Sharp, P.A.** (2003), 'Embryonic stem cell-specific MicroRNAs', *Dev Cell*, 5, 2, 351-8.
- Hudewentz, J., Delius, H., Freese, U.K., Zimmer, U. and Bornkamm, G.W.** (1982), 'Two distant regions of the Epstein-Barr virus genome with sequence homologies have the same orientation and involve small tandem repeats', *Embo J*, 1, 1, 21-6.
- Hutvagner, G. and Zamore, P.D.** (2002), 'A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex', *Science*, 297, 5589, 2056-60.
- Ibrahim, A.I., Obeid, M.T., Jouma, M.J., Moasis, G.A., Al-Richane, W.L., Kindermann, I., Boehm, M., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N. and Gartner, B.C.** (2005), 'Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in atherosclerotic plaques and in unaffected bypass grafts', *J Clin Virol*, 32, 1, 29-32.
- Iorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Menard, S., Palazzo, J.P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G.A., Querzoli, P., Negrini, M. and Croce, C.M.** (2005), 'MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer', *Cancer Res*, 65, 16, 7065-70.
- Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M. and Sarnow, P.** (2005), 'Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA', *Science*, 309, 5740, 1577-81.
- Kasashima, K., Nakamura, Y. and Kozu, T.** (2004), 'Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 322, 2, 403-10.
- Kauppinen, S., Vester, B. and Wengel, J.** (2006), 'Locked nucleic acid: high-affinity targeting of complementary RNA for RNomics', *Handb Exp Pharmacol*, 173, 405-22.
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S.D.** (2003), 'Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias', *Cell*, 115, 2, 209-16.
- Kieff, E.** (1996), 'Epstein-Barr Virus and its replication', in Fields, B., Knipe, D. and Howley, P. (eds.), *Fields Virology*, Philadelphia, Lippincott-Raven.
- Kintner, C.R. and Sugden, B.** (1979), 'The structure of the termini of the DNA of Epstein-Barr virus', *Cell*, 17, 3, 661-71.

- Klein, G., Lindahl, T., Jondal, M., Leibold, W., Menezes, J., Nilsson, K. and Sundstrom, C.** (1974), 'Continuous lymphoid cell lines with characteristics of B cells (bone-marrow-derived), lacking the Epstein-Barr virus genome and derived from three human lymphomas', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 8, 3283-6.
- Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M. and Stoffel, M.** (2005), 'Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'', *Nature*, 438, 7068, 685-9.
- Kushner, S.** (1978), 'An improved method for transformation of *Escherichia coli* with coli-derived plasmids.' *Genetic Engineering*, ed. Boyer, Nicosia, Amsterdam, Elsevier.
- Laemmli, U.K.** (1970), 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227, 259, 680-5.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T.** (2001), 'Identification of novel genes coding for small expressed RNAs', *Science*, 294, 5543, 853-8.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A. and Tuschl, T.** (2003), 'New microRNAs from mouse and human', *Rna*, 9, 2, 175-9.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. and Tuschl, T.** (2002), 'Identification of tissue-specific microRNAs from mouse', *Curr Biol*, 12, 9, 735-9.
- Lai, E.C.** (2002), 'Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation', *Nat Genet*, 30, 4, 363-4.
- Lai, E.C., Tomancak, P., Williams, R.W. and Rubin, G.M.** (2003), 'Computational identification of Drosophila microRNA genes', *Genome Biol*, 4, 7, R42.
- Landthaler, M., Yalcin, A. and Tuschl, T.** (2004), 'The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis', *Curr Biol*, 14, 23, 2162-7.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. and Bartel, D.P.** (2001), 'An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*', *Science*, 294, 5543, 858-62.
- Lederberg, E.M. and Cohen, S.N.** (1974), 'Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid', *J Bacteriol*, 119, 3, 1072-4.
- Lee, E.J., Gusev, Y., Jiang, J., Nuovo, G.J., Lerner, M.R., Frankel, W.L., Morgan, D.L., Postier, R.G., Brackett, D.J. and Schmittgen, T.D.** (2007), 'Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer', *Int J Cancer*, 120, 5, 1046-54.
- Lee, R.C. and Ambros, V.** (2001), 'An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*', *Science*, 294, 5543, 862-4.

- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. and Kim, V.N.** (2003), 'The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing', *Nature*, 425, 6956, 415-9.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S. and Kim, V.N.** (2002), 'MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization', *Embo J*, 21, 17, 4663-70.
- Lenoir, G.M., Vuillaume, M. and Bonnardel, C.** (1985), 'The use of lymphomatous and lymphoblastoid cell lines in the study of Burkitt's lymphoma', *IARC Sci Publ*, 60, 309-18.
- Lewis, B.P., Burge, C.B. and Bartel, D.P.** (2005), 'Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets', *Cell*, 120, 1, 15-20.
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Burge, C.B.** (2003), 'Prediction of mammalian microRNA targets', *Cell*, 115, 7, 787-98.
- Lim, L.P., Glasner, M.E., Yekta, S., Burge, C.B. and Bartel, D.P.** (2003a), 'Vertebrate microRNA genes', *Science*, 299, 5612, 1540.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Weinstein, E.G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M.W., Burge, C.B. and Bartel, D.P.** (2003b), 'The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*', *Genes Dev*, 17, 8, 991-1008.
- Lin, S.L., Chang, D., Wu, D.Y. and Ying, S.Y.** (2003), 'A novel RNA splicing-mediated gene silencing mechanism potential for genome evolution', *Biochem Biophys Res Commun*, 310, 3, 754-60.
- Lindahl, T., Adams, A., Bjursell, G., Bornkamm, G.W., Kaschka-Dierich, C. and Jehn, U.** (1976), 'Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line', *J Mol Biol*, 102, 3, 511-30.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. and Sattler, M.** (2004), 'Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain', *Nat Struct Mol Biol*, 11, 6, 576-7.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. and Hannon, G.J.** (2004), 'Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi', *Science*, 305, 5689, 1437-41.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J. and Parker, R.** (2005), 'MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies', *Nat Cell Biol*, 7, 7, 719-23.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E. and Kutay, U.** (2004), 'Nuclear export of microRNA precursors', *Science*, 303, 5654, 95-8.
- Ma, J.B., Ye, K. and Patel, D.J.** (2004), 'Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain', *Nature*, 429, 6989, 318-22.
- Ma, J.B., Yuan, Y.R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T. and Patel, D.J.** (2005), 'Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein', *Nature*, 434, 7033, 666-70.

- Maniatis, T., Sambrook J. and Fritsch E.F.** (1989), *Molecular Cloning, a laboratory manual 2nd ed.*, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 1-3.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. and Tuschl, T.** (2004), 'Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs', *Mol Cell*, 15, 2, 185-97.
- Meister, G. and Tuschl, T.** (2004), 'Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA', *Nature*, 431, 7006, 343-9.
- Metzler, M., Wilda, M., Busch, K., Viehmann, S. and Borkhardt, A.** (2004), 'High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma', *Genes Chromosomes Cancer*, 39, 2, 167-9.
- Miller, G. and Lipman, M.** (1973), 'Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70, 1, 190-4.
- Miyashita, E.M., Yang, B., Babcock, G.J. and Thorley-Lawson, D.A.** (1997), 'Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell', *J Virol*, 71, 7, 4882-91.
- Miyashita, E.M., Yang, B., Lam, K.M., Crawford, D.H. and Thorley-Lawson, D.A.** (1995), 'A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo', *Cell*, 80, 4, 593-601.
- Morgan, D.G., Niederman, J.C., Miller, G., Smith, H.W. and Dowaliby, J.M.** (1979), 'Site of Epstein-Barr virus replication in the oropharynx', *Lancet*, 2, 8153, 1154-7.
- Motsch, N., Pfuhl, T., Mrazek, J., Barth, S. and Grässer, F.A.** (2007), 'Epstein-Barr Virus-Encoded Latent Membrane Protein 1 (LMP1) induces the Expression of the cellular MicroRNA miR-146a', *RNA Biology*, 4, 3, Online.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G.** (2002), 'miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs', *Genes Dev*, 16, 6, 720-8.
- Mrazek, J., Kreutmayer, S.B., Grasser, F.A., Polacek, N. and Huttenhofer, A.** (2007), 'Subtractive hybridization identifies novel differentially expressed ncRNA species in EBV-infected human B cells', *Nucleic Acids Res*, 35, 10, e73.
- Nasevicius, A. and Ekker, S.C.** (2000), 'Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish', *Nat Genet*, 26, 2, 216-20.
- Niedobitek, G., Agathangelou, A., Herbst, H., Whitehead, L., Wright, D.H. and Young, L.S.** (1997), 'Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells', *J Pathol*, 182, 2, 151-9.
- Nielsen, P.E.** (2000), 'Peptide nucleic acids: on the road to new gene therapeutic drugs', *Pharmacol Toxicol*, 86, 1, 3-7.

