

**Experimente zur Regulation der Epstein Barr Virus (EBV) DNA-
Polymerase BALF5 durch die EBV-kodierte mikroRNA BART2**

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades eines
Dr. med.vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Claudia Ehse

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. T. Rümenapf

Prof. Dr. F. Grässer

Tag der Disputation: 27. Februar 2008

Aus dem Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. T. Rümenapf

und dem

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Professur für Virologie, Homburg/Saar

Betreuer: Prof. Dr. F. Grässer

Experimente zur Regulation der Epstein Barr Virus (EBV) DNA-Polymerase BALF5 durch die EBV-kodierte mikroRNA BART2

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines

Dr. med.vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Claudia Ehses

Tierärztin aus Saarbrücken

Gießen (2008)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Epstein-Barr Virus (EBV).....	1
1.1.1 EBV-Infektionen	3
1.1.1.1 Infektiöse Mononukleose (IM, Pfeiffersches Drüsenfieber, students' kissing disease)	5
1.1.1.2 Burkitt-Lymphom (BL)	5
1.1.1.3 Das Hodgkin Lymphom („Hodgkin`s Disease“, HD, Morbus Hodgkin)	6
1.1.1.4 Das Nasopharyngelkarzinom	7
1.1.1.4 EBV-assoziierte Erkrankungen Immundefizienter	8
1.1.1.4 T-Zell-Lymphome	8
1.1.1.5 Orale Haarleukoplakie (OHL)	9
1.1.2 EBV- Genom	9
1.1.3 Replikationszyklus	11
1.1.3.1 Lytische Infektion	12
1.1.3.2 Latente Infektion	13
1.2 Mikro RNAs	14
1.2.1 Allgemeine Einleitung	14
1.2.2 Entdeckung	14
1.2.3 Genomische Organisation und Expression	16
1.2.4 Biogenese	17
1.2.5 Mechanismus	21
1.2.6 Funktion	22
1.2.7 EBV-kodierte miRNAs und potentielle Zielgene	23
1.3 Zielsetzung der Arbeit	30
2 MATERIAL	31
2.1 Chemikalien, Membranen, Filter	31
2.2 Puffer und Lösungen	32
2.3 Enzyme	35
2.4 Größen- und Molekulargewichtsmarker	36

2.4.1 DNA-Größenmarker.....	36
2.4.2 Protein-Molekulargewichtsmarker	36
2.4.3 ¹⁴ C- Proteinmarker	36
2.5 Antikörper	37
2.5.1 Primärantikörper.....	37
2.5.2 Sekundärantikörper	37
2.6 Zelllinien	37
2.7 Bakterienstämme	38
2.8 Nähr- und Kulturmedien	38
2.8.1 Nährmedien für Bakterien	38
2.8.2 Kulturmedien für Säugerzellen.....	39
2.9 Vektoren	39
2.9.1 pGem TM -T Vektor	39
2.9.2 pSG5 Vektor.....	40
2.9.3 pEGFP-C1 Vektor	41
2.9.4 Der Vektor „pGL3-Promotor“.....	42
2.9.5 Effektorplasmide	43
2.10 Synthetische Oligonukleotide	44
2.11 BALF5-Peptidsequenz	44
2.12 Computersoftware.....	45
3 METHODEN	46
3.1 Methoden bakterieller Zellkultur.....	46
3.1.1 Aufzucht und Lagerung von Bakterien	46
3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien.....	46
3.1.3 Transformation kompetenter Bakterien	48
3.1.4 Blue/White Screening.....	48
3.2 Methoden eukaryoter Zellkultur.....	49
3.2.1 Kultur von B-Zellen in Suspension	49
3.2.2 Kultur von Monolayerzellen	50
3.2.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	50
3.2.3.1 Transfektion von Suspensionszellen mit dem AMAXA TM Elektroporationsverfahren.....	50
3.2.3.2 Monolayerzellen mit dem Transfektionsreagenz Nanofectin TM	51
3.2.4 Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY TM	51
3.2.5 Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)	52
3.3 DNA-Techniken.....	53
3.3.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipräparation, „Boiling- Präp“).....	53
3.3.2 Präparative Plasmidisolierung (NUCLEOBOND TM -Methode)	54

3.3.3	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	55
3.3.4	Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	56
3.3.5	Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA	57
3.3.6	Herstellung eines Agarosegels	58
3.3.7	Glasmilchisolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen/ Lösungen	58
3.4	Enzymatische Modifikation von DNA	59
3.4.1.	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)	59
3.4.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA-Enden	61
3.4.3	Ligation von DNA-Fragmenten	61
3.5	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	62
3.6	Der Luciferase-Reportergen-Assay	65
3.7	RNA-Techniken	67
3.7.1	Gesamt-RNA Isolierung aus kultivierten Zellen	67
3.7.2	Northern Blot	67
3.7.2.1	Herstellung eines SequaGel™ Sequenzierungsgels	67
3.7.2.2	Elektrophorese und Membrantransfer	67
3.7.2.3	Endmarkierung der Sonde mit Gamma- ³² P-ATP	68
3.7.2.4	Vorhybridisierung und Hybridisierung	69
3.7.2.5	Waschen und Belichten	69
3.7.2.6	Alternative Markierungsmethode des Oligonukleotids mittels des <i>mirVana</i> -™ Verfahrens	69
3.8	DNase Verdau	70
3.9	Proteintechniken	70
3.9.1	Herstellung von 2x Sample-Buffer-Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen	70
3.9.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten	71
3.9.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	72
3.9.4	Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels	73
3.9.5	Western Blot (Immunoblot)	74
3.9.5.1	Proteintransfer	74
3.9.5.2	Nachweisverfahren von Proteinen	75
3.9.5.2.1	Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine	75
3.9.5.2.2	Nachweis radioaktiv markierter Proteine	75
3.10	Immunologischer Proteinnachweis	76
3.10.1	Herstellung nativer Proteinextrakte	76
3.10.2	Radioaktive Markierung von eukaryotischer Zellen	76
3.10.3	Immunpräzipitation	77
3.11	Immunfluoreszenz	77
4.	ERGEBNISSE	79
4.1	Die Spaltung der EBV DNA Polymerase BALF5 durch die miRNA- BART2	79
4.1.1	Klonierung der miR-Konstrukte	81

4.1.1.1 Klonierung der miR-BART2.....	81
4.1.1.2 Klonierung der miR-155	82
4.1.2 Expressionskontrolle der miRNA-Konstrukte	83
4.1.2.1 Expressionskontrolle des pSG5-miR-BART2-Konstrukts.....	83
4.1.2.2 Expressionskontrolle des pSG5-miR155-Konstrukts.....	85
4.1.3 Klonierung der 3'UTR von BALF5	86
4.1.4 Luciferase-Reportergen-Assay	88
4.1.4.1 Einfluß der miRNA BART2 auf die BALF5 3'UTR	88
4.1.4.2 Einfluß der miRNA BART2 auf den pGL3-Vektor.....	89
4.1.4.3 Einfluß der unspezifischen miR155 auf die BALF5 3'UTR.....	90
4.2 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das BALF5-Protein ...	92
4.2.1.1 Herstellung des BALF5-Peptids zur Immunisierung von Ratten.....	92
4.2.1.2 Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen BALF5.....	93
4.2.2 Charakterisierung der gewonnen monoklonalen BALF5-Antikörper	93
4.2.2.1 Western Blot.....	93
4.2.2.2.1 Immunpräzipitation	95
4.2.2.2.2 Immunpräzipitation von radioaktiv markiertem BALF5-Protein.....	97
4.2.2.3 Immunfluoreszenz.....	99
4.2.2.4 Übersicht zur Charakterisierung der BALF5-Antikörper.....	102
4.3 Aufhebung der Latenz EBV-positiver Zellen durch antisense miRNAs	103
5. DISKUSSION.....	107
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	119
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	121

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: EBV-Virionen (Elektronenmikroskopische Darstellung)</i>	3
<i>Abb. 2: Schematische Darstellung des EBV-Episoms</i>	10
<i>Abb. 3: Schematische Einteilung des linearisierten EBV-Genoms</i>	11
<i>Abb. 4: Struktur der Vorläufer der lin-4 und let-7 miRNAs</i>	15
<i>Abb. 5: Biogenese und Funktion humaner miRNAs</i>	20
<i>Abb. 6: Potentielle Wirkmechanismen von miRNAs auf die Virusreplikation</i>	22
<i>Abb. 7: EBV-kodierte miRNAs</i>	24
<i>Abb. 8: Übersicht über die miRNA-enhaltenden Abschnitte des EBV-Genoms</i>	24
<i>Abb. 9: Genomische Lokalisation des EBV BART miRNA-Clusters</i>	27
<i>Abb. 10: Genkarte des BART-Locus von EBV</i>	27
<i>Abb. 11: Vorhergesagte Hairpin-Struktur der neuen EBV pre-miRNAs</i>	29
<i>Abb. 12: Vektorkarte des pGEMTM-T Vektor</i>	40
<i>Abb. 13: Vektorkarte des pSG5 Vektors</i>	41
<i>Abb. 14: Vektorkarte des pEGFP-C1 Vektors</i>	42
<i>Abb. 15: Vektorkarte des pGL3-Promoter Vektors</i>	43
<i>Abb. 16: Schnittstelle der miR-BART2 in der 3'UTR von BALF5</i>	80
<i>Abb. 17: EcoRI-Verdau des pGEM BART2-Konstrukts</i>	81
<i>Abb. 18: Orientierungsverdau des Effektorplasmids pSG5 BART2</i>	82
<i>Abb. 19: Orientierungsverdau des Effektorplasmids pSG5-miR155</i>	83
<i>Abb. 20: Northern Blot- Analyse zum Nachweis der ektopischen Expression der miRNA-BART2</i>	84
<i>Abb. 21: Northern Blot- Analyse zum Nachweis der ektopischen Expression der miRNA-miR155</i>	86
<i>Abb. 22: Schematische Darstellung der Regulation der miR-BART2 auf ihre potentielle Ziel-mRNA BALF5</i>	87
<i>Abb. 23: Kontrollgel des PCR-Amplifikats BALF5-3'UTR</i>	88
<i>Abb. 24: Einfluß der miR-BART2 auf das pGL3-BALF5-Reporterkonstrukt</i>	89
<i>Abb. 25: Einfluß der miR-BART2 auf den pGL3-Promotor-Vektor</i>	90
<i>Abb. 26: Regulierung der BALF5-Expression durch die EBV-unspezifische miR-155</i>	91
<i>Abb. 27: BALF5-Peptid zur Immunisierung von Ratten</i>	93
<i>Abb. 28: Western Blot Nachweis des BALF5-Proteins mit den monoklonalen Antikörper 4C12 und 2E10</i>	94
<i>Abb. 29: Nachweis des BALF5-Proteins mit monoklonalen Antikörpern in der Immunpräzipitation</i>	96
<i>Abb. 30: Nachweis des BALF5-Proteins in der radioaktiv markierten Immunpräzipitation</i>	98
<i>Abb. 31: Überprüfung der BALF5-Antikörper auf ihre spezifische Erkennung des BALF5-Proteins in der Immunfluoreszenz</i>	101
<i>Abb. 32: Versuch zur Aufhebung der Latenz EBV-positiver Zellen durch die antisense miRNA BART2</i>	105
<i>Abb. 33: Versuch zur Aufhebung der Latenz EBV-positiver Zelllinien durch antisense-Oligonukleotide der miRNAs BHRF1-1, BHRF1-2, BHRF1-3, BART1 und BART2</i>	106
<i>Abb. 34: Verringerung des miR-BART2-Levels während der lytischen Replikation</i>	113
<i>Abb. 35: MiR-BART2 verringert die Menge an BALF5-Polymerase</i>	114
<i>Abb. 36: MiR-BART2 führt zur Spaltung der BALF5-mRNA</i>	115
<i>Abb. 37: MiR-BART2 unterdrückt Virusproduktion</i>	116
<i>Abb. 38: Induktion des lytischen Zyklus hemmt Herabregulation der BALF5-3'UTR</i>	117

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Beispiele der vorhergesagten EBV-Zielgene der EBV miRNAs.....	25
Tab. 2: Pipettierschema eines 50µl-Standard-PCR-Ansatz.....	65
Tab. 3: Schema eines PCR-Standardprogramms.....	66
Tab. 4: Reaktionsansatz zur Endmarkierung der miR-Sonde mit Gamma- ³² P-ATP.....	69
Tab. 5: Komponenten für ein 10%iges Polyacrylamidgel.....	74
Tab. 6: Übersicht der charakterisierten BALF5-Antikörper.....	104

1. Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr Virus (EBV)

Erstmals wurden in den fünfziger Jahren vom englischen Arzt Dennis Burkitt klinische und epidemiologische Eigenschaften eines in Ost- und Zentralafrika bei Kindern auftretenden Lymphoms beschrieben (Burkitt, 1958). Aufgrund der auffälligen geographischen Verteilung in Malaria- und Gelbfiebergebieten vermutete Burkitt, dass ein infektiöses Agens, wie beispielsweise ein Virus, an der Genese des Burkitt-Lymphoms beteiligt ist (Burkitt, 1962). Erst einige Jahre später gelang Tony Epstein, Budd Anchong und Yvonne Barr der elektronenmikroskopische Nachweis des Epstein-Barr Virus (EBV) in Ultradünnschnitten *in vitro* kultivierter Burkitt-Lymphomzellen (Epstein, Achong, and Barr, 1964). Weitere drei Jahre später konnte erstmals gezeigt werden, dass EBV fähig ist, *in vitro* B-Lymphozyten zu immortalisieren (Henle et al., 1967; Pope, Horne, and Scott, 1968).

Zugeordnet wird das auch als humanes Herpesvirus 4 (HHV4) bezeichnete Epstein-Barr Virus (EBV) der Gattung der Lymphocryptoviridae innerhalb der Familie der Herpesviridae, Subfamilie der γ -Herpesvirinae.

Die Bezeichnung Herpesvirus stammt vom griechischen „herpein“, kriechen, was zum Ausdruck bringt, dass es nach einer Primärinfektion mit dem Virus zu einer lebenslangen Latenz kommt. Das Virus persistiert im Organismus. Es werden die unterschiedlichsten Organsysteme befallen, was zu unterschiedlichen Krankheitssymptomen führt. Von Allgemeinerkrankungen über Aborte bis hin zu Tumor- und Autoimmunerkrankungen bietet sich ein breitgefächertes Bild an Krankheitsanzeichen.

Als bekannte und bedeutsame Erkrankungen mit γ -Herpesviren in der Tiermedizin sind zum Einen die Marek-Krankheit der Hühner zu nennen, zum Anderen das Bösartige Katarrhalfieber (BKF) der Rinder. Ähnlich wie die Erkrankung mit EBV führt die Marek-Krankheit zu lymphoproliferativen Tumoren in Nerven und viszerale Organen. Bei einem Befall der viszerale Organe kommt es zum akuten Verlauf der Krankheit, ist das lymphatische Gewebe der Nervenzellen betroffen, kommt es zum protrahierten Verlauf mit zunehmenden Lähmungserscheinungen, was der

Erkrankung auch den Beinamen Marek'sche Hühnerlähme gab. Auch bei diesem Virus konnten acht viral kodierte mikroRNAs gefunden werden, die ähnlich wie die EBV-kodierten mikroRNAs den Eintritt in den lytischen Replikationszyklus des Virus regulieren (Burnside et al., 2006).

Zielzellen des γ -Herpesvirus sind in erster Linie B- und T-Lymphozyten der Lymphknoten, in denen die Virusreplikation stattfindet. Allerdings ist ebenfalls eine lytische Infektion von Epithel- und Bindegewebszellen möglich. Die Persistenz im Wirt findet ohne oder mit minimaler Genexpression statt (Rolle et al., 2002).

Die Vertreter der Gattung der Lymphocryptoviridae weisen eine starke Ähnlichkeit in der Genomstruktur und Genomorganisation auf. Sie haben ein sehr enges Wirtsspektrum, so ist EBV für den Menschen pathogen. Weiter Vertreter des Genus sind das Humane Herpesvirus 7 (HHV7), das humane B-lymphotrope Virus, beim Menschenaffen existieren die Ponginen Herpesviren 1, 2 und 3 sowie die bei der Meerkatze auftretenden Cercopithecinen Herpesviren 12, 14 und 15 (Rolle et al., 2002).

Das EBV zeigt den typischen, herpesviralen Aufbau bestehend aus dem durch 162 Kapsomere gebildetem ikosaedrischen Nukleokapsid mit einem Durchmesser von 100 bis 110nm. Das Nukleokapsid ist von einer Lipiddoppelmembran („envelope“) umgeben, wobei die äußere Membran der Zellmembran entspricht und nach außen gerichtete Glykoproteine trägt, die zum Einen als F_c -Rezeptor die Adsorption an die Zielzellen vermitteln, zum Anderen als Antigen bei der Bildung neutralisierender Antikörper dienen. Die innere Schicht stammt aus der Kernmembran. Die etwa 120-200nm² große, pleomorphe Lipidmembran macht das Virus labil gegenüber Umwelteinflüssen, Detergenzien und Desinfektionsmitteln (Rolle et al., 2002). Zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran befindet sich das Tegument, eine oftmals asymmetrisch verteilte, amorphe Schicht variabler Stärke aus globulären Proteinen (Rickinson et al., 1996). Im Elektronenmikroskop erscheint das Virus meist „spiegeleiförmig“ (Rolle et al., 2002). Vom Nukleokapsid umschlossen ist das 172kbp große, doppelsträngige DNA-Genom.