- Olsen, P.H. and Ambros, V.** (1999), 'The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation', *Dev Biol*, 216, 2, 671-80.
- Omoto, S. and Fujii, Y.R.** (2006), 'Cloning and detection of HIV-1-encoded microRNA', *Methods Mol Biol*, 342, 255-65.
- Parker, J.S., Roe, S.M. and Barford, D.** (2004), 'Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity', *Embo J*, 23, 24, 4727-37.
- Parker, J.S., Roe, S.M. and Barford, D.** (2005), 'Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex', *Nature*, 434, 7033, 663-6.
- Pasquinelli, A.E.** (2002), 'MicroRNAs: deviants no longer', *Trends Genet*, 18, 4, 171-3.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degan, B., Muller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerly, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E. and Ruvkun, G.** (2000), 'Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA', *Nature*, 408, 6808, 86-9.
- Pearce, M., Matsumura, S. and Wilson, A.C.** (2005), 'Transcripts encoding K12, v-FLIP, v-cyclin, and the microRNA cluster of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus originate from a common promoter', *J Virol*, 79, 22, 14457-64.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., Randall, G., Lindenbach, B.D., Rice, C.M., Simon, V., Ho, D.D., Zavolan, M. and Tuschl, T.** (2005), 'Identification of microRNAs of the herpesvirus family', *Nat Methods*, 2, 4, 269-76.
- Pfeffer, S. and Voinnet, O.** (2006), 'Viruses, microRNAs and cancer', *Oncogene*, 25, 46, 6211-9.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C. and Tuschl, T.** (2004), 'Identification of virus-encoded microRNAs', *Science*, 304, 5671, 734-6.
- Pope, J.H., Horne, M.K. and Scott, W.** (1968), 'Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus', *Int J Cancer*, 3, 6, 857-66.
- Raab-Traub, N., Hood, R., Yang, C.S., Henry, B., 2nd and Pagano, J.S.** (1983), 'Epstein-Barr virus transcription in nasopharyngeal carcinoma', *J Virol*, 48, 3, 580-90.
- Rawlins, D.R., Milman, G., Hayward, S.D. and Hayward, G.S.** (1985), 'Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region', *Cell*, 42, 3, 859-68.

- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G.** (2000), 'The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*', *Nature*, 403, 6772, 901-6.
- Rickinson, A.B. and Kieff, E.** (1996), 'Epstein-Barr Virus', in Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology*, Philadelphia, Lippincott-Raven.
- Rickinson, A.B., Young, L.S. and Rowe, M.** (1987), 'Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells', *J Virol*, 61, 5, 1310-7.
- Rivailler, P., Jiang, H., Cho, Y.G., Quink, C. and Wang, F.** (2002), 'Complete nucleotide sequence of the rhesus lymphocryptovirus: genetic validation for an Epstein-Barr virus animal model', *J Virol*, 76, 1, 421-6.
- Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L.** (2005), 'Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC', *Nat Struct Mol Biol*, 12, 4, 340-9.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L. and Bradley, A.** (2004), 'Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units', *Genome Res*, 14, 10A, 1902-10.
- Roldo, C., Missiaglia, E., Hagan, J.P., Falconi, M., Capelli, P., Bersani, S., Calin, G.A., Volinia, S., Liu, C.G., Scarpa, A. and Croce, C.M.** (2006), 'MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior', *J Clin Oncol*, 24, 29, 4677-84.
- Rowe, D.T. and Clarke, J.R.** (1989), 'The type-specific epitopes of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 are near the carboxy terminus of the protein', *J Gen Virol*, 70 (Pt 5), 1217-29.
- Rowe, M., Evans, H.S., Young, L.S., Hennessy, K., Kieff, E. and Rickinson, A.B.** (1987), 'Monoclonal antibodies to the latent membrane protein of Epstein-Barr virus reveal heterogeneity of the protein and inducible expression in virus-transformed cells', *J Gen Virol*, 68, Pt 6, 1575-86.
- Samols, M.A., Hu, J., Skalsky, R.L. and Renne, R.** (2005), 'Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus', *J Virol*, 79, 14, 9301-5.
- Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E. and Rickinson, A.** (1990), 'Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes', *J Virol*, 64, 9, 4084-92.
- Sauder, C., Muller, A., Cubitt, B., Mayer, J., Steinmetz, J., Trabert, W., Ziegler, B., Wanke, K., Mueller-Lantsch, N., de la Torre, J.C. and Grasser, F.A.** (1996), 'Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and BDV RNA in psychiatric patients: evidence for high sequence conservation of human blood-derived BDV RNA', *J Virol*, 70, 11, 7713-24.

- Scaria, V., Hariharan, M., Pillai, B., Maiti, S. and Brahmachari, S.K.** (2007), 'Host-virus genome interactions: macro roles for microRNAs', *Cell Microbiol.*
- Schepers, A., Pich, D., Mankertz, J. and Hammerschmidt, W.** (1993), 'cis-acting elements in the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus', *J Virol*, 67, 7, 4237-45.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T. and Gey, G.O.** (1953), 'Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix', *J Exp Med*, 97, 5, 695-710.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D.** (2003), 'Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex', *Cell*, 115, 2, 199-208.
- Seggerson, K., Tang, L. and Moss, E.G.** (2002), 'Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation', *Dev Biol*, 243, 2, 215-25.
- Sen, G.L. and Blau, H.M.** (2005), 'Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies', *Nat Cell Biol*, 7, 6, 633-6.
- Sgaramella, V., Van de Sande, J.H. and Khorana, H.G.** (1970), 'Studies on polynucleotides. C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 67, 3, 1468-75.
- Si, M.L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F. and Mo, Y.Y.** (2007), 'miR-21-mediated tumor growth', *Oncogene*, 26, 19, 2799-803.
- Sixbey, J.W., Nedrud, J.G., Raab-Traub, N., Hanes, R.A. and Pagano, J.S.** (1984), 'Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells', *N Engl J Med*, 310, 19, 1225-30.
- Skalsky, R.L., Samols, M.A., Plaisance, K.B., Boss, I.W., Riva, A., Lopez, M.C., Baker, H.V. and Renne, R.** (2007), 'Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus Encodes an Ortholog of miR-155', *J Virol*.
- Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G.** (2000), 'The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the *LIN-29* transcription factor', *Mol Cell*, 5, 4, 659-69.
- Smalheiser, N.R. and Torvik, V.I.** (2005), 'Mammalian microRNAs derived from genomic repeats', *Trends Genet*, 21, 6, 322-6.
- Smith, C.A., Bates, P., Rivera-Gonzalez, R., Gu, B. and DeLuca, N.A.** (1993), 'ICP4, the major transcriptional regulatory protein of herpes simplex virus type 1, forms a tripartite complex with TATA-binding protein and TFIIB', *J Virol*, 67, 8, 4676-87.
- Song, J.J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L.** (2003), 'The crystal structure of the

- Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes', *Nat Struct Biol*, 10, 12, 1026-32.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L.** (2004), 'Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity', *Science*, 305, 5689, 1434-7.
- Stark, A., Brennecke, J., Russell, R.B. and Cohen, S.M.** (2003), 'Identification of Drosophila MicroRNA targets', *PLoS Biol*, 1, 3, E60.
- Sullivan, C.S., Grundhoff, A.T., Tevethia, S., Pipas, J.M. and Ganem, D.** (2005), 'SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells', *Nature*, 435, 7042, 682-6.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P. and Baltimore, D.** (2007), 'MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field', *Immunity*, 26, 2, 133-7.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.J. and Baltimore, D.** (2006), 'NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 33, 12481-6.
- Tili, E., Michaille, J.J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C.D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C.G., Calin, G.A. and Croce, C.M.** (2007), 'Modulation of miR-155 and miR-125b Levels following Lipopolysaccharide/TNF- α Stimulation and Their Possible Roles in Regulating the Response to Endotoxin Shock', *J Immunol*, 179, 8, 5082-9.
- Trivedi, P., Masucci, M.G., Winberg, G. and Klein, G.** (1991), 'The Epstein-Barr virus-encoded membrane protein LMP but not the nuclear antigen EBNA-1 induces rejection of transfected murine mammary carcinoma cells', *Int J Cancer*, 48, 5, 794-800.
- Tsurumi, T., Daikoku, T., Kurachi, R. and Nishiyama, Y.** (1993), 'Functional interaction between Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and its accessory subunit in vitro', *J Virol*, 67, 12, 7648-53.
- van den Berg, A., Kroesen, B.J., Kooistra, K., de Jong, D., Briggs, J., Blokzijl, T., Jacobs, S., Kluiver, J., Diepstra, A., Maggio, E. and Poppema, S.** (2003), 'High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma', *Genes Chromosomes Cancer*, 37, 1, 20-8.
- Wightman, B., Burglin, T.R., Gatto, J., Arasu, P. and Ruvkun, G.** (1991), 'Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development', *Genes Dev*, 5, 10, 1813-24.
- Wu, L., Fan, J. and Belasco, J.G.** (2006), 'MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 11, 4034-9.
- Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L. and Zhou, M.M.** (2003), 'Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain', *Nature*, 426, 6965, 468-74.

- Yates, J., Warren, N., Reisman, D. and Sugden, B.** (1984), 'A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 12, 3806-10.
- Young, L.S., Dawson, C.W., Clark, D., Rupani, H., Busson, P., Tursz, T., Johnson, A. and Rickinson, A.B.** (1988), 'Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma', *J Gen Virol*, 69 (Pt 5), 1051-65.
- Yuan, Y.R., Pei, Y., Ma, J.B., Kuryavyi, V., Zhadina, M., Meister, G., Chen, H.Y., Dauter, Z., Tuschl, T. and Patel, D.J.** (2005), 'Crystal structure of A. aeolicus argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage', *Mol Cell*, 19, 3, 405-19.
- Zalani, S., Holley-Guthrie, E. and Kenney, S.** (1995), 'The Zif268 cellular transcription factor activates expression of the Epstein-Barr virus immediate-early BRLF1 promoter', *J Virol*, 69, 6, 3816-23.
- Zeng, Y. and Cullen, B.R.** (2003), 'Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells', *Rna*, 9, 1, 112-23.
- Zeng, Y. and Cullen, B.R.** (2004), 'Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5', *Nucleic Acids Res*, 32, 16, 4776-85.
- Zeng, Y. and Cullen, B.R.** (2005), 'Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences', *J Biol Chem*, 280, 30, 27595-603.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E. and Filipowicz, W.** (2004), 'Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III', *Cell*, 118, 1, 57-68.
- Zimber, U., Adldinger, H.K., Lenoir, G.M., Vuillaume, M., Knebel Doeberitz, M.V., Laux, G., Desgranges, C., Wittmann, P., Freese, U.K., Schneider, U. and et al.** (1986), 'Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus', *Virology*, 154, 1, 56-66.
- zur Hausen, H., O'Neill, F.J., Freese, U.K. and Hecker, E.** (1978), 'Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA', *Nature*, 272, 5651, 373-5.

9. Anhang

Die Experimente zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt.

9.1. Vorträge und Poster

Teile dieser Arbeit und anderer Projekte wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

03/2005 Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Hannover (Poster)

09/2005 Saar-Lor-Lux Workshop on Virus Research, Luxemburg (Vortrag)

03/2006 Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München (Poster)

05/2006 International Conference „AIDS, Cancer and Public Health“,
St. Petersburg, Russland (Vortrag)

07/2006 International EBV Symposium, Boston, USA (Poster)

09/2006 Saar-Lor-Lux Workshop on Virus Research, Nancy, Frankreich (Vortrag)

03/2007 EBV Meeting, Heidelberg (Vortrag)

09/2007 European Virology Conference, Nürnberg (Vortrag)

9.2. Publikationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit und anderer bearbeiteter Projekte wurde in folgenden Publikationen veröffentlicht bzw. sind zur Veröffentlichung vorgesehen:

Pfuhl, T., Durr, M., Spurr, A., Schwalbert, B., Nord, R., Mysliwietz, J., Kremmer, E. and Grässer, F.A. (2005), 'Biochemical characterisation of the proteins encoded by the DiGeorge critical region 6 (DGCR6) genes', *Hum Genet*, 117, 1, 70-80.