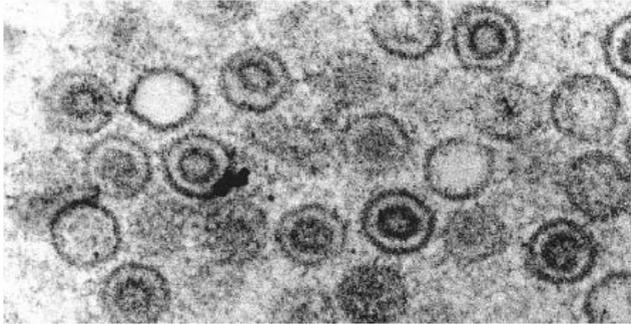


Abb. 1: EBV-Virionen (Elektronenmikroskopische Darstellung)

Negativ-gefärbte elektronenmikroskopische Darstellung von Epstein-Barr Virionen in Biopsien oraler Haarleukoplakie (Sugihara et al., 1990).

Es existieren zwei Typen des Epstein-Barr Virus mit signifikanten Unterschieden in der primären Aminosäuren-Sequenz ihrer Kernantigene (EBV nuclear antigen, EBNA) (McGeoch, Rixon, and Davison, 2006). Aufgrund dieser Sequenzvariationen werden sehr unterschiedliche zytotoxische T-Zellantworten hervorgerufen (Rickinson and Moss, 1997; Sample et al., 1990). Die Transformationseffizienz *in vitro* des in den westlichen Industrieländern überwiegenden EBV Typ1 ist viel höher als die des EBV Typ 2 (Rickinson, Young, and Rowe, 1987). In Afrika und China treten die Typen 1 und 2 in etwa der gleichen Häufigkeit auf (Rowe et al., 1989; Sixbey et al., 1989; Zimber et al., 1986).

1.1.1 EBV-Infektionen

Das Epstein-Barr Virus ist weltweit verbreitet mit einer Durchseuchungsrate von etwa 95% der adulten Bevölkerung, d.h. fast alle Erwachsenen haben IgG-Antikörper gegen Hüllmembran- oder Kapsidproteine; sie sind seropositiv (Gerber et al., 1972; Henle et al., 1969).

Die Übertragung des EBVs erfolgt horizontal über Speichel (Golden et al., 1973). In die Zielzelle gelangt das Virus durch rezeptorvermittelte Endozytose, wobei sich der Glykoproteinkomplex gp 220/350 der Virushüllmembran an den C3d-

Komplementrezeptor CD21 (CR2) der Zielzellenoberfläche anlagert (Fingeroth et al., 1984). Auf unreifen B-Lymphozyten findet sich das CD21-Antigen in sehr hoher Dichte, weshalb ruhende B-Lymphozyten der Schleimhaut des Oro- und Nasopharynx als primäre Zielzellen des Epstein-Barr Virus gelten (Niedobitek et al., 1997). Des Weiteren exprimieren undifferenzierte Epithelzellen des Nasen-Rachenraums und des Zungenrandes geringe Mengen an CD21; hier kann ebenfalls eine produktive, lytische Vermehrung des Virus stattfinden (Greenspan et al., 1985; Morgan et al., 1979; Sixbey, Nedrud et al., 1984). Als Virusreservoir werden latent infizierte, ruhende, CD23-negative CD14-positive Memory-B-Zellen gesunder Personen angesehen (Babcock et al., 1998; Gratama et al., 1988; Miyashita et al., 1995).

Abhängig von den hygienischen Umständen und dem Lebensstandard kommt es in unterschiedlichem Alter zu einer Primärinfektion mit EBV (Evans, 1982). So kommt es beispielsweise in China und in vielen Ländern Afrikas bereits im frühen Kindesalter zur Infektion, die zumeist asymptomatisch verläuft. In den westlichen Länder werden oft erst Jugendliche oder junge Erwachsene infiziert, wobei sich hier in etwa 50% der Fälle eine infektiöse Mononukleose bzw. das „Pfeiffersche Drüsenfieber“ klinisch manifestieren (Henle, Henle, and Diehl, 1968; Niederman et al., 1968).

Nach der Primärinfektion kommt es zu einer lebenslangen Viruspersistenz in ruhenden Memory-B-Zellen (Babcock et al., 1998; Babcock, Hochberg, and Thorley-Lawson, 2000; Babcock and Thorley-Lawson, 2000; Gratama et al., 1988; Miyashita et al., 1995). Das Virus kann lebenslang über den Speichel aus dem Hals-, Nasen- und Rachenraum ausgeschieden werden.

Die Gefahr der EBV-Persistenz besteht darin, dass das Virus in der Lage ist, *in vitro* B-Zellen zu immortalisieren, d.h. permanentes Zellwachstum auszulösen und aufrechtzuerhalten. Latent infizierte, periphere B-Zellen können *in vitro* spontan zu lymphoblastoiden Zelllinien (lymphoblastoid cell lines, LCLs) auswachsen. LCLs können entweder aus dem Blut EBV-infizierter Personen oder durch *in vitro* Infektion EBV-negativer, primärer B-Lymphozyten gewonnen werden (Pritchett, Hayward, and Kieff, 1975).

EBV wurde als erstes humanpathogenes Virus kausal mit der Entstehung verschiedener maligner lymphoproliferativer Erkrankungen in Zusammenhang

gebracht. Dazu gehören das Burkitt Lymphom (BL), das Hodgkin Lymphom, T-Zell-Lymphome und PTLD (Post-Transplant-Lymphoproliferative Disease). Eine weitere von EBV ausgelöste maligne Erkrankung ist das Nasopharyngealkarzinom (NPC).

1.1.1.1 Infektiöse Mononukleose (IM, Pfeiffersches Drüsenfieber, students' kissing disease)

Die infektiöse Mononukleose (IM) ist eine benigne, selbstlimitierende, lymphoproliferative Erkrankung mit klinischen Symptomen wie Fieber, Tonsilitis, Schwellung von Lymphknoten, Milz und Leber. Diese Symptomatik spiegelt die Immunantwort des gesunden Menschen auf die infizierten, proliferierenden B-Zellen und die starke Virusvermehrung wider, die durch cytotoxische (CD8⁺) T-Zellen limitiert wird (Henle, Henle, and Diehl, 1968; Niederman et al., 1968; Sawyer et al., 1971). Der resultierende Überschuss an mononukleären weißen Blutzellen prägte den Namen der Erkrankung. In der akuten Phase der IM findet sich eine charakteristische Erhöhung der Anzahl infizierter B-Zellen um den Faktor 5×10^3 auf 0,05% aller zirkulierenden B-Zellen (Rocchi et al., 1977). Nachdem die Infektion durch die Elimination infizierter B-Zellen durch CD8⁺-T-Zellen unter Kontrolle gebracht wurde, resultiert sie in einer lebenslangen Persistenz des Virus.

1.1.1.2 Burkitt-Lymphom (BL)

Das Burkitt-Lymphom ist ein malignes, wenig differenziertes B-Zell-Lymphom mononukleären Ursprungs. Hierbei handelt es sich um die häufigste Tumorerkrankung bei Kindern in Afrika. Es besteht eine auffallende Korrelation zwischen Malariagebieten (v.a. von Plasmodium falciparum-Gebieten) und hoher Burkitt-Lymphom-Inzidenz. In diesen Gebieten ist die Erkrankung bei Kindern im Alter von 7 bis 9 Jahren endemisch. Die Tumore manifestieren sich überwiegend in Kiefer- und Gesichtsregionen und im Bereich des Abdomens; 96% dieser Lymphome sind EBV positiv (Geser et al., 1983). Dagegen tritt die sporadische Form bei Erwachsenen weltweit meist mit einer Beteiligung des Knochenmarks auf. Bei dieser Krankheitsform sind lediglich 20 bis 60% der Tumore mit EBV assoziiert, was einen kausalen Zusammenhang zwischen einer EBV-Infektion und der Tumorgenese in Frage stellt. Das lässt darauf schließen, dass auch andere Komponenten beteiligt

sein müssen (Lindahl et al., 1974). Eine Immundefizienz-assoziierte BL-Form ist bei AIDS-Patienten bekannt (Changanti et al., 1983).

Das charakteristische Merkmal der BL ist eine Chromosomentranslokation, die immer die Bande q24 des Chromosoms 8 betrifft (Croce and Nowell, 1985), unabhängig davon, ob sie EBV-positiv oder –negativ sind. Durch die Translokation gelangt das Proto-Onkogen c-myc in die Nähe eines Immunglobulin-Locus der Chromosomen 2, 14 oder 22, wodurch c-myc stark exprimiert wird (Manolov and Manolova, 1972). Dadurch liegen in den Zellen hohe Konzentrationen des DNA-bindenden, transaktivierenden c-myc-Proteins vor (Modrow, 1997). Die Lokalisation der Bruchstellen auf Chromosom 8 der t(8;14)-Translokation stellt ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der endemischen und sporadischen Form des Burkitt-Lymphoms dar. Während 74% der endemischen Burkitt-Lymphome einen Bruchpunkt stromaufwärts des c-myc-Locus zum Zeitpunkt des IgH-Rearrangements aufweisen, zeigen sporadische Burkitt-Lymphome meist zu einem späteren Zeitpunkt einen Bruchpunkt innerhalb des c-myc-Locus (Gutierrez et al., 1992; Shiramizu et al., 1991).

EBV-positive Burkitt-Lymphome werden dem Latenztyp I zugeordnet und exprimieren nur EBNA1 und die EBER1- und EBER2-Transkripte (EBV encoded small RNAs) (Rowe et al., 1987). EBNA1 wird durch eine 237-239 AS langen Wiederholung eines Glycin-Alanin-Motivs (glycine-alanine repeat) nicht als Antigen erkannt und deshalb nicht im Proteasom prozessiert und als MHC I-Komplex präsentiert. Somit ist es dem EBV-positiven Burkitt-Lymphom möglich, der EBV-spezifischen zytotoxischen T-Zellabwehr zu entgehen. Es gibt aber auch Hinweise auf einen gelegentlichen Übergang zum Expressionsmuster des Latenztyp III, bei dem auch die viralen Proteine EBNA2 und EBNA3C synthetisiert werden (Niedobitek, 1995).

1.1.1.3 Das Hodgkin Lymphom („Hodgkin`s Disease“, HD, Morbus Hodgkin)

Das Hodgkin Lymphom ist ein Tumor des lymphatischen Systems, für den bestimmte maligne Zellen, die Reed-Sternberg Zellen, charakteristisch sind. Es ist weltweit verbreitet, gehört aber in den westlichen Ländern zu einer der häufigsten Lymphomerkkrankungen. Vor allem in zwei Altersgruppen, zwischen 25 und 30 Jahren und um das 45ste Lebensjahr tritt diese Erkrankung gehäuft auf. Ein

Nachweis von EBV-DNA gelingt in 60% der Fälle (Herbst et al., 1991; Knecht et al., 1991; Stein et al., 1991; Uccini et al., 1990; Weiss et al., 1989). Hier konnte gezeigt werden, dass Zellen, die virale Gene exprimieren, in den Latenztyp II einzustufen sind. In 40-50% der Reed-Sternberg Zellen wird das EBV-Onkogen LMP1 exprimiert (Herbst et al., 1991; Pallesen et al., 1991). Darüber hinaus kann in EBV-positiven Zellen die Expression von EBNA1-Protein aufgezeigt werden (Grässer et al., 1994). Welche Rolle EBV bei der Tumorentstehung spielt ist allerdings weiterhin unklar.

1.1.1.4 Das Nasopharyngealkarzinom

Beim Nasopharyngealkarzinom (NPC) handelt es sich um einen undifferenzierten, stark metastasierenden, malignen Tumor der Epithelzellen des Nasenrachenraums. Das monoklonale Karzinom entwickelt sich als Primärtumor in den Rosenmüllerschen Gruben des Nasopharynx. In China und Südostasien ist bei Männern mittleren Alters das Nasopharyngealkarzinom die häufigste, bei Frauen die zweithäufigste Tumorerkrankung. Das NPC tritt weltweit auf mit etwa einem Fall pro einer Million Personen und Jahr. In den Endemiegebieten kommt es zum gehäuften Auftreten der Erkrankung mit 20-60 Fällen pro 10^5 Personen und Jahr (Clifford, 1970; Waterkouse et al., 1982).

Der EBV-DNA Nachweis gelingt in allen Biopsien undifferenzierter NPCs, was für eine starke Korrelation zwischen der EBV-Infektion und der Tumorentstehung spricht (Nonoyama et al., 1973; zur Hausen et al., 1970). Allerdings deutet die regional unterschiedliche Inzidenz und Häufigkeit der Erkrankung darauf hin, dass auch andere Faktoren an der Tumorentstehung beteiligt sein müssen. Das können zum Einen die unterschiedlichen Lebens- und Umweltbedingungen sein, wie z.B. Nitrosamine in gesalzenem Fisch oder die Herstellung von Arzneimitteln aus phorbolsterhaltigen Euphorbiaceae, zum Anderen wird über eine genetische Prädisposition spekuliert (Buell, 1974; Henderson et al., 1976; Hirayama and Ito, 1981; Ito et al., 1983; Ward et al., 2000).

Ein Charakteristikum der Erkrankung ist der hohe IgA-Antikörpertiter gegen Viruskapsid-Antigen (VCA) (Hadar et al., 1986; Henle and Henle, 1976; Old et al., 1966). In 65% aller Fälle kommt es zur Expression von Fp-transkribiertem EBNA1 und der mRNA des latenten Membranproteins LMP1 (Fahraeus et al., 1988; Raab-

Traub et al., 1983; Smith and Griffin, 1992). Dieses Expressionsmuster der viralen Gene in den NPC-Zellen wird dem Latenztyp II zugeordnet.

1.1.1.4 EBV-assoziierte Erkrankungen Immundefizienter

Bei gesunden EBV-Trägern verhindert die CD8⁺ T-Zellantwort die unkontrollierte Proliferation EBV-infizierter B-Zellen. Bei Patienten mit Immundefizienz gleich welchen Ursprungs (HIV-Immundefizienz, genetisch bedingter Immunsuppression, immunsuppressiven Behandlungen bei Transplantationen - Post-transplant lymphoproliferative disease [PTLD]), können sich im Zuge einer EBV-Primärinfektion oder einer EBV-Reaktivierung polyklonale B-Zell-Lymphome entwickeln und stellen die in vivo Äquivalente zu lymphoblastoiden Zelllinien dar (Hanto et al., 1981; Kalter et al., 1985). Einen Sonderfall stellt das „X-linked lymphoproliferative syndrome“ (XLPS) dar. Die zu 80% männlichen Patienten tragen eine Mutation im SH2D1A-Gen (SH2-Domäne enthaltendes Gen 1A) an der Position q25 des X-Chromosoms (Coffey et al., 1998; Nichols, 2000; Sayos et al., 1998; Sullivan, 1999). Im Zuge einer EBV-Infektion kommt es zu einer Zerstörung des peripheren Immunsystems und zur massiven Infiltration der Lunge, Leber, Thymus, Nieren und des Knochenmarks mit CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen und EBV-infizierten B-Zellen, was in den meisten Fällen zu Organversagen führt. Etwa 30% der Patienten entwickeln zusätzlich polyklonale B-Zell-Lymphome (Purtilo et al., 1981). Da es sich nicht um einen generalisierten Immundefekt handelt, sind die EBV-negativen Träger der Mutation meist klinisch unauffällig. Eine gestörte Funktion der natürlichen Killerzellen oder der Bildung EBV-spezifischer cytotoxischer T-Zellen können der Erkrankung zugrunde liegen.

1.1.1.4 T-Zell-Lymphome

Da ein Nachweis des EBV-Genoms und der viralen Genexpression in den T-Zell-Lymphomen gelingt, wird vermutet, dass EBV auch bei der Genese dieser Tumoren eine Rolle spielen könnte (Jones et al., 1988; Kikuta et al., 1988; Minarovits et al., 1994). Das Oberflächenantigen CD21 wird unter gewissen Umständen von T-Zellen exprimiert, welches den primären EBV-Rezeptor darstellt. Bislang konnte jedoch

lediglich die in großen Mengen CD21 exprimierende T-Zelllinie MT2 in vitro persistent mit EBV infiziert werden (Yoshiyama, Shimizu, and Takada, 1995).

1.1.1.5 Orale Haarleukoplakie (OHL)

Als orale Leukoplakie werden die für das Krankheitsbild AIDS typischen Läsionen am Zungenrand bezeichnet, die AIDS-Patienten mit starken immunologischen Störungen neben den zuvor beschriebenen EBV-assoziierten B-Zell-Lymphomen entwickeln. Es kommt aufgrund der Immundefizienz in den infizierten Epithelzellen zur unkontrollierten EBV-Replikation und Virusproduktion (Greenspan et al., 1985).

1.1.2 EBV- Genom

Das EBV-Genom war das erste vollständig klonierte und sequenzierte Genom eines Herpesvirus (Arrand et al., 1981; Polack et al., 1984; Skare and Strominger, 1980). Im Nukleokapsid des Virens liegt es als lineare, doppelsträngige DNA vor, mit einer Größe von 172-184kbp (B95-8 hat eine Deletion von ca. 12kbp) (Baer et al., 1984), wobei die Genomlänge zwischen den einzelnen EBV-Zelllinien sehr heterogen ist, abhängig von der Anzahl der spezifischen Wiederholungseinheiten und den unterschiedlichen Deletionen der einzelnen Zelllinien.

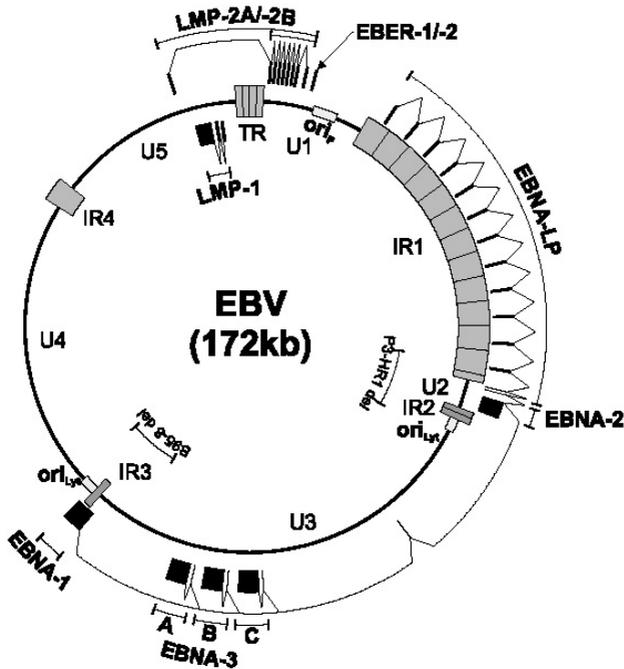


Abb. 2: Schematische Darstellung des EBV-Episoms

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).

Im Zellkern infizierter Zellen dagegen liegt das Genom entweder als kovalent geschlossenes, episomal replizierendes Molekül vor (Lindahl et al., 1976) oder es kann auch ins Wirtsgenom integriert werden (Henderson et al., 1983). Mit etwa 60% ist der GC-Gehalt als recht hoch anzusehen (Hayward and Kieff, 1977; Pritchett, Hayward, and Kieff, 1975). Zelllinien-abhängig liegt die Kopienzahl des Virusgenoms zwischen 2 und 200.

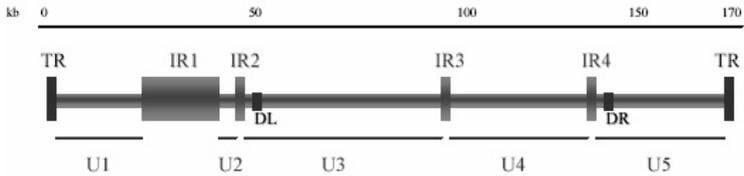


Abb.3: Schematische Einteilung des linearisierten EBV-Genoms

Dargestellt sind repetitive (*internal repeats* IR 1-4, *terminal repeats* TR und *duplications* D_R und D_L) und singuläre (*unique* U 1-5) Sequenzen. *Oben*: Längenskala in kbp. (Zimber et al., 1986).

Abbildung 3 zeigt die physikalische Karte des EBV-Genoms exemplarisch am Beispiel des EBV-Stammes „M-ABA“. An den Genomenden befinden sich die „terminal repeats“ (TR), etwa 500bp lange, repetitive Sequenzen (Kintner and Sugden, 1979), die nach einer Infektion für die Zirkularisierung des Genoms verantwortlich sind. Unter „internal repeats“ (IR1-4) versteht man die vier internen, 3,1kbp lange Sequenzwiederholungen, die das Genom in 5 singuläre Bereiche unterteilen („unique sequences, UR 1-5). Im Endbereich von IR2 und IR4 schließen sich zwei weitere konservierte, etwa 1kbp lange „direct repeat-Elemente“ (D_L und D_R) an, die als Initiationsstellen der Genomreplikation im lytischen Zyklus dienen (*ori_{Lyt}*) (Hammerschmidt and Sugden, 1988). Dagegen liegt in der U1-Region der Replikationsursprung für die episomale Genomvermehrung in der Latenz (*ori_P*) (Rawlins et al., 1985; Yates et al., 1984).

1.1.3 Replikationszyklus

Bei der EBV-Replikation unterscheidet man einen lytischen und einen latenten Zyklus. Von einer latenten Infektion spricht man beispielsweise bei der Immortalisierung von B-Lymphozyten. Es kommt zur persistenten Infektion der infizierten Zellen ohne eine Ausbildung vollständiger Viruspartikel. In der Latenz unterliegt die virale DNA dem Replikationszyklus der Wirtszelle (Aiyar, Tyree, and Sugden, 1998; Rawlins et al., 1985; Yates et al., 1984).

In einer geringen Anzahl von Zellen der „Producer-Zelllinien“ kommt es zum spontanen Ablaufen des lytischen Zyklus. Hierbei kommt es zur massiven Bildung

von Virionen und zur Lyse der Wirtszelle. Durch eine Induktion mit beispielsweise 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) oder einer α -Immunglobulinbehandlung kann einer höherer Prozentsatz (etwa 10-20%) an Zellen in den lytischen Zyklus übergehen (Bauer, Hofler, and Zur Hausen, 1982; Faggioni et al., 1986; Takada, Komano, and Imai, 1999; zur Hausen et al., 1978).

Eine Unterscheidung zwischen lytischer und latenter Phase ist möglich anhand des Expressionsmusters der viralen Proteine oder anhand der Aktivität der jeweiligen Replikationsursprünge ori_{Lyt} und ori_P .

1.1.3.1 Lytische Infektion

Nach der Induktion des lytischen Zyklus zeigen die Wirtszellen die für die Herpesvirusreplikation typischen zytopathischen Veränderungen. Die Synthese der Wirtsmakromoleküle kommt zum Erliegen (Gergely, Klein, and Ernberg, 1971); zelluläres Chromatin konzentriert sich am Kernrand, wogegen die virale DNA im Kernzentrum synthetisiert wird. Nachdem das Nukleokapsid im Zytoplasma zusammengebaut wurde wird es in den Zellkern transportiert, wo die virale DNA schließlich verpackt wird. Die Behüllung des Virus findet an der inneren Kernmembran statt. Nach dem Absterben der Wirtszelle kommt es zur Freisetzung des fertigen Viruspartikels.

Auf genomischer Ebene lässt sich das folgende Expressionsmuster nachweisen: Zunächst erfolgt die Transkription der Immediate Early-Gene BZLF-1 und BRLF-1, sowie ihrer Genprodukte, den Proteinen Z und R. Das Z-Protein ist ein Transkriptionsfaktor mit Homologie zu AP1 bzw. der c-fos/c-jun-Familie (Chevallier-Greco et al., 1986; Countryman and Miller, 1985; Farrell et al., 1989; Takada et al., 1986) und vermittelt den Übergang von der Latenz in die lytische Phase. Die beiden Proteine Z und R stellen sich als transaktivierende Promotoren der frühen Gene BHLF-1, BHRF-1 und BALF-2 dar, die nun virale Gene aktivieren und das Wirtsgenom stilllegen. Des weiteren bewirken Z und R die Induktion und Expression der späteren Antigene gp 350, gp 200 und m-VCA (Feederle et al., 2000); R meist durch Bindung an Enhancer-Elemente stromaufwärts der Erkennungssequenz des Z-Proteins (Chevallier-Greco et al., 1989; Chevallier-Greco et al., 1986). Unabhängig von seiner Transaktivierungsfähigkeit fungiert Z als „origin binding protein“, indem es an regulatorische Sequenzen von ori_{Lyt} bindet (Schepers et al., 1993).

Zu den frühen lytischen Genen gehören unter anderem die DNA-Polymerase BALF5, das DNA-Bingungprotein BALF2, sowie die Enzyme dUTPase BLLF-3, die Ribonukleotidreduktasen BoRF-2 und BaRF-1, die Thymidinkinase BXLF-1 und die alkalische Exonuklease BGLF-5 (Kieff and Liebowitz, 1996). Nach Abschluß der Virusgenreplikation beginnt die Expression der späten lytischen Gene, die für die viralen Strukturproteine kodieren. Dazu gehören die Tegumentumproteine (BNRF-1 (p143), BLLF-1a und -1b (gp 350/220), BXLF-2n(gp 85), BALF-4 (gp 15)), das Kapsidprotein BcLF-1 (p150) (Beisel et al., 1985; Kieff, 1990). Die späten Membranproteine gp 220 und gp 350 sind von Bedeutung für das Eindringen in die Wirtszelle (Tanner et al., 1988) und dienen als Antigene bei der Impfstoffherstellung (Epstein et al., 1985).

1.1.3.2 Latente Infektion

Persistiert ein Erreger im Wirtsorganismus ohne klinische Symptome hervorzurufen, bzw. persistiert das virale Genom in der Wirtszelle ohne lytische Replikation spricht man von Latenz. In dieser Phase werden maximal 11 virale Gene exprimiert, in der lytischen Phase dagegen 90% des Genoms. Zu den latenten Genen gehören zwei kleine, nicht-polyadenylierte RNAs (EBV-encoded small RNA: EBER1 und 2), 6 Kernproteine (EBV-encoded nuclear antigene: EBNA-1,-2,-3A,-3B,-3C und EBNA-LP) und drei Membranproteine (latent membrane protein: LMP1, 2A und 2B). Damit Wirtszellen immortalisiert werden sind allerdings nur EBNA 1, 2, 3A, 3C und LMP1 notwendig (Cohen, Wang, and Kieff, 1991; Kaye, Izumi, and Kieff, 1993; Tomkinson, Robertson, and Kieff, 1993). Bei Zelllinien, die sich in der Latenz befinden, existieren drei verschiedene Expressionsmuster, die Latenztypen I, II und III. Im Latenztyp I werden lediglich die EBER-Transkripte 1 und 2 und das virale Protein EBNA 1 produziert, wie man es beispielsweise in Burkitt-Lymphomzellen findet. Findet man eine Expression von zusätzlich LMP1, 2A und 2B, wie es für Nasopharyngealkarzinome und Hodgkin-Lymphome typisch ist. Im Latenztyp III, der nun bei der infektiösen Mononukleose oder bei immunoblastischen, EBV-assoziierten B-Zell-Lymphomen bei Immundefizienten nachweisen kann, werden alle 11 genannten viralen Genprodukte exprimiert.

In neueren immunologischen Studien, in denen Mandelbiopsien EBV-infizierter Patienten untersucht wurden, gelangt man zu einer Ergänzung der klassischen

Latenztypeneinteilung. Hierbei werden die Muster der viralen Genexpression in Beziehung gesetzt mit dem immunologischen Status der infizierten Zellen und deren Lokalisation innerhalb verschiedener Kompartimente des Immunsystems (Thorley-Lawson, 2001).

1.2 Mikro RNAs

1.2.1 Allgemeine Einleitung

Bei mikroRNAs (miRNAs) handelt es sich um 19 bis 25nt lange, endogene RNAs, die wichtige regulatorische Funktionen bei Tieren und Pflanzen ausüben (Ambros et al., 2003 Cullen 2004). Einerseits ist es ihnen möglich in bestimmten Fällen den Abbau einer Ziel-mRNA zu induzieren, andererseits können sie die Translation reprimieren, ohne dass sich die Menge der entsprechenden mRNA vermindert.

Der Ursprung der mikroRNAs liegt in zellulären oder in viralen, genomischen Loci. Es entstehen Transkripte mit lokaler Haarnadel-Struktur, die im weiteren Verlauf zu Intermediaten weiterprozessiert werden. Die Intermediate stellen sich als Duplex aus miRNA und der nahezu komplementären sogenannten miRNA* dar. Zwischen verwandten Organismen findet man häufig eine Konservierung der miRNA-Sequenz (Cai et al., 2006). Durch die Unterschiede in der Sequenz und dem Expressionsmuster entsteht eine Spezifität für die Funktion der einzelnen miRNAs.

1.2.2 Entdeckung

Im Jahr 1993 fiel der Forschergruppe um Ambros auf, dass das *lin-4* Gen nicht für ein Protein kodiert, sondern vielmehr für ein Paar kleiner RNAs, die für die zeitliche Regulation des Übergangs vom 1. zum 2. Larvenstadium bei *C.elegans* verantwortlich sind. Die RNAs sind 22nt und 61nt lang, wobei sich der größere Abschnitt als Vorläufer des kleineren erwiesen hat. *Lin-4* ist komplementär zu mehreren Abschnitten der 3'UTR der *lin-14* mRNA. Diese komplementären Abschnitte stellen die Bereiche der 3'UTR dar, in denen die Repression von *lin-14* durch das *lin-4* Genprodukt vermittelt wird, wie später experimentell bestätigt wurde (Wightman et al., 1991). Auffällig war, dass sich lediglich die *lin-14* Proteinmenge

reduziert, nicht aber die Menge an lin-14 mRNA. Aus dieser Beobachtung entwickelte man das Modell, dass die kleinen RNAs an komplementäre Stellen der 3'UTR binden und dann zu einer translationalen Repression führen.

Der kürzere Abschnitt der lin-4 RNA gilt heute als Begründer einer neuen, in großer Zahl vorkommenden Klasse regulatorischer RNAs mit dem Namen mikroRNAs oder miRNAs (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001).

Erst im Jahr 2000, d.h. erst 7 Jahre nach der Entdeckung der lin-4 RNA wurde eine weitere, 22nt lange RNA entdeckt, die vom let-7 Gen kodiert wird und ebenfalls regulatorische Funktion bei der Larvenentwicklung von *C.elegans* ausübt (Reinhart and Bartel, 2002; Slack et al., 2000)



Abb. 4: Struktur der Vorläufer der lin-4 und let-7 miRNAs

Die Abbildung zeigt die Vorläufer (pre-miRNAs) die die reife miRNA (rot) enthalten. Zu sehen sind die *C. elegans* stem-loop Strukturen, wobei Homologe in Fliegen und Säugetieren nachzuweisen sind (Lagos-Quintana et al., 2001; Lagos-Quintana et al., 2002; Pasquinelli et al., 2000).

Nach der Entdeckung der let-7 miRNA fing man an, nach Homologen im Genom unterschiedlicher Spezies zu suchen, wie z.B. bei Mensch und Fliegen. So konnte man die let-7 RNA selbst bei *Drosophila*, beim Menschen und 11 weiteren bilateralen Tieren nachweisen (Pasquinelli et al., 2000).

Durch das Klonieren kleiner RNAs konnten immer mehr miRNA-kodierende Gene im Genom der unterschiedlichsten Spezies, wie Säugetieren, Fischen, Würmern und Fliegen, nachgewiesen werden (Ambros et al., 2003; Aravin et al., 2003; Dostie et

al., 2003; Houbaviy, Murray, and Sharp, 2003; Lagos-Quintana et al., 2002; Lim et al., 2003a; Mourelatos et al., 2002).

Fast alle der klonierten miRNAs zeigten eine enge Konservierung zwischen nah verwandten Spezies, wie beispielsweise zwischen *C.elegans* und *C.briggsae* oder zwischen Mensch und Maus (Lagos-Quintana et al., 2003; Lim, Glasner et al., 2003; Lim et al., 2003b). Aber selbst zwischen weit entfernten Spezies kann man eine Konservierung homologer Gene beobachten. Bei etwa einem Drittel aller miRNA-Gene von *C.elegans* kann man ein Homolog im Menschen finden (Lim et al., 2003a). Sogar zwischen eng verwandten Viren, wie z.B. dem Epstein Barr Virus und dem Rhesus Lymphocryptovirus wird eine Konservierung der miRNA-Sequenzen beobachtet als Zeichen der Adaptation an das hochkonservierte Wirtsgenom der Primaten (Cai et al., 2006). Man geht davon aus, dass viele Ziel-mRNAs zellulären Ursprungs sind und somit wenig variabel. Deshalb können nur geringe virale miRNA-Änderungen toleriert werden (Cullen, 2006).

1.2.3 Genomische Organisation und Expression

Im Genom liegen die meisten miRNA-Gene in großer Distanz (>1kb) zu anderen Genen, weshalb man vermutet, dass sie als eigene, unabhängige Transkriptionseinheit exprimiert werden (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001).

Meist in gleicher, manchmal auch in entgegengesetzter Orientierung liegen ein Viertel der humanen miRNA-Gene in Introns anderer Gene. Diese miRNAs werden vermutlich aus Introns prozessiert und besitzen keine eigenen Promotoren (Aravin et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2003; Lai et al., 2003; Lim et al., 2003a). Man stellt sich nun folgendes regulatorisches Szenario vor: Ein Protein wird exprimiert und gleichzeitig die miRNA aus dem Intron prozessiert. Diese miRNA führt dann beispielsweise zur Verringerung eines dem synthetisierten Protein entgegenwirkenden Proteins.

Neueren Untersuchungen zufolge können miRNAs in drei Gruppen aufgeteilt werden: zum Einen existieren exonische miRNAs in nicht-kodierenden Transkriptionseinheiten, des weiteren intronische miRNAs in nicht-kodierenden Transkriptionseinheiten und zuletzt intronische miRNAs in Protein-kodierenden Transkriptionseinheiten (Rodriguez et al., 2004).