Hennard, C., Pfuhl, T., Buettner, M., Becker, K.F., Knofel, T., Middeldorp, J., Kremmer, E., Niedobitek, G. and Grässer, F. (2006), 'The antibody 2B4 directed against the Epstein-Barr virus (EBV)-encoded nuclear antigen 1 (EBNA1) detects MAGE-4: implications for studies on the EBV association of human cancers', *J Pathol*, 209, 4, 430-5.

Motsch, N., Pfuhl, T., Mrazek, J., Barth, S. and Grässer, F.A. (2007), 'Epstein-Barr Virus-Encoded Latent Membrane Protein 1 (LMP1) induces the Expression of the cellular MicroRNA miR-146a', *RNA Biology*, 4, 3, Online access.

Barth, S*, Pfuhl, T*, Mamiani, A., Ehses, C., Roemer, K., Kremmer, E., Jäker, C., Höck, J., Meister, G. and Grässer, F.A. (2007), 'Epstein-Barr Virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5', *Nucleic Acids Res*, in press; *Joint Co-Authors

Pfuhl, T., Mamiani, A., Dürr, M., Stieber, J., Ankara, J., Liss, M., Dobner, T., Schmitt, A., Falkai, P., Kremmer, E., Barth, S. and Grässer, F.A., 'Expression of the human LARK/RBM4 proteins in human and mammalian tissues', zur Veröffentlichung eingereicht.

9.3. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Friedrich A. Grässer danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, sein Vertrauen, seine stete Diskussionsbereitschaft, die gute Betreuung und die Möglichkeit die Ergebnisse auf verschiedenen internationalen Kongressen vorzustellen.

Herrn Prof. Dr. Klaus Römer möchte ich für seine Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Nikolaus Müller-Lantzsch für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Unterstützung während meiner Arbeit.

Frau Dr. Elisabeth Kremmer vom Institut für molekulare Immunologie der GSF München danke ich für die Übernahme der Herstellung der monoklonalen Antikörper

Ein ganz herzlicher Dank geht an Frau Dr. Stephanie Barth für ihre Hilfsbereitschaft, Motivation und die Vermittlung vieler Arbeitsmethoden und biologischer Sichtweisen.

Mein weiterer Dank gilt Frau Ruth Nord für ihre Hilfsbereitschaft bei Problemen mit verschiedenen Arbeitsmethoden, insbesondere aus der Mikrobiologie.

Bei meinen Arbeitskollegen Frau Dipl. Biologin Natalie Motsch und Herrn Dipl. Biologe Alfredo Mamiani bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und für das sehr gute Arbeitsklima.

Im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Grässer habe ich die veterinärmedizinische Doktorarbeit von Frau Claudia Ehses betreut. Ergebnisse ihrer Arbeit lieferten wichtige Beiträge zu diesem Projekt und wurden teilweise in die vorliegende Arbeit integriert. Ich möchte mich bei ihr für ihren Einsatz und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Allen Mitarbeitern der Virologie danke ich herzlich für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich immerwährend unterstützt haben.

Von ganzem Herzen möchte ich Thomas Winter danken, der mich insbesondere währen des Schreibens der Arbeit immer wieder aufgebaut hat.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Thorsten Pfuhl, Dipl. Biologe

Anschrift: Schiffweilerstr. 28
66557 Illingen
Telefon: 06825-48103
E-Mail: th.pfuhl@googlemail.com

Geburtsdatum und -ort: 27.11.1977, Illingen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1984 – 1988 Grundschule Hüttigweiler
1988 – 1990 Hauptschule Hüttigweiler
1990 – 1994 Kreisrealschule Ottweiler
1994 – 1997 Illtal Gymnasium Illingen
Abschluss: Abitur

Zivildienst:

9/1997 - 9/1998 Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz,
Rettungswache Illingen

Studium:

10/1998 - 4/2004 Universität des Saarlandes, Studienfach Biologie
Thema der Diplomarbeit: „Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen das DiGeorge Critical Region 6 Protein (DGCR6)“.
Abschluss: Diplom-Biologe

Seit 4/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit unter Anleitung von Prof. Dr. F.A. Grässer und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Homburg, Dezember 2007

Thorsten Pfuhl