Unklar bleibt bisher, ob diese miRNAs funktionell mit ihren Wirtsgenen verwandt sind, da die Splicing-Mechanik nicht in der Lage ist, ein Intron zu produzieren, das im Anschluß Zugang zur miRNA-Prozessierung hat (Chen and Meister, 2005). Es könnte aber eine Verbindung geben zwischen der Prozessierung der mRNA und der miRNA, denn in einigen Studien fanden sich Hinweise, dass miRNAs häufig mit ihren Wirts-mRNAs prozessiert werden (Baskerville and Bartel, 2005).

Einige miRNAs-Gene von Säugetieren befinden sich in repetitiven genomischen Regionen und man vermutet, dass repetitive Elemente die treibende Kraft für die Neuentstehung von miRNAs in der Evolution der Säugetiere sind (Smalheiser and Torvik, 2005).

Bei der miRNA Expression finden sich viele unterschiedliche Muster. Von einer Stadium-spezifischen Expression spricht man z.B., wenn, wie im Fall der lin-4 und let-7 Homologen und Orthologen, die miRNAs zu unterschiedlichen Zeiten der Entwicklung exprimiert werden (Bashirullah et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2002; Lau et al., 2001; Lim et al., 2003a; Pasquinelli et al., 2000). Daneben ist eine Zelltyp-spezifische Expression zu sehen, denn die miR-1 kommt vornehmlich in Säugerherzzellen vor, die miR-122 dagegen in Leberzellen und weiterhin kann gesagt werden, dass jeder Zelltyp zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Entwicklung ein spezifisches miRNA-Expressionsprofil aufweist. Auch die Menge an miRNA-Molekülen pro Zelle kann sehr stark variieren, so schwankt bei *C.elegans* der Gehalt zwischen 800 Molekülen und 50.000 Molekülen pro Zelle (Lim et al., 2003b).

Mit etwa 1% der exprimierten Gene höherer Eukaryoten gehören miRNAs zu einer der größten Genfamilien (Bartel, 2004). Beim Menschen sind derzeit bereits mehr als 400 miRNAs entdeckt und ebenfalls etwa 300 bei Metazoen (Cullen, 2006).

1.2.4 Biogenese

Durch Klonierung und Charakterisierung der primären miRNAs fand man heraus, dass diese primären Transkripte am 5' Ende ein m⁷G Cap tragen und am 3' Ende einen poly (A) Schwanz, wie die klassischen, protein-kodierenden mRNAs auch.

Mittels verschiedener Experimente, in denen man die RNA Polymerase II (pol II) hemmte bzw. die Bindung an die miRNA Promotor-Regionen beobachtete, kam man zu dem Schluß, dass die meisten bisher untersuchten primären miRNAs durch die

pol II generiert werden (Cai, Hagedorn, and Cullen, 2004; Lee et al., 2004). Man ist sich nicht sicher, ob bei höheren Organismen nicht auch andere RNA-Polymerasen primäre miRNAs transkribieren können. Bislang ist bei MHV68 eine Transkription durch die pol III bekannt. Hierbei handelt es sich um miRNAs, die aus einer tRNA kodiert werden, wobei diese tRNA nicht ihre normale Funktion in der Translation der Protein-Biosynthese ausübt; sie trägt keine Aminosäure (Pfeffer et al., 2005). Borchert et al. beschreibt ebenfalls eine Transkription von humanen miRNAs durch die RNA Polymerase III (Borchert, Lanier, and Davidson, 2006).

Diese langen Primärtranskripte werden nun im Nukleus schrittweise von einem Enzym namens Drosha in 70nt lange Vorläufermoleküle (precursor miRNAs, pre-miRNAs) mit Haarnadel- (stem-loop-) Struktur geschnitten. Drosha ist eine RNA-Endonuklease Typ III mit zwei RNase III Regionen und einer dsRNA-Bindungsdomäne und schneidet an der Basis der Stamm-Struktur. Dabei entsteht am 5' Ende ein Phosphat-Überhang und am 3' Ende ein 2nt-Überhang (Basyuk et al., 2003; Lee et al., 2003). Für eine effiziente Prozessierung benötigt Drosha nicht-strukturierte Regionen die die Haarnadel flankieren (Zeng, Yi, and Cullen, 2005). Eine Interaktion mit einem dsRNA-Bindungsprotein (dsRBP) namens Pasha/DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung des primären Transkripts (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004; Landthaler, Yalcin, and Tuschl, 2004).

Nach anfänglicher Prozessierung im Kern finden die weiteren Schritte im Zytoplasma statt. Dazu wird die pre-miRNA durch den Export-Rezeptor Exportin-5 in einem energieabhängigen Schritt nach außen transportiert (Bohnsack, Czaplinski, and Gorlich, 2004; Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). Es findet eine direkte Interaktion zwischen Exportin-5 und der pre-miRNA statt, obwohl dieses keine direkte dsRNA-Bindungsdomäne hat, aber der 3' Überhang und die stem-Struktur sind für einen effektiven Export entscheidend (Zeng and Cullen, 2004).

Im Zytoplasma wird die pre-miRNA von Dicer weiterprozessiert. Dicer ist ebenfalls eine RNA-Endonuklease Typ III, die zwei RNase III Regionen, eine dsRNA-Bindungsregion, vermutlich eine Helikase-Region und eine PAZ-Region aufweist (Bernstein et al., 2001). Nun wird die pre-miRNA prozessiert und eine reife miRNA entsteht (Bernstein et al., 2003; Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001). Der doppelsträngige Teil des Vorläufers wird erkannt, Dicer schneidet 2 helikale Windungen nach der ersten Base des Doppelstrangs (Lee et al., 2003) und ein

miRNA Duplex-Zwischenprodukt entsteht, welches die reife miRNA enthält und den komplementären Strang (Zhang et al., 2004). Dieses kurzlebige Zwischenprodukt, das nun an beiden Enden einen 5' Phosphat und einen 2nt Überhang an den 3' Enden hat, wird ATP-abhängig entwunden und die einzelsträngige reife miRNA wird in den Effektorcomplex namens miRNP (miRNA-containing ribonucleoprotein complex) oder miRISC (miRNA-containing RNA-induced silencing complex) eingebaut. Dabei wird das 5'Ende des Strangs am schwächer gepaarten Ende der dsRNA als erstes in den miRNP eingebaut (Meister and Tuschl, 2004). Was mit dem Gegenstrang passiert ist bislang ungeklärt. Dicer enthält zwar eine DEAD-Box Helikase- Region, aber es ist bislang unklar, ob auch eine DEAD-Box Helikase bei der miRNA/miRNA^{*} Entwindung beteiligt ist. Von *D.melanogaster* weiß man beispielsweise, dass deren Helikase „Armitage“ an der frühen RISC und auch vermutlich bei der miRNP Zusammenlagerung beteiligt ist (Cook et al., 2004; Tomari et al., 2004).

Mitglieder der Ago-Proteinfamilie sind wichtige Bestandteile der miRNPs. Sie haben ungefähr ein Molekulargewicht von 100kDa und enthalten PAZ (piwi-argonaut-zwille) und PIWI Regionen (Carmell et al., 2002). Die PIWI-Region, die homolog zur RNase H ist, unterstützt die von den kleinen RNAs ausgelöste Spaltung der Ziel-mRNAs (Ma et al., 2005; Parker, Roe, and Barford, 2004; Parker, Roe, and Barford, 2005; Song et al., 2004; Yuan et al., 2005). Beim Menschen ist nur das Ago2-Protein zur Spaltung in der Lage, obwohl auch die anderen eine funktionstüchtige PIWI-Region enthalten (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004b; Meister and Tuschl, 2004; Rivas et al., 2005; Song et al., 2004). Die PAZ-Region dagegen ist eine RNA-Bindungsregion, die spezifisch den 2nt Überhang am 3' Ende erkennt und bindet (Lingel et al., 2004; Ma, Ye, and Patel, 2004; Song et al., 2003; Yan et al., 2003).

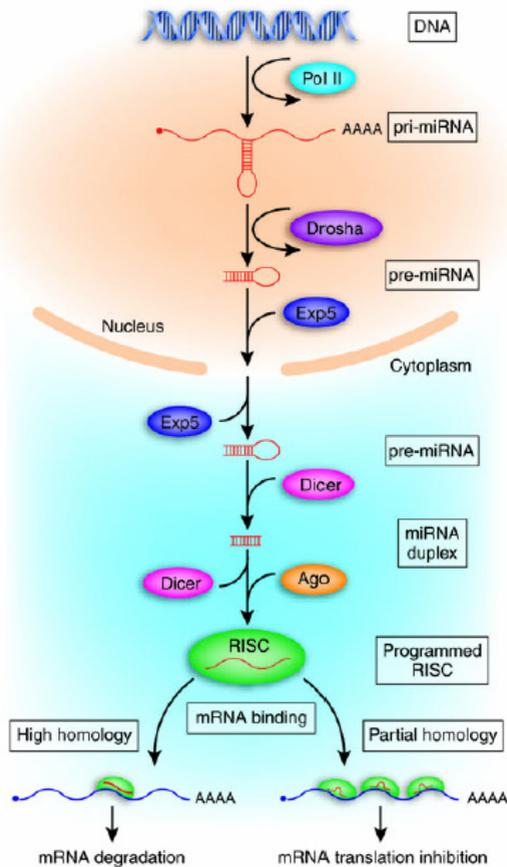


Abb. 5: Biogenese und Funktion humaner miRNAs

Transkription des DNA-Abschnitts durch die RNA Polymerase II in das Primärtranskript (pri-miRNA), Weiterprozessierung durch die zelluläre RNase III (Drosha) zur Vorläufer-miRNA (pre-miRNA), GTP-abhängiger Export aus dem Nucleus ins Zytoplasma mittels Exportin-5. Im Zytoplasma wird die loop-Struktur durch eine zweite zelluläre RNase III (Dicer) entfernt und der kurzlebige miRNA-Duplex entsteht, von dem der miRNA-enhaltende Strang in den Ago-haltigen RISC-Komplex eingebaut wird. Liegt eine vollständige Homologie zur mRNA vor, wird diese gespalten und degradiert, bei unvollständiger Homologie wird die Translation inhibiert. (Pol II: RNA Polymerase II; Exp5: Exportin 5; Ago: Argonaut; RISC: RNA-induced silencing complex). (Cullen, 2006).

1.2.5 Mechanismus

miRNAs führen generell zu einer Verringerung der posttranskriptionellen Genexpression. Dies kann auf zwei unterschiedlichen Wegen geschehen, abhängig vom Ausmaß der Komplementarität zwischen der Sequenz der miRNA und der Sequenz der Ziel-mRNA. So kommt es entweder zur Spaltung und Degradation der mRNA oder zur Hemmung der Translation ohne Abnahme der Menge an mRNA.

Ersteres tritt ein bei einer vollständigen Sequenzkomplementarität zwischen der 3'UTR der mRNA und der miRNA und entspricht somit dem Mechanismus der siRNA. Die Spaltung der Ziel-mRNA erfolgt zwischen der Position 10 und 11 vom 5' Ende der miRNA, unabhängig von der Länge der miRNA (Elbashir et al., 2001; Hutvagner and Zamore, 2002). Dabei bleibt die miRNA intakt, kann sich somit an weitere mRNAs binden und diese ebenfalls spalten (Hutvagner and Zamore, 2002).

Falls zwischen der miRNA und ihrer zugehörigen Ziel-mRNA nur eine ungenügende Komplementarität besteht, führt dies zu einer translationalen Repression. Dabei wird lediglich die Proteinmenge vermindert und die Menge an mRNA bleibt annähernd konstant. Das Polysomenprofil ist hierbei unverändert (Olsen and Ambros, 1999; Seggerson, Tang, and Moss, 2002).

Womöglich kommt es zu einer kooperativen Wirkung von mehreren RISC-Komplexen, denn meist sind mehrere komplementäre Bereiche zu der miRNA in der 3'UTR der mRNA bei Metazoen vorhanden (Abrahante et al., 2003; Lin et al., 2003; Reinhart et al., 2000). Von besonderer Wichtigkeit in der Erkennung der Ziel-mRNA ist die Komplementarität zum 5' Bereich der miRNA (Wightman, Ha, and Ruvkun, 1993).

Ein dritter Mechanismus zur Regulierung der Ziel-mRNAs durch miRNAs ist die Deadenylierung der Zielsequenz. Genaue Vorgänge sind hierbei noch nicht bekannt (Wu, Fan, and Belasco, 2006).

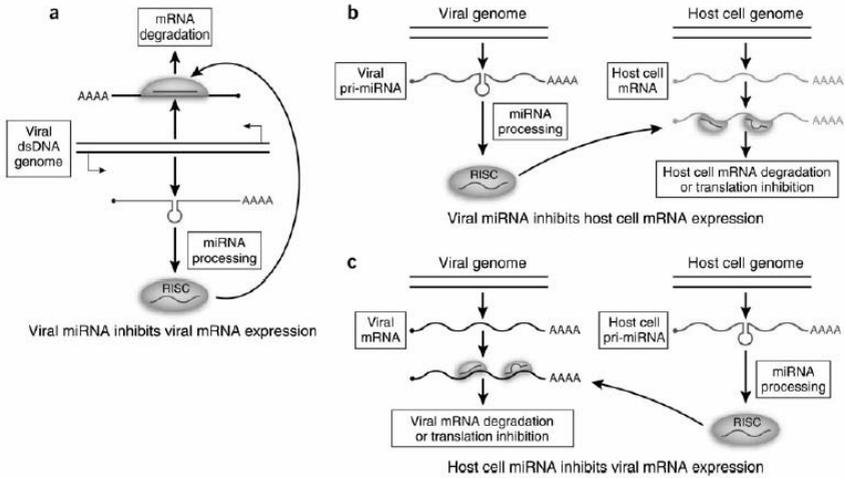


Abb.6: Potentielle Wirkmechanismen von miRNAs auf die Virusreplikation

- (a) Virale miRNAs können die Expression viraler mRNAs inhibieren. Hierbei handelt es sich um vollständig komplementäre mRNAs, die von dem Strang des viralen Genoms transkribiert werden, der dem miRNA-Gen gegenüberliegt. Allerdings ist ebenso eine Inhibition von mRNAs anderer Regionen des viralen Genoms möglich.
- (b) Inhibition zellulärer mRNAs durch virale miRNAs
- (c) Inhibition viraler mRNAs durch zelluläre miRNAs (z.B. miR-32 bei PFV (Lecellier et al., 2005); ebenfalls berichtet wird, dass die humane Leber-spezifische miR-122 die HCV-Replikation erleichtert (Jopling et al., 2005), genaue Mechanismen sind dabei unbekannt) (Cullen, 2006)

1.2.6 Funktion

Beim Großteil der bisher identifizierten miRNAs geht man davon aus, dass diese negative Regulatoren auf posttranskriptioneller Ebene darstellen. Um mögliche Ziel-mRNAs zu identifizieren wurden bisher verschiedene computergestützte Methoden verwandt (Enright et al., 2003; Lewis et al., 2003; Stark et al., 2003). Die Algorithmen der Computerprogramme suchen vor allem nach multiplen, konservierten Regionen innerhalb der 3'UTR mit einer Komplementarität zu den entsprechenden miRNAs. Dies ist besonders bei Säugetieren schwierig, denn es existieren nur wenige mRNAs mit beinahe vollständiger Komplementarität, d.h. die

Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse steigt. Beim Menschen sagt man vorher, dass etwa ein Drittel aller Gene potentielle Ziele für miRNAs sind (Lewis, Burge, and Bartel, 2005). Problematisch ist das richtige Herausfiltern der mRNAs, denn oft findet man eine angemessene Komplementarität, dann wiederum ist der betroffene Genabschnitt nicht konserviert. Allerdings kann die Zelle das Kriterium der Konservierung nicht zur Unterscheidung hinzuziehen, weshalb sich die Frage nach weiteren, möglichen Determinanten für die Spezifität stellt, neben der Stabilität der Basenpaarung. In Frage kämen beispielsweise die Protein- bzw. die Sekundärstruktur der mRNA, die einen wesentlichen Einfluss auf die Zugänglichkeit der 3'UTR durch die miRNPs haben.

Für einige zelluläre miRNAs sind bereits Ziel-mRNAs beschrieben, diese müssen allerdings immer experimentell validiert werden.

1.2.7 EBV-kodierte miRNAs und potentielle Zielgene

Pfeffer et al. erbrachten 2004 einen erstmaligen Nachweis, dass auch Viren miRNAs kodieren. Die Gruppe klonierte kleine RNAs aus einer Burkitt-Lymphom Zelllinie, die latent mit EBV infiziert war. Auf diese Art und Weise konnten fünf verschiedene EBV-kodierte miRNAs identifiziert werden (Pfeffer et al., 2004)

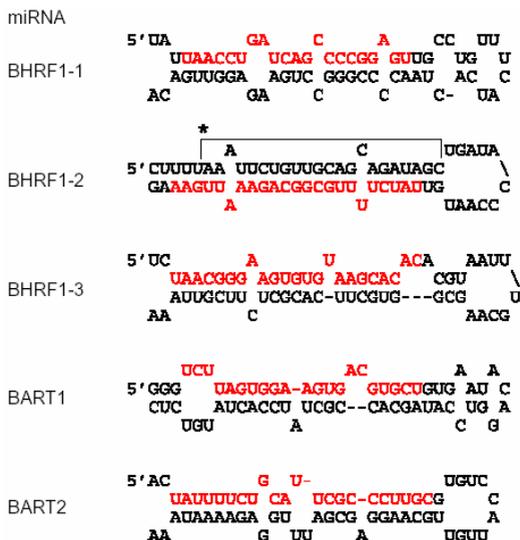


Abb. 7: EBV-kodierte miRNAs

Die Abbildung zeigt die fünf für das EBV-Genom vorhergesagt stem-loop pre-miRNAs, die reife miRNA ist rot hervorgehoben.

(Pfeffer et al., 2004)

Angeordnet sind diese miRNAs in zwei Clustern im EBV-Genom.

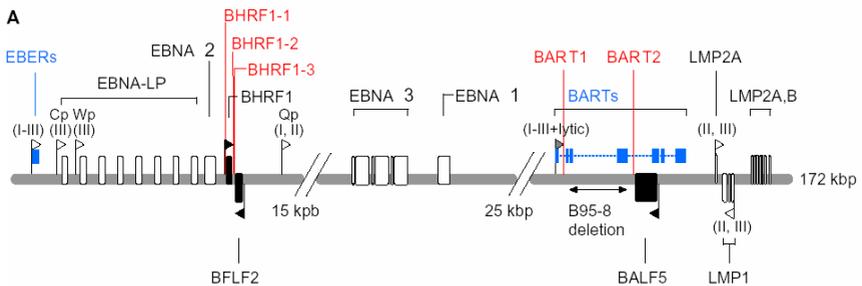


Abb. 8: Übersicht über die miRNA-enhaltenden Abschnitte des EBV-Genoms

Latente Gene sind in weißen Kästchen dargestellt, lytische Gene in schwarzen.

Bisher bekannte nicht kodierende RNAs (EBER-RNA) sind in blau gekennzeichnet, neu entdeckte miRNAs in rot.

Ebenfalls gekennzeichnet ist die Deletion in der für die anfänglichen Versuche verwendeten B95-8-Zelllinie.

(Pfeffer et al., 2004)

Im ersten Cluster liegt das BHRF1-Gen (Bam H1 fragment H rightward open reading frame 1), das für ein virales Homolog des zellulären, anti-apoptischen bcl-2-Proteins kodiert. Dabei liegt die miR-BHRF1-1 in der 5'UTR von BHRF1 und die miR-BHRF1-2 und 1-3 in der 3'UTR, die antisense zu BFLF2 transkribiert werden. Somit besteht zwischen den miRs BHRF1-2 und 1-3 eine 100%ige Komplementarität zu ihrem Ziel BFLF2; sie tragen die Funktion einer siRNA und es kann eine 80-90%ige Verringerung der Aktivität der BFLF2-3'UTR nachgewiesen werden (Daten nicht veröffentlicht, Doktorarbeit von Frau Petra Goutier).

Dagegen liegen die miR-BART 1 und miR-BART 2 in Introns des Gens BART (Bam H1-A region rightward transcript). In der latenten Phase sind die beiden miRNAs

Bindungsstellen für virale miRNAs auf und etwa die Hälfte besitzt ebenfalls Bindungsstellen für zelluläre miRNAs. Die entdeckten Zielsequenzen liegen beispielsweise in Genen, die als Regulatoren der Zellproliferation und der Apoptose dienen, die als Transkriptionsfaktoren und Komponenten von Signaltransduktionswegen dienen oder B-Zell spezifische Chemokine oder Zytokine beeinflussen.

Die miR-BART 2 wird exakt antisense zum BALF5 Transkript (the fifth leftward open reading frame of the Bam H1-A fragment) abgelesen und weist somit eine perfekte Komplementartität zur BALF5-3'UTR auf (Pfeffer et al., 2004).

Bereits in früheren Studien konnten in Northern Blot-Analysen zwei unterschiedlich große Transkripte der BALF5 mRNA nachgewiesen werden. In den Zellstämmen P3HR1, Raji, W-91 und FF-41 fand die Gruppe um Pagano ein Fragment der Länge 5,08kb, in B95-8 Zellen war das Fragment nur 3,7kb groß (Furnari, Adams, and Pagano, 1992). Dabei ist das 3' Ende des kürzeren Fragments genau die vorhergesagte Schnittstelle durch die miR-BART2, die vermutlich den schon damals postulierten viral kodierten Faktor darstellt.

Was der Gruppe ebenfalls auffiel war, dass bei B95.8-Zellen eine alleinige Salzstimulation ausreicht, um BALF5, und somit den lytischen Zyklus, zu stimulieren; Raji-Zellen dagegen mussten mit TPA stimuliert werden (Furnari, Adams, and Pagano, 1993). Dies lieferte bereits erste Hinweise darauf, dass sich die beiden Zelllinien hinsichtlich ihres miRNA-Profiles unterscheiden. Allerdings lieferte erst im Jahr 2006 die Gruppe um Cai eine mögliche Erklärung dieses Phänomens. In den hier durchgeführten Studien an einer EBV-infizierten PEL-Zelllinie (primary effusion lymphoma) wurden insgesamt 17 EBV-kodierte miRNAs gefunden, von denen der größte Teil in der deletierten Stelle des BART-Gens in den von Pfeffer verwandten B95.8-Zellen liegen (Cai et al., 2006).

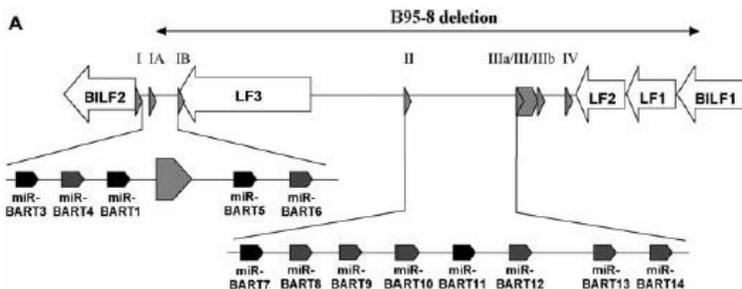


Abb. 9: Genomische Lokalisation des EBV BART miRNA-Clusters

Nicht abgebildet ist die miR-BART2, die am 3'Ende der anderen BART miRNAs positioniert ist (152.747 bis 152.768bp)

Gezeigt wird außerdem die Ausdehnung der BART-Gendeletion des EBV B95-8 Stammes.

Genabschnitt von 137.490 bis 152.641bp

(Cai et al., 2006)

Neuere Studien der Gruppe um Grundhoff hat mittels eines verbesserten Computerprogramms insgesamt 22 EBV-kodierte miRNAs vorhergesagt (Grundhoff, Sullivan, and Ganem, 2006). Davon liegen 14 miRNAs in der B95.8-Deletion, eine zum Teil. Die miR-BART 3, 4 und 5 liegen zwar außerhalb der Deletion, wurden aber von Pfeffer nicht kloniert.

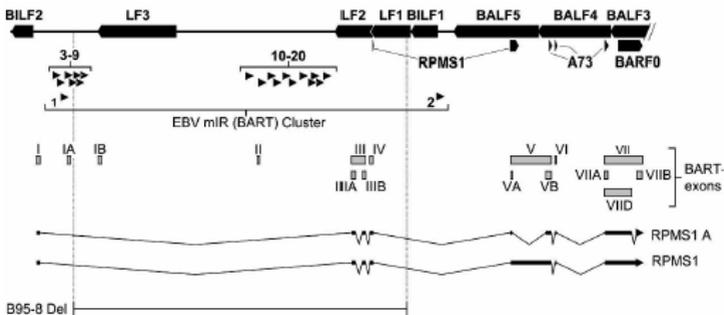


Abb.10: Genkarte des BART-Locus von EBV

Die 18 neu entdeckten BART pre-miRNAs sind als kleine schwarze Pfeilköpfe dargestellt, die nach rechts zeigen. Die zuvor von Pfeffer et al. 2004 entdeckten pre-miRNAs BART1 und BART 2 sind darunter abgebildet.

(Grundhoff, Sullivan, and Ganem, 2006)

Auffällig ist die Tatsache, dass vom BART-Locus viele unterschiedlich gespleißte Transkripte, ausgehend von verschiedenen Promotoren, abstammen, deren Kodierungspotential bislang unbekannt bleibt, die aber eventuell als pri-miRNAs dienen können (Chen et al., 1992; Chen and Meister, 2005; Gilligan et al., 1990; Gilligan et al., 1991; Hitt et al., 1989); (Brooks et al., 1993; Sadler and Raab-Traub, 1995; Smith et al., 2000; Smith et al., 1993; Sugiura et al., 1996).

Fraglich bleibt, ob die verschiedenen BART miRNAs, die bis auf die miR-BART2 (4. Intron) im 1. Intron liegen, alle gleichzeitig exprimiert werden. Es wird vermutet, dass miRNAs in der Deletionsstelle der B95.8-Zellen unter anderem zur Aufrechterhaltung der Latenz verantwortlich sind. Grundhoff beschreibt dagegen eine stabile Latenz der B95.8-Zelllinie, bei der eine lytische Replikation *in vitro* induziert werden kann. Deshalb wird vermutet, dass die fehlenden miRNAs für die Aufrechterhaltung der Latenz nicht essentiell sind oder dass ihre Funktion durch andere miRNAs ersetzt werden kann (Grundhoff, Sullivan, and Ganem, 2006).

Einleitung

```

MD1446 / miR-BART3 (139065-139163)
UU UAA GA A U UAAUU
//GGCA GU CCUUUGGUG ACCU GUG UUAGUG UGUGCUG A
//CGC CA GGAGGCCAC UGGA CAG GAUCAC ACCGCAC A
U- UC- UG C U C CUGUG

MD1448 / miR-BART4 (139207-139306)
UCU ACA G A - AA
//GGC GUA UUUGGUGG ACCUU UGC UGC UGUGUGUCU GUA U
//UCCG CAU GGACCACU UGGAC AGC AUG ACUACRAGA CGU A
UU- CG- G C G C UC GA

MD1452 / miR-BART5 (139507-139584)
CCG GG-- U C AG UU
UGUG CUU AGGAAACA GACCAC UGA UCUG A
ACAC GAG UUCCUUUGU UUGUG ACU GGAC -
A-- AUAG----- CA

MD1453 / miR-BART6 (139657-139755)
-- UC G CUCA AU U AC A G
//UGAU GC UGUG CAC AGGUGA AUAGC GCCCAUCG GU UC C
//ACUG UG ACGC GUG UCCACU UGUG CGGGUGGC CA AG U
UC GA A AAA-- -- C -- A G

MD1456 / miR-BART7 (139776-139874)
CUU- G A UUA G U UUUAA
AGG UCAG UUGUG AU GAUAGA GGUGU GUG UCUUG U
UCC AGUU ACACC UA CUUUCU CCCAC CAC AGAAC -
AAAU A C UAC -- - U CACAU

MD1457 / miR-BART8 (139895-139994)
AAC A- GCA - A UUUUU
//UUG AGG UGUG CC CUAAG GGACG AGGCAUACAAGG A
//GAU UCC ACGC GG GAUUC CCUGU UCGUAGUUGCC C
GGA GG AG- U C G UGACC

MD1458 / miR-BART9 (140012-140110)
AG A UUGG A AUA C U
GC UG CCUUG UACUUUAGGUGUCC AUCC GG UUUUU U
CG AC GGAAC AUGAGAUCCGCAAGG UAGG CC AAAAG G
A- C UCA- C GG- C U

MD1510 / miR-BART10 (145942-146040)
AAGA-- UC CUC- C U U U
//UGA CGGGUG CUGG AAGUUGC ACUUCU AUACAG GU A
//GCU GCUCAU GACC UUCGGGU UGAAGG UAUUU CG A
GUAUAU GU CUGC U C C A

MD1515 / miR-BART11 (146420-146518)
- - - UC A - U AA A CU
//GUG GA UCC AGUG CUG UCCUGGAC CU GACUAUGA CA UU A
//UAC CU AGG UCAC GAC GGGACCUG GA CUGAUUCU GU AA A
U GA C GU A U C AC A AA

MD1518 / miR-BART12 (146759-146840)
U A UU C - AUGAA
UGGGU CACG UUACGG UC UAGAUUU ACAG C
AUUCG GUGAC GAUCU GG AUUUAACA UGUC -
U A GG U C AAGAU

MD1521 / miR-BART13 (146939-147037)
A GG U-- UG U - U GAA UAAUU
//A UGU CAGC GUUUUO UAC GGACCC UGAA UG ACAG U
//U AUA GUGC CAACAG AUG CCUGG ACUO AC UGUC -
- A- UUU UG C U C AA- UUAGG

MD1526 / miR-BART14 (147301-147400)
---- - UC G C U C UAUUU
//CCC CAGA GGAGG CCG GGCCA CUCU UGGUU UGUACA U
//GGG GUCU CCUCAG CCG UUGU GAGG ACCAA ACUAGU -
AAUG A GU U----- UAUUG

MD1528 / miR-BART15 (147520-147618)
CU---- U-- U A C UA G U
//AC GGUU CUGUUGG CAG CAGUUGUGG GC GUUGU UGC U
//UG CCGG GACGAUUC GUC GUGGACCAC CG CAACG ACG -
UUAUUUC UGU C A U A----- A

MD1533 / miR-BART16 (147877-147976)
-- - CGUGUGA C - CAU C AUUC
//GU UCC GUGUA CUUAA ACC CGCC CACCAC GGACAG U
//CA AGG GCCAU GGGUU UGG GUGG GUGGUG CCUGUU -
UG A G----- U UUU U CAAG

MD1535 / miR-BART17 (148195-148294)
U- A U U CRA C- U GGUUA
//AC GU UCCG GUUCGA CAUUCUCC GCAAACA GACAUG A
//UG CG AGGU CGGGAU GUAAGG CGUUUGU UGUCAC U
UU A C CUC UU U AAAUU

MD1537 / miR-BART18 (148319-148417)
- CGU-- - U U A U UG- U
UACA GG AGG GCC AU GUAGCAGC UGUCUUAU CC CG A
AUGU CC UCC CGG UA CAUUGUCCG ACCGGAAGUA GG GC -
A UUUUU A U C AC C UAA C

MD1540 / miR-BART19 (148508-148601)
AC C A A G G UCG- -- U
//CA UUGGGCAC UCG UA CCG CUC UGCG UACAGA CGA U
//GU GAUUGUG AGC GU GGC GGG ACCG AUGUCU GGU G
CU U A C A - UUCA CG U

MD1542 / miR-BART20 (148721-148820)
UG AUGUU G- G-- UA - CG----- UAAU
//A AG CAGG GUG CCGG CCUUC ACUGC AUUUACA A
//U UC GUCC CGC GGUC GGAUG UGACG UAAUUGU U
CA ---- AG GCA UA A UCG----- UAAA

```

Abb.11: Vorhergesagte Hairpin-Struktur der neuen EBV pre-miRNAs

Genomische Position in Klammern (GenBank-Eintrag: AJ507799)
 Fettgedruckte Buchstaben: Abschnitte die komplementär zu den
 Oligonukleotiden sind, die für die Northern Blots verwendet wurden.
 Die vermutliche Position der reifen miRNAs ist in gestrichelten Klammern angegeben.
 Entnommen aus: (Grundhoff, Sullivan, and Ganem, 2006)

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte der regulatorische Einfluss der mit bioinformatischen Methoden vorhergesagten EBV-kodierten mikroRNA BART2 auf ihre Ziel-mRNA BALF5, der viralen DNA-Polymerase, *in vivo* untersucht werden (Pfeffer et al., 2006). Ausgehend von Literaturdaten wird vermutet, dass die miRNA-BART2 ihre perfekt komplementäre Ziel-mRNA spaltet und somit die Proteinexpression von BALF5 vermindert wird. Hierzu wurden zunächst die notwendigen Effektor- und Reporterkonstrukte hergestellt. Als geeigneter Vektor zur Expression der miR-BART2 wurde der Vektor „pSG5“ eingesetzt, als Reporter der Vektor „pGL3-Promotor“. In diesen wurde im unmittelbaren Anschluß an den Luciferase ORF (open reading frame) die 3'UTR (3' untranslated region) des BALF5-Gens inkloniert. Diese Konstrukte wurden zur Überprüfung der Proteinexpression von BALF5 im Luciferase-Reporter-Assay verwendet.

Ein zweiter Abschnitt der Arbeit beschreibt die Gewinnung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen das BALF5-Protein, die zur Überprüfung der Regulation der miRNA-BART2 auf die Proteinmenge der viralen DNA-Polymerase genutzt werden sollten. Die EBV-kodierten miRNAs stehen vermutlich im Zusammenhang mit der Etablierung und Aufrechterhaltung der viralen Latenz, wobei hier im Besonderen der Einfluß auf die DNA-Polymerase von Interesse ist, denn diese gehört zu den early genes der lytischen Virusreplikation. Hierzu wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Elisabeth Kremmer, GSF München, Ratten mit BALF5-spezifischem Peptid immunisiert und die gewonnenen Antikörper in unserer Arbeitsgruppe charakterisiert. Die verschiedenen Klone wurden auf ihre spezifische Erkennung des BALF5-Volllängenproteins in der Western Blot Analyse, der Immunpräzipitation und der Immunfluoreszenz überprüft. Positiv getestete Antikörper standen für nachfolgende Experimente zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde weiterhin untersucht, ob es durch das Abfangen der EBV-kodierten mikroRNAs mittels antisense 2'O-Methyl-Oligonukleotiden möglich ist, Zellen aus ihrem latenten Stadium in den lytischen Zyklus zu überführen. Dies wäre für neuer Methoden der Tumorthherapie von Interesse, denn bei lymphoproliferativen Tumorerkrankungen, die mit einer EBV-Infektion im Zusammenhang stehen, befinden sich die Viren in einem Latenzstadium. In diesem entgehen sie der EBV-spezifische zytotoxischen T-Zellabwehr und das Virus kann vom Organismus nicht eliminiert werden.

2 Material

2.1 Chemikalien, Membranen, Filter

Acrylamid	Serva (Heidelberg)
Agarose	Seakem (Rockland, USA)
Amidoschwarz	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampicillin (Binotal™)	Bayer (Leverkusen)
Bactoagar	DIFCO
Bisacrylamid	Serva
Bromphenolblau	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs Inc. (NEB)
Chloroform	Roth
Dichlor-diphenyl-trichlorethan (DDT)	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Enhanced Chemoluminescence Western Blotting Detection System (ECL™)	Amersham(Freiburg)
Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Ethidiumbromid	Sigma
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH
Gamma- ³² P-ATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytik
Trans- ³⁵ S-Label (>1000 Ci/mmol)	MP Biomedicals
Glycin	Serva
Hybond N+ Membran	Amersham Biosciences
Hyperfilm ECL™	Amersham Biosciences
Isopropanol	Roth
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Novagen
Magermilchpulver	Glücksklee (Hamburg)
3-Mercapto-1,2-Propandiol	Sigma

Natriumjodid	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schuell
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva
Nukleotide (dNTPs)	Boehringer (Mannheim)
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-4-Chlor-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 analysenreiner Form bezogen.

2.2 Puffer und Lösungen

Amidoschwarz-Färbelösung	:	Isopropanol 25,0% (v/v) Essigsäure 10,0% (v/v) Amidoschwarz 0,1% (w/v)
Blaumarker	:	Bromphenolblau 0,25% (w/v) Glycerol 50% (v/v) EDTA 50mM
Blocking-Puffer	:	Magermilchpulver 5% (w/v) in PBS-Puffer

Material

Bottomgel-Stock (für SDS-Gele)	:	Tris-HCl pH 8,8 1,5 M SDS 0,4% (w/v)
2xBromphenolblau Ladepuffer (für NB Gel)	:	Harnstoff 8M EDTA 0,05% (pH8,0) Bromphenolblau (0,2-0,4 mg/ml)
50xDenhardt's Lösung (Sigma)	:	BSA 1% Polyvinylpyrrolidon K30 Ficoll 400
Elvanol (Polyvinyl-Alkohol)	:	Elvanol 5g PBS 80ml Glycerin 40ml
Entfärbelösung für Amidoschwarz	:	Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure 10% (v/v)
Ethidiumbromidlösung	:	Ethidiumbromid 10 mg/ml H ₂ O
Hybridisierungslösung (miRNA NB)	:	20xSSC 7,5ml 1M Na ₂ HPO ₄ (pH7,2) 0,6ml 10% SDS 21ml 50xDenhardt's Lösung 0,6ml Heringssperma 0,3ml
Laufpuffer	:	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

Material

		CaCl ₂ 1 mM
		Na-K-Phosphat 10 mM
SequaGel™ Konzentrat (für NB-Gele)	:	237,5 g/l Acrylamid 12,5 g/l Methylen-Bisacrylamid Harnstoff (deionisierte wässrige Lösung)
SequaGel™ Verdünner	:	Harnstoff (deionisierte wässrige Lösung)
SequaGel™ Puffer	:	0,89 M Tris-Borat 20 mM EDTA Puffer (pH8,3) Harnstoff (deionisierte wässrige Lösung)
2 x SDS-Probenpuffer (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)
20xSSC-Puffer	:	NaCl (3M) 175,32g/l Tri-Na-Citrat-2'Hydrat (0,3M) 88,23g/l pH 7,0
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 0,5 mg/ml (Zugabe vor Gebrauch)
TAE-Puffer 50x	:	Tris 2 M

		Natriumacetat 25 mM
		EDTA 0,5 M
		ad pH 7,8 mit Essigsäure
TBE-Puffer 10x	:	Tris/Borat pH 8,3 0,89 M
		EDTA 0,25 M
TE-Puffer	:	Tris 10 mM
		EDTA 1 mM
		ad pH 7,6 mit Essigsäure
Transferpuffer	:	Tris/HCl 25 mM
		Glycin 192 mM
		Methanol 20% (v/v)
		SDS 0,05% (w/v)
Uppergel-Stock (für SDS-Gele)	:	Tris-HCl pH 6,8 0,5 M
		SDS 0,4% (w/v)

Zusätzliche Puffer werden bei der jeweiligen Methode genannt.

2.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP)	Roche
DNase I	Roche
Lysozym aus Hühnereiweiß	Roche
Polynukleotidkinase (PNK)	New England Biolabs Inc. (NEB)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs Inc. (NEB)
RNase A	Roche
T4-DNA-Ligase	Promega
Taq-Polymerase	General Electric (G.E.) oder Sigma

Viralex Trypsin/EDTA

PAA Laboratories GmbH

2.4 Größen- und Molekulargewichtsmarker

2.4.1 DNA-Größenmarker

Bei der Agarosegelelektrophorese wurde als Längenstandard zur Größenbestimmung doppelsträngiger, linearer DNA-Moleküle die 1Kb-Plus Ladder (New England Biolabs) verwendet. Der Marker enthält folgende Fragmentgrößen: 12000 , 11000 , 10000 , 9000 , 8000 , 7000 , 6000 , 5000 , 4000 , 3000 , 2000 , 1650, 1000 , 850 , 650 , 500 , 400 , 300 , 200 , 100 bp.

2.4.2 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

2.4.3 ¹⁴C- Proteinmarker

Myosin	220 kDa
Phosphorylase b	97,4 kDa
Kälberserumalbumin	66 kDa
Ovalbumin	46 kDa
Carboanhydrase	30 kDa
Lysozym	14,3 kDa

2.5 Antikörper

2.5.1 Primärantikörper

Die monoklonalen Antikörper (Ratte, IgG), die gegen das Epitop des EBV-kodierten Proteins BALF5 gerichtet sind, wurden in Kooperation mit Frau Dr. Elisabeth Kremmer (GSF, München) hergestellt. Weiterhin wurde der monoklonale, GST-spezifische Antikörper 6G9-4-1 verwendet und der monoklonale Borna-Antikörper 5F11, welche von Frau Dr. Elisabeth Kremmer zur Verfügung gestellt wurde.

Die verschiedene BALF5-Antikörper-Klone wurden in der Verdünnung 1:10 eingesetzt.

Die beiden Antikörper anti GST 6G9-4-1 und anti BDV p40 5F11 (Grässer und Kremmer, nicht veröffentlicht) werden an Protein G-Sepharose-gekoppelt in der Immunopräzipitation eingesetzt.

2.5.2 Sekundärantikörper

Die Meerettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper anti Ratte-Pox (Kaninchen) und anti Maus-Pox (Ziege) werden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen und in der Regel in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Der in Kaninchen gewonnene anti Ratte FITC-Antikörper (Sigma) wird 1:200 verdünnt eingesetzt.

2.6 Zelllinien

293T : Diese humane Nierenepithelzelllinie leitet sich von 293 Zellen ab, die stabil mit einer temperatursensitiven Mutante des SV40 T-Antigens transfiziert wurden. Sie exprimieren konstitutiv das große T-Antigen des SV40 Virus und zeichnen sich durch eine hohe Transfizierbarkeit aus.

- BL41: EBV-negative Burkitt-Lymphom B-Zelllinie, die aus Tumormaterial eines 8jährigen Patienten mit Burkitt-Lymphom etabliert wurde (Lenoir, Vuillaume, and Bonnardel, 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, Vuillaume, and Bonnardel, 1985).
- Raji : Nichttransformierende EBV-Typ1-positive Non-Producer-BL-Zelllinie mit einer Deletion im EBNA3C-Bereich und der Burkitt-Lymphom-typischen t(8;14) Chromosomentranslokation (Epstein et al., 1966)
- B95-8 : EBV-positive lymphoblastoide Zelllinie (LCL) aus *in vitro* EBV-Typ1-immortalisierten B-Zellen eines Krallennaffen (Miller and Lipman, 1973)
- HeLa: Diese Zelllinie wurde aus einem zervikalen Adenokarzinom einer 31 Jahre alten Patientin etabliert (Scherer et al., 1971).

2.7 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.

2.8 Nähr- und Kulturmedien

2.8.1 Nährmedien für Bakterien

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

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

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

2.8.2 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) und einem Antibiotikagemisch aus 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 und einem Antibiotikagemisch aus 40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat versetzt.

2.9 Vektoren

2.9.1 pGem™-T Vektor

Der pGem™-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 12 dargestellt.

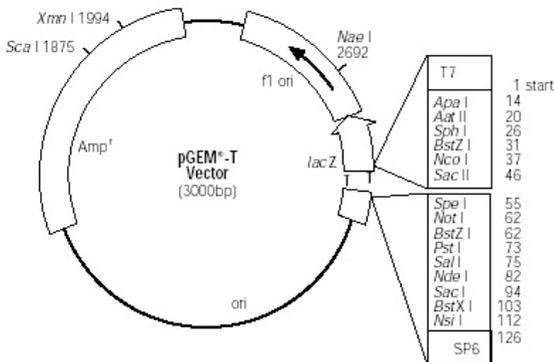


Abb.12: Vektorkarte des pGEMTM-T Vektor

2.9.2 pSG5 Vektor

Der pSG5 Vektor der Firma Stratagene wird überwiegend für die Expression von Proteinen im eukaryotischen System eingesetzt. Der Vektor zeichnet sich durch eine hohe Transkriptionsrate aus, die große Mengen an 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 drei „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 13 zu sehen.

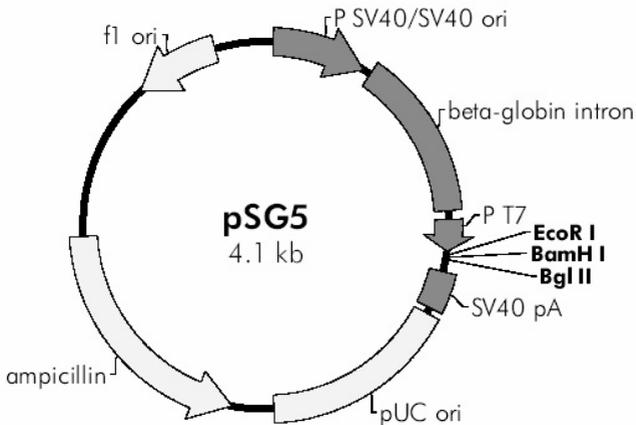


Abb. 13: Vektorkarte des pSG5 Vektors

2.9.3 pEGFP-C1 Vektor

Eukaryoter Expressionsvektor (4,7 kbp, Clontech) zur transienten oder stabilen Kanamycin-/Neomycin-selektierten Expression. Einklonierte cDNAs werden durch den enthaltenen CMV-Promotor als EGFP (enhanced green fluorescent protein)-Fusionsprotein exprimiert. Der EGFP-Anteil kann hierbei sowohl N-terminal als auch C-terminal angefügt werden. Durch Anregung bei einer Wellenlänge von 488nm kann die maximale Emission des EGFP-Chromophors bei 507nm durchflußcytometrisch oder fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden. Somit können z.B. bei Cotransfektionen mit anderen Plasmiden deren Transfektionsraten bestimmt werden. Die schematische Abbildung des Vektors ist in Abbildung 14 zu sehen.

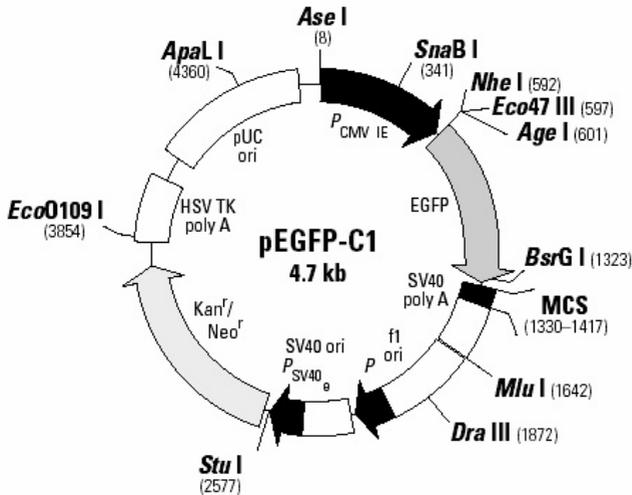


Abb. 14: Vektorkarte des pEGFP-C1 Vektors

2.9.4 Der Vektor „pGL3-Promotor“

Hierbei handelt es sich um einen 4,8 kb großen eukaryotischen Expressionsvektor, der für die Firefly-Luciferase kodiert (Promega). Diese steht unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Der Vektor dient zur quantitativen Analyse von Faktoren, die einen Einfluss auf die Genregulation in Säugerzellen besitzen. Diese Faktoren können sowohl cis-regulatorische Elemente als auch trans-regulatorische Elemente sein. Hierzu zählen z.B. Enhancer und 3'UTR's mit regulatorischen Funktionen als auch DNA-bindende Faktoren. Der Vektor besitzt als Selektionsmarker ein Ampicillinresistenzgen und verfügt desweiteren über einen Replikationsursprung („ori“) zur Replikation in Bakterien und einen „f1 ori“ zur Herstellung einzelsträngiger DNA. Dem Luciferasegen vorgeschaltet befindet sich die „multiple cloning site“ (MCS); nachgeschaltet ein „SV40 late polyA signal“ zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Der schematische Aufbau des Plasmids ist in Abbildung 15 zu sehen.

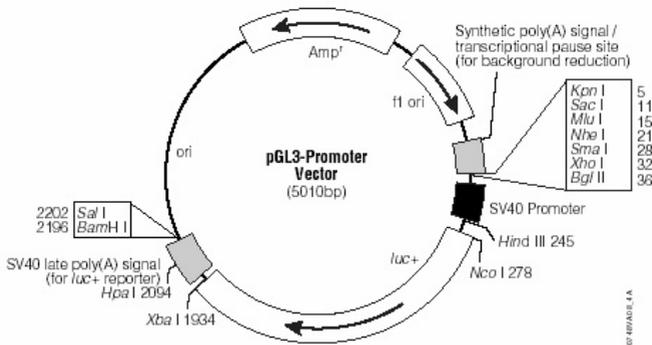


Abb. 15: Vektorkarte des pGL3-Promoter Vektors

2.9.5 Effektorplasmide

pGL3-Prom-BALF5-3'UTR

Dieser Vektor leitet sich vom Vektor „pGL3-Promotor“ ab. Die komplette 3'UTR des BALF5 Gens wurde unmittelbar hinter die kodierende Sequenz der Firefly-Luciferase kloniert. Dieses Reportergenkonstrukt diente zur quantitativen Bestimmung des regulatorischen Einfluss von miR-BART2 auf die Expression des Luciferase-Gens mit der 3'UTR von BALF5. Die 3'UTR wurde unter Einsatz der Primer BALF5-3'UTR-for und BALF5-3'UTR-rev aus genomischer B95.8-Zell-DNA mittels PCR amplifiziert und über die XbaI Schnittstelle einkloniert.

pSG5-Bart2

Dieses Plasmid diente zur Expression der BART2 miRNA in Säugerzellen. Mittels PCR wurde mit den Primern BART2pSG5' und BART2pSG3' das miRNA-BART2-kodierende Fragment aus genomischer B95.8-Zell-DNA amplifiziert und über die EcoRI Schnittstelle einkloniert. Das Insert beinhaltet die Sequenz des miR-BART2 Vorläufers und flankierende Sequenzen 82 bp stromaufwärts und 98 bp stromabwärts gelegene Sequenzen.

pSG5-miR155

Dieses Plasmid dient zur Expression der miR-155 in Säugerzellen. Es wurde von Frau Petra Goutier (Tierärztin) mittels der Primer 5'Eco miR155 und 3' Bgl miR155 ein 240bp Insert genomischer BL41-Zell-DNA hergestellt und über EcoRI Schnittstelle inkloniert. Es dient in den Luciferase-Reporter-Gen-Assays als Negativkontrolle.

2.10 Synthetische Oligonukleotide

Zur PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden die im folgenden aufgeführten Primer eingesetzt. Die hier verwendeten Oligonukleotide wurden entweder von der Firma MWG-Biotech oder Operon bezogen. Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

BALF5-3'UTR-for	gct <u>ctagat</u> ctggggcctgagactggacc
BALF5-3'UTR-rev	gct <u>ctagagg</u> gagtagaccagacaaacacgccc
BART2-pSG5'	gtc <u>gaattc</u> gggtggtgtctgcagcaaaag
BART2-pSG3'	tct <u>gaattc</u> agatctgcttcagacagccggttg
5'Eco miR155	cg <u>ccaattc</u> caggaaggggaaatctgt
3'Bgl miR155	cg <u>ccaattc</u> agatctgtttatccagcaggggtgactc

Zur Herstellung ³²P-markierter DNA Sonden zum Nachweis der mikroRNAs im Northern Blot wurde folgende Oligonukleotide verwendet:

BART2	5'-auaaaagacguaagcggaacg-3'
miR155	5'-aauuacgauuagcacuaucgcc-3'.

2.11 BALF5-Peptidsequenz

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das EBV-kodierte Protein BALF5 wurden durch die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Elisabeth Kremmer (GSF, München) Ratten mit einem KLH-gekoppeltem BALF5-Peptid immunisiert. Die verwendete Peptidsequenz lautet:

DGKGMWWRQRAQEGTARPEADT

Das Peptid wurde vom Peptide Specialty Laboratory (PSL, Heidelberg) hergestellt.

2.12 Computersoftware

Zur Textverarbeitung diente Microsoft Word 2000™ (Microsoft Corp.). Grafiken wurden mit dem Microsoft Photo Editor 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/searchlauncher/launcher.htm/), sowie angeschlossener Dienste durchgeführt. Die statistische Auswertung von Daten erfolgte mit Hilfe der Programme Sigma Plot 4.1 für Luciferaseassays sowie CellQuest 3.1 (BD Bioscience) für FACS-Analysen.

Zur Literaturrecherche dienen die PubMed (www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/)- und die Medline (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/medline.html)- Datenbanken.

Im Institut für klinische Biochemie und Molekularbiologie (Herr Dr. Martin Jung) wurde zur Auswertung der radioaktiv-markierten Gele im PhosphorImager™SF (Molecular Dynamics) die Software Image Quant 5.1 verwendet.

Die Bearbeitung der immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit Axio Vision 3.0.

3 Methoden

3.1 Methoden bakterieller Zellkultur

3.1.1 Aufzucht und Lagerung von Bakterien

Um Plasmide in größeren Mengen aufziehen zu können, werden Bakterien mit einem entsprechenden Plasmid transfiziert. Die Bakterien werden in eine entsprechende Menge LB-Medium angeimpft. Ebenso können Bakterien aus der Stammhaltung (DMSO-Stocks) benutzt werden, um das Medium anzupfen. Auf LB-Agarplatten werden Bakteriensuspensionen zur Aufzucht zu analytischen Zwecken ausplattiert und über Nacht (12-16 Stunden) bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien dienen dann zum Beimpfen von 2,5ml LB-Nährmedium. Die so entstandene LB-Suspensionskultur wird wiederum über Nacht bei 37°C aerob auf dem Schüttler inkubiert. Mittels Ampicillin (100µg/ml) in den LB-Agarplatten bzw. in der LB-Suspensionskultur können Bakterien selektiv kultiviert werden. Zur Konservierung werden 800µl der Übernachtskultur mit 20% (v/v) DMSO versetzt. Diese werden bei -70°C eingefroren und gelagert. Kurzfristig können Bakterien in Form von Zellkolonien auf mit Parafilm abgedichteten Agarplatten gelagert werden.

3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

(CaCl₂/RbCl-Methode; Kushner, 1978)

Normale Bakterien besitzen Abwehrmechanismen, um sich vor der Aufnahme von Fremd-DNA zu schützen. Da sich Bakterien aber schnell vermehren können und somit auch ihre DNA schnell replizieren können möchte man sich diese Fähigkeiten für das genetische Arbeiten zunutze machen, v.a. für die Amplifikation bestimmter Plasmid-DNA. D.h. man benötigt hierzu Bakterienzellen, die in der Lage sind, fremde Plasmid-DNA aufzunehmen. Dies wird durch eine Kompetenzinduktion der Bakterienzellen erreicht. Man bedient sich eines Verfahrens, das durch chemische Einflüsse die Bakterienzellwand durchlässig macht und DNA so in die Zelle eingeschleust werden kann.

Hergestellt werden transformationskompetente Bakterien nun durch Animpfen bereits kompetenter Bakterien in 30ml SOB-Medium. Diese Vorkultur wird über Nacht bei 37°C aerob auf dem Schüttler inkubiert. Am darauffolgenden Morgen werden 200ml SOB-Medium mit 8ml der Vorkultur versetzt und solange bei 37°C aerob auf dem Schüttler inkubiert, bis sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und die Suspension eine optische Dichte bei 600nm (OD600) von 0,3 erreicht hat. Bis zum fünfminütigen Abzentrifugieren der Bakteriensuspension bei 2000 rpm und 4°C (Heraeus Megafuge 1.0 RF) wird diese in 50ml Aliquots 15 Minuten auf Eis gehalten. Anschließend werden die Bakterienpellets in 16ml Transformationspuffer 1 resuspendiert und erneut 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es schließt sich ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 4°C und 2000 rpm für 5 Minuten an (Heraeus Megafuge 1.0 RF). Der abschließende Schritt ist die Resuspendierung in Transformationspuffer 2 und die Aliquotierung zu je 200µl. Die Aliquots werden unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefrosten. Die Lagerung erfolgt bei -70°C.

Transformationspuffer 1 : RbCl 0,10 M

MnCl₂·4H₂O 0,05M

CaCl₂·2H₂O 0,01 M

CH₃COOH (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

CaCl₂·H₂O 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

3.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

(Lederberg and Cohen, 1974)

Mit dem Begriff Transformation bezeichnet man die Überführung freier, löslicher DNA in eine dafür kompetente Bakterienzelle. Je nach Art der zu transformierenden Empfängerzelle sind die Methoden zur Kompetenzerzeugung und der Transformation unterschiedlich. Die eingesetzte, zirkuläre Plasmid-DNA trägt immer die Information für die selbständige Replikation sowie Gene, die der Zelle eine bestimmte Resistenz gegen bestimmte Antibiotika verleihen. Dies sichert die erfolgreiche Selektion von transformierten Zellen.

Zur Transformation wird zunächst ein Aliquot der kompetenten Bakterien aufgetaut. Etwa 60µl werden für 20ng Plasmid-DNA bzw. für 250ng DNA aus einem Ligationsansatz benötigt. Nach dem Zusammenbringen der Bakterien mit der zu transformierenden DNA wird das Gemisch 20 Minuten auf Eis inkubiert. In dieser Zeit hat die DNA Gelegenheit sich an die Zelloberfläche der Bakterien anzulagern. Die Bakterienzellwand wird permeabilisiert durch einen Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden im Wasserbad; zu diesem Zeitpunkt kann die DNA in die Zelle eindringen, denn bereits nach 2 Minuten Abkühlen auf dem Eis lässt die Permeabilität wieder nach. Anschließend werden dem Bakterienansatz 400µl eines LB-Mediums ohne Antibiotikazusatz zugegeben und diese Vorkultur bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nun können die transformierten Bakterien auf antibiotikahaltige LB-Platten ausplattiert werden bzw. kann damit ein entsprechendes LB-Medium damit angeimpft werden. Die Bebrütung erfolgt über Nacht bei 37°C. Die antibiotikafreie Vorkultur ermöglicht den durch den Hitzeschock gestressten Bakterien, die exponentielle Wachstumsphase schneller zu erreichen. So will man die Bakterienausbeute erhöhen.

3.1.4 Blue/White Screening

Diese Art des Screenings ermöglicht sehr einfach eine Unterscheidung zwischen leerem Vektor und erfolgreicher Ligation mit dem eingesetzten Insert. Die auf der Agarplatte gewachsenen Klone können optisch unterschieden werden. Das Prinzip dieses Screenings beruht auf einer enzymatischen Reaktion. Das Enzym β-

Galaktosidase wandelt das Substrat X-Gal zu einem blauen Farbstoff um. Das lacZ-Gen kodiert für das N-terminale α -Fragment der β -Galaktosidase, das alleine keine β -Galaktosidase-Aktivität besitzt. Bringt man es mit dem ebenfalls inaktiven, C-terminalen ω -Fragment zusammen, wird die Aktivität wieder hergestellt (α -Komplementation). Bakterienstämme, die das Gen lacZ Δ M15 besitzen, welches für das ω -Fragment kodiert, z.B. pMOS-Stamm, werden mit einem Vektor z.B. pGEM, der ein induzierbares lacZ-Gen enthält, transformiert. Nach Einleitung der Expression des lacZ-Gens durch die Zugabe des Induktors IPTG (Isopropylthiogalatosid), eines nicht-metabolisierbarem Glucose-Analogons, wird aktiv β -Galaktosidase gebildet. Ist durch Einklonieren eines Inserts in das lacZ-Gen dessen Expression nicht mehr möglich und die Kolonie auf der Platte ist weiß, da sie keine funktionelle β -Galaktosidase bilden kann. Dagegen erscheinen die Bakterien, die kein Insert enthalten blau, da sie funktionelle β -Galaktosidase bilden können und somit die beschriebene enzymatische Reaktion ablaufen kann.

3.2 Methoden eukaryoter Zellkultur

3.2.1 Kultur von B-Zellen in Suspension

B-Zellen der Stämme Raji, BL41 und B95-8 wurden in 50ml RPMI 1640-Medium (Sarstedt, ergänzt mit 10% FKS, Antibiotikagemisch (s. 2.8.2) 1:1000) in 75cm² 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 50ml 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 schädlichen Einfluss von Spülmittelrückständen an Glaspipetten zu vermeiden.

3.2.2 Kultur von Monolayerzellen

Monolayer Zellkulturen wachsen adhärent auf einer speziellen Unterlage. Sie wurden in 20ml DMEM Medium (10% FKS und Antibiotikagemisch (s. 2.8.2) 1:1000 zugesetzt) in 75cm² Flaschen bei 37°C und 7% CO₂ im Brutschrank kultiviert und zweimal wöchentlich subkultiviert. Nach Abnehmen des Mediums unter sterilen Bedingungen wird der Zellrasen zunächst mit 1,5ml Trypsin/EDTA gespült und dann mit 1ml Trypsin/EDTA nach kurzer Inkubation bei 37°C und 7% CO₂ von der Unterlage abgelöst. Abschließend werden die Zellen mit DMEM- Medium wie gewünscht verdünnt und 1ml der Suspension in eine neue 75cm² Flasche übertragen. Diese wird dann auf 20ml aufgefüllt.

3.2.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

3.2.3.1 Transfektion von Suspensionszellen mit dem AMAXA™ Elektroporationsverfahren

Dieses Verfahren wird dazu benutzt, Raji Zellen mit 2'O-Methyl-Oligonukleotiden in einem Elektroporationsverfahren zu transfizieren. Hierzu wird zunächst vom Hersteller mitgelieferte Nucleofector® Solution V (Amaxa Biosystems) in ausreichender Menge (100µl pro Ansatz) bei 37°C vorgewärmt. Pro Ansatz werden jeweils 2x10⁶ Zellen für 10 Minuten bei 1300rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 RF) und diese mit der vorgewärmten Nucleofector® Solution V (Amaxa Biosystems) gemischt und in Eppendorf®-Reaktionsgefäße übertragen. Dort wird die Zellsuspension mit den vorgelegten 12µl der 100µM 2'O-Methyl-Oligonukleotiden gemischt und in die vom Hersteller mitgelieferten Elektroporationsküvetten gegeben. Das für Rajis optimierte Programm M-13 wird am Nucleofector® (Amaxa Biosystems) ausgewählt und die Mischung aus den resuspendierten Zellen mit dem 2'O-Methyl-Oligonukleotid wird elektroporiert. Aus der Küvette werden die nun transfizierten Zellen in mit vorgewärmtem Medium (500µl pro Ansatz) gefüllten 12-Loch-Platten übertragen und bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen für Immunopräzipitations-Experimente genutzt, bei denen die Zellen zunächst radioaktiv markiert (3.9.2) wurden und dann native Zellextrakte (3.9.1) hergestellt wurden.

3.2.3.2 Monolayerzellen mit dem Transfektionsreagenz Nanofectin™

Das von PAA Laboratories angebotene Transfektionsreagenz Nanofectin™ zeichnet sich durch eine hohe Transfektionseffizienz bei geringer Zytotoxizität aus. Die DNA wird an ein positiv geladenes Polymer gebunden und in einen porösen Nanopartikel eingebettet. Die Zelle nimmt den Komplex aus gebundener DNA und Nanopartikel über Endozytose auf. Durch die Komplexbildung soll weiterhin die DNA-Degradierung in der Zelle verhindert werden. Laut Herstellerangaben sollen die adhärent wachsenden Zellen einen Tag vor der Transfektion ausgesät werden und dann zu dem Zeitpunkt transfiziert werden, wenn sie einen zu 60% dichten Zellrasen gebildet haben. Für 24well-Platten wird jeweils 1µg Gesamt-DNA mit 50µl steriler 150mM NaCl-Lösung und 3,2µl Nanofectin™ Transfektionsreagenz in 50µl steriler 150mM NaCl-Lösung gemischt und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Der komplette 100µl Ansatz pro Well wird tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach zweistündiger Vorinkubation bei 37°C und 7% CO₂ wird das einfache Volumen an frischem Medium auf die Zellen gegeben. Weiterverwendet wurden die Zellen in der Regel nach 24-48 Stunden Inkubation im Brutschrank.

3.2.4 Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY™

Zur Ermittlung der exakten Zellzahl wird das Zellanalysegerät CASY™ der Firma Schade benutzt. Mit diesem Gerät kann neben der genauen Zellzahlbestimmung auch eine qualitative Beurteilung der Zellpopulation getroffen werden. Es wird neben der Zelldichte ebenfalls die Zellgröße ermittelt, die als Indikator für die Vitalität der Zelle dient.

Das Messprinzip beruht auf der Tatsache, dass sich intakte Zellen in einem elektrisch leitenden Medium wie ein Isolator verhalten. Bei der Passage durch die Messzelle ändert sich der elektrische Widerstand in Abhängigkeit von der Zellgröße. Die zu messenden Zellen werden dazu in einer Elektrolytlösung (Casyton™) in einer Verdünnung von 1:1000 resuspendiert und mit einer konstanten Strömungsgeschwindigkeit durch die Messkapillare gesaugt. Beim Durchtritt der Zellen durch die Kapillare verdrängen diese eine ihrem Volumen entsprechende Menge an Elektrolyten aus der Messkammer, was zu einer Erhöhung des

elektrischen Widerstandes führt. Diese Widerstandsänderung dient als Maß für das Volumen der einzelnen Zellen. Die Größenverteilung wird in Form eines Histogramms angegeben.

3.2.5 Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Mittels der Durchflußzytometrie oder FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorter) ist die Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften möglich. Die Zellen werden durch Überdruck beschleunigt und an einem Messpunkt durch einen Argon-Laser ($\lambda=488\text{nm}$) angeregt (hydrodynamische Fokussierung). Es wird die relative Lichtintensität des emittierten Lichts gemessen, wobei das Vorwärts- und das 90° -Seitwärtsstreulicht direkt mit der Größe bzw. der Granularität der Zelle korreliert. Auch Fluoreszenzfarbstoffe werden durch den Argon-Laser angeregt. Das erlaubt eine durchflußzytometrische Analyse von Zellen, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper oder mit pEGFP markiert wurden. Das dabei emittierte Licht wird über ein optisches System gemessen und anhand verschiedener Fluoreszenzintensitäten eingeteilt. Ausgabedimension des Gerätes sind relative Lichtintensitäten, die in einer Auflösung von 1024 Kanälen in Form von Punktdiagrammen, Intensitätskurven oder Histogrammen dargestellt und miteinander korreliert werden können.

100 μl der zu analysierenden Zellen werden 48 Stunden nach erfolgter Transfektion mit 100 μl FACS-Fixierlösung fixiert und anschließend im FACScanTM (Becton Dickinson) analysiert. Anhand des mock-transfizierten Ansatzes (Heringssperma-DNA ohne pEGFP) konnte durch Vergleich der Größe und der Granularität der Zellen die nach der Transfektion noch lebende Zellpopulation deutlich von der toten Zellen abgegrenzt werden. Diese als lebend abgegrenzte Zellfraktion wurde als Nullwert definiert, der die Grundlage der Messung pEGFP-transfizierter Zellen bildet. Anschließend wird durch Einteilung des Punktdiagramms 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-Fix : Paraformaldehyd 2% (w/v)
 NaCl in PBS 150 mM

pH 7,5

3.3 DNA-Techniken

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

(Birnboim and Doly, 1979)

Es handelt sich um eine Methode mit der sich etwa 5µg DNA gewinnen lassen. Nachdem man einzelne Kolonien in 2,5ml LB-Medium mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum angeimpft hat und eine Inkubation über Nacht bei 37°C unter aeroben Bedingungen auf dem Schüttler abgewartet hat, wird die Bakteriensuspension abzentrifugiert (10 Minuten bei 500 rpm und 4°C, Sigma Kryofuge 202MK). Das Bakterienpellet wird in 200µl STET-Puffer mit Lysozym (0,5mg/ml) resuspendiert, fünf Minuten auf Eis gehalten und schließlich 45 Sekunden im Wasserbad bei 98,5°C gekocht. Nach einem kurzen Abkühlenlassen auf Eis wird der Ansatz erneut abzentrifugiert (30 Minuten bei 13000rpm und 4°C, Sigma Kryofuge 202MK). Im Sediment lagern sich Protein und unerwünschte Zellreste ab, die gemeinsam als Pellet mit einem sterilen Zahnstocher aus der Lösung entfernt werden können. Um die in Lösung befindliche DNA zu fällen werden 200µl Isopropanol zugegeben, der Ansatz gemischt und erneut abzentrifugiert (15 Minuten, 13000rpm und 4°C, Sigma Kryofuge 202MK). Zum Schluß wird das DNA-Pellet mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und abzentrifugiert (15 Minuten, 13000rpm und 4°C, Sigma Kryofuge 202MK), um Isopropanolreste zu entfernen. Das Pellet wird an der Luft getrocknet und in 20-30µl S1-Puffer aufgenommen. Um noch vorhandene RNA zu verdauen wird der Ansatz für 10 Minuten bei 37°C inkubiert und dann weiterverwendet bzw. bei -20°C gelagert.

STET-Puffer : Sucrose 8% (w/v)
 Triton X-100 0,5 % (v/v)
 Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM
 EDTA (pH 8,0) 50 mM

Puffer S1 (pH 8,0) : Tris-HCl 50 mM

EDTA 10 mM

RNase A 100 µg/ml

3.3.2 Präparative Plasmidisolierung (NUCLEOBOND™-Methode)

Um Plasmid-DNA in großer Menge mit hohem Reinheitsgrad zu gewinnen wird das NUCLEOBON™-Kit von Machery Nagel verwendet. Diese Methode beginnt mit einer alkalischen Lyse der Bakterien mit anschließendem Binden der DNA an eine Ionenaustauscher-Säule. Mit einer NUCLEOBOND™-AX 100-Säule (Midipräparation) können ca. 100ml, mit der NUCLEOBOND™-AX 500-Säule (Maxipräparation) 200-500ml Bakterienkultur aufgearbeitet werden. Eine Übernachtskultur wird 10 Minuten bei 4500rpm abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 RF), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet bei der Midipräparation [Maxipräparation] in 4ml [10ml] Puffer S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4ml [10ml] Puffer S2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und maximal für fünf Minuten bei RT inkubiert. Durch das im Puffer enthaltene SDS werden die bakteriellen Zellmembranen aufgelöst und nach der Lyse der Zellen werden die Zellbestandteile freigesetzt. Die chromosomale DNA wird durch das enthaltene NaOH denaturiert während die stabilere Plasmid-DNA bei nicht allzu langer Inkubationszeit weitestgehend doppelsträngig bleibt. Im Anschluß werden 4ml [10ml] Puffer S3 zugegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Bei diesem Schritt wird das Lysat neutralisiert, wobei die DNA wieder renaturiert. Allerdings renaturiert die chromosomale DNA hierbei nicht in ihre ursprüngliche Form, sondern bildet eine netzartige Struktur mit inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen. Die Plasmid-DNA renaturiert dabei weitestgehend in ihren Ursprungszustand. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 6000rpm und 4°C (Heraeus Megafuge 1.0 RF), um das Kalium-SDS und die chromosomale DNA zu präzipitieren. Danach wird der Plasmid-DNA haltige Überstand auf die AX 100- NUCLEOBOND™-Säule [AX 500- NUCLEOBOND™ – Säule] gegeben, die zuvor mit 4ml [10ml] Puffer N2 äquilibriert wird. Die Plasmid-DNA wird aufgrund der Salz und pH- Bedingungen im Lysat an die Säule gebunden und von dieser zurückgehalten. Die Proteine werden entfernt durch die Zugabe von 2x5ml [3x10ml] Puffer N3. Zur Elution der Plasmid-DNA werden 5ml [15ml] Puffer N5 verwendet. Abschließend wird die Plasmid-DNA mit 3,5ml [10,5ml] Isopropanol gefällt. Das durch 30 Minuten Zentrifugation bei 6000rpm und 4°C (Heraeus

Megafuge 1.0 RF) erhaltene Pellet wird mit eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und bei RT getrocknet. Nach Resuspension des DNA-Pellets in 100 [200] µl TE-Puffer bzw. H₂O_{bidest.} Wird die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt und ein Kontrollverdau 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-H₃PO₄ 100 mM
 Ethanol 15% (v/v)
 KCl 900 mM
 Triton X-100 0,15% (v/v)

Puffer N3 (pH6,3) : Tris-H₃PO₄ 100 mM
 Ethanol 15% (v/v)
 KCl 1,15 M

Puffer N5 (pH8,5) : Tris-H₃PO₄ 100 mM
 Ethanol 15% (v/v)
 KCl 1 M

3.3.3 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

(Maniatis, 1989)

Nukleinsäuren absorbieren Licht der Wellenlänge 260nm, deshalb stellt die photometrisch gemessene Absorption bei 260nm ein Maß für den Nukleinsäure-

Gehalt der Lösung dar. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei $\lambda=260\text{nm}$ entspricht bei:

- doppelsträngiger DNA (dsDNA) einer Konzentration von 50mg/ml
- einzelsträngiger DNA (ssDNA) und RNA einer Konzentration von 40mg/ml
- Oligonukleotid DNA einer Konzentration von 33mg/ml

Die Ursache für die höhere Absorption von einzelsträngiger DNA im Vergleich zu doppelsträngiger DNA ist im Hyperchromizitätseffekt begründet. Der Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung wird durch den Quotienten der Extinktionswerte bei 260nm und bei 280nm (dem Absorptionsmaximum von aromatischen Aminosäuren) ermittelt ($\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$). Bei einer reinen DNA-Lösung liegt der Wert zwischen 1,8 und 1,9. Tiefere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen und Phenolresten, höhere Werte zeigen größere Mengen an RNA an. Für die Messung werden 4 μl DNA-Lösung 1:100 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt und die OD₂₆₀ und OD₂₈₀ in einem Ultrospec 3000 Photometer (Pharmacia) gemessen. Als Nullreferenz dient $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$.

3.3.4 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Mit dieser Methode lässt sich DNA aus einer wässrigen DNA-Lösung konzentrieren. Hierbei wird die Eigenschaft von Nukleinsäuren ausgenutzt, dass diese in Anwesenheit geeigneter Konzentrationen an monovalenten Kationen in Ethanol ab 70% (v/v) unlöslich sind. Der DNA-Lösung wird daher 0,1 Volumen einer 3M Natriumacetat-Lösung und 2,5 Volumen Ethanol (100%) zugegeben und kurz gemischt. In etwa 30 Minuten bei -70°C findet die DNA-Fällung statt. Anschließend kann bei zehnmütiger Zentrifugation bei 13000rpm und 4°C (Sigma Kryofuge 202MK) die präzipitierte DNA pelletiert werden. Das Pellet wird gewaschen mit eiskaltem Ethanol (70%) und nochmals für zehn Minuten unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet 10 Minuten getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer resuspendiert.

3.3.5 Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA

(Maniatis, 1989)

Die Agarosegelelektrophorese wird sehr häufig als Technik zur Auftrennung von Nukleinsäuren verwendet, um DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe sichtbar zu machen. Aufgrund des Zucker-Phosphatgerüsts der DNA ist diese negativ geladen und wandert somit im elektrischen Feld auf die Anode zu. Das Agarosegel dient hierbei als Molekularsieb, wobei die kleineren Moleküle schneller durch die Poren des Gels wandern können als die großen. Durch das konstante Masse-Länge-Verhältnis kommt es zu einer Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihres Molekulargewichts. Durch eine entsprechende Wahl der geeigneten Agarosekonzentration kann eine optimale Auftrennung der DNA-Moleküle erreicht werden. Denn je geringer die Agarosekonzentration ist, desto größer sind die Poren der Gelmatrix. Neben beispielsweise der angelegten Spannung, der Stromstärke und der Temperatur hat auch die Konformation der DNA-Moleküle einen Einfluß auf das Laufverhalten der DNA. Die Konformation kann kovalent geschlossen und ringförmig sein (coiled und supercoiled) oder offen und linear. Am schnellsten wandert die supercoiled Form, die offene lineare Form ist etwas langsamer. Als Puffer wird Tris-Acetat-Puffer (TAE) verwendet. Die DNA-Fragmente werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid angefärbt. Dieser interkaliert in doppelsträngige DNA, sodass die DNA-Fragmente unter UV-Licht als orange gefärbte Banden erkennbar und dokumentierbar sind.

Der glycerolhaltige Blaumarker wird der Probe zu 1/5 ihres Gesamtvolumens zugesetzt, um die Dichte der DNA Lösung zu erhöhen und das Absinken in den Geltaschen zu gewährleisten. Zusätzlich wird die Lauffront der DNA im Gel durch den im Gemisch enthaltenen Farbstoff Bromphenolblau erkennbar. Der Chelatkomplexbildner EDTA sorgt dafür, dass den Enzymen die für ihre Funktion essentiellen bivalenten Kationen entzogen werden und inaktiviert sie somit. Aufgrund dieser beiden Funktionen wird der Blaumarker auch als „Stopp-Lade-Mix“ bezeichnet.

Es wird nun ein entsprechend großes Gelstück in die mit 1fach TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und die Proben in die Taschen pipettiert. Um einen Größenvergleich der DNA-Fragmente zu ermöglichen wird parallel dazu eine Markerspur aufgetragen (10µl 1 kb plus DNA ladder™ (Invitrogen)). Es wird ein elektrisches Feld angelegt (1-2 Stunden, 80-130V) und die DNA wird aufgetrennt.

Sollen die Größen der Fragmente analysiert und das Gel fotografiert werden, so wird die DNA mit kurzwelligem UV-Licht ($\lambda=254\text{nm}$) sichtbar gemacht (Geldokumentationssystem MWG Biotech Gel Print 2000i). Wenn die DNA dagegen weiterverarbeitet werden soll wird sie durch das kurzwellige UV-Licht zu stark geschädigt. In diesem Fall bedient man sich eines langwelligen UV-Lichts ($\lambda=366\text{nm}$), um die entsprechenden Fragmente sichtbar zu machen und sie ausschneiden zu können.

Eine Quantifizierung der Intensität der Banden ist möglich durch die Analyse des ethidiumbromidgefärbten Agarosegels im Institut für klinische Biochemie und Molekularbiologie, Homburg/Saar (Herr Dr. Martin Jung) im Lumi Imager F1™ (Roche).

3.3.6 Herstellung eines Agarosegels

Die Agarosekonzentration ist der entscheidende Parameter für den Auftrennungsbereich der DNA, denn dieser hängt entscheidend von der Porengröße und somit der Dichte der Gelmatrix ab. Je höher die Agarosekonzentration und somit die Menge an eingesetzter Agarose ist, desto kleiner ist die Porengröße. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarosegele mit einer jeweils geeigneten Konzentration eingesetzt (zwischen 0,8% und 3,0% (w/v)).

Gelöst wurde die entsprechende Agarosemenge in 450ml 1fach TAE-Puffer durch Aufkochen im Mikrowellenherd und nach Abkühlen auf ca. 56°C mit $25\mu\text{l}$ Ethidiumbromid [Stammlösung: 10mg/ml in H_2O] versetzt. Im Anschluß wird die Agaroselösung auf eine Glasplatte mit Kunststoffeinfassung ($24,4\times 24,5\times 1\text{cm}$), die zunächst mit 1%iger Agarose abgedichtet wurde, gegossen. Durch PVC-Kämme werden im Gel Probetaschen ausgespart und nach vollständiger Polymerisation des Gels werden diese Kämme wieder entfernt. Eingepackt in Frischhaltefolie ist das Gel bis zum Gebrauch bei 4°C zu lagern.

3.3.7 Glasmilchisolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen/ Lösungen

Glasmilch besitzt in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotischer Salze die Eigenschaft, spezifisch DNA zu binden. Mit dieser Eigenschaft ist es möglich, mittels Glasmilch DNA aus Lösungen und sogar aus Agarosegelen zu isolieren. Diese

Methode kann genutzt werden für Fragmente mit einer Größe zwischen 130bp und 5kbp, denn kleinere Fragmente werden nahezu irreversibel gebunden und größere Fragmente können durch die auftretenden Scherkräfte zerstört werden. Die Ausbeute beträgt etwa 70%. Handelt es sich um ein in einem Agarosegel gebundenes DNA-Fragment muss dieses zunächst unter langwelligem UV-Licht ($\lambda=366\text{nm}$) mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten werden und in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Nach Ermittlung des Gewichts des Gelstückes wird die 3fache Menge an 6M NaI-Lösung zugegeben, bzw. das 3fache Volumen bei Lösungen. Nach zehnmütiger Inkubation des Gelstückes bei 55°C hat sich dieses weitestgehend gelöst und ein der DNA-Menge angepasstes Volumen (10-20 μl) an selbst hergestellter Glasmilch wird der Lösung zugegeben. Zur Bindung der DNA an die Glasmilch wird das Gemisch etwa 5 Minuten bis 1 Stunde bei RT auf dem Drehrad belassen. Durch einminütiges Abzentrifugieren (Tischzentrifuge) bei 13000rpm wird die Glasmilch im Ansatz sedimentiert, der Überstand wird verworfen und das Glasmilchpellet dreimal mit je 400 μl NEW-WASHTM-Lösung (Gene-CleanTM-Kit) gewaschen und erneut eine Minute bei 13000rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge). Zur Elution des DNA aus dem Glasmilchpellet wird das gewaschene Pellet in 20 μl TE-Puffer oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{biest}}$ resuspendiert, der Ansatz für fünf Minuten bei 55°C inkubiert und anschließend nochmals eine Minute bei 13000rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge). Die gelöste DNA befindet sich im Überstand und wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Zur Überprüfung der Reisolierung werden etwa 3 μl dieses Überstandes auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.4 Enzymatische Modifikation von DNA

3.4.1. 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. Man unterscheidet drei verschiedene Typen von Restriktionsenzymen, von denen allerdings nur die

Enzyme des Typs II molekularbiologisch interessant sind, da von ihnen die DNA an genau definierbaren Stellen geschnitten wird. In vier bis acht Basenpaaren werden meist die spezifischen Erkennungssequenzen dieser Enzyme umfasst. Innerhalb dieser Basenpaare befindet sich auch meist die Schnittstelle der Enzyme. Häufig handelt es sich bei diesen Sequenzen um Palindrome.

Prinzipiell werden zwei verschiedene Varianten unterschieden, wie DNA durch Enzyme geschnitten werden kann. Bei der ersten Möglichkeit werden die Phosphordiesterbindungen zwischen direkt gegenüberliegenden Basenpaaren geschnitten, sodass glatte Enden („blunt ends“) entstehen. Alternativ wird die DNA versetzt aufgeschnitten, wobei entweder ein 3'- oder ein 5'- Überhang entsteht („sticky ends“). In den durchgeführten Experimenten wurden ausschließlich Restriktionsenzyme verwendet, die „sticky ends“ mit 5'- Überhang erzeugen. Auf dem Markt sind heute viele Restriktionsenzyme bekannt und käuflich zu erwerben.

Meist stammen die Enzyme ursprünglich aus Mikroorganismen, die sich mit Hilfe dieser Enzyme vor eingedrungener, schädigender Fremd-DNA schützen.

Die Wirksamkeit bzw. Aktivität der Enzyme wird in Units angegeben. Eine Unit (U) ist definiert als die Menge Enzym, die in der Lage ist, 1µg DNA in optimalem Milieu und bei optimaler Temperatur (meist 37°C) innerhalb von 60 Minuten vollständig zu schneiden. Dieser Vorgang des Schneidens wird auch als „Restriktionsverdau“ bezeichnet.

Für analytische Zwecke werden in den Verdauansätzen 0,5-1µg DNA eingesetzt, für präparative Zwecke bis zu 4µg. Die Anzahl der eingesetzten Units an Enzym beträgt zwischen 2-10 U/µg DNA, wobei das Volumen an zugesetztem Enzym wegen des in der Lösung vorhandenen Glycerols 10% (v/v) das des Reaktionsansatzes nicht überschreiten darf. Steigt die Glycerolkonzentration im Gesamtansatz über 5% (v/v) hat dies eine unspezifische Fragmentierung der DNA durch das Enzym zur Folge. Die Bedingungen (Temperatur und Inkubationsdauer) werden nach Herstellerangaben gewählt. Dem Ansatz wird ein entsprechend mitgelieferter 10fach Puffer zugesetzt und, soweit nötig, 10fach BSA. Auch das Fragmentieren der DNA in einem Ansatz mit mehreren Enzymen ist möglich; oft benutzt wird der sogenannte „Doppelverdau“ mit zwei unterschiedlichen Enzymen. Vorausgesetzt wird hier, dass die Enzyme im gleiche Puffermilieu angemessen schneiden. Sollten die Puffer nicht kompatibel sein erfolgt ein sequentieller Verdau mit den entsprechenden Enzymen nacheinander.

3.4.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA-Enden

(Bolivar et al., 1977; Chaconas and van de Sande, 1980)

Linearisierte Vektoren müssen vor einer Ligation mit einem Insert mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (CIP, calf intestinal phosphatase) dephosphoryliert werden, um die Vektor-DNA vor einer Rezirkularisierung bzw. einer Konkaterisierung zu schützen. Die alkalische Phosphatase spaltet nun die reaktive Phosphatgruppe vom freien 5'-Ende der DNA ab.

In einem Standardreaktionsansatz werden 20µl der verdauten Vektor-DNA mit 1µl alkalischer Phosphatase, 3µl mitgeliefertem 10fach Reaktionspuffer und 6µl H₂O_{bidest.} dephosphoryliert. Dazu wird der Ansatz ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die DNA wird abschließend in einem Agarosegel aufgetrennt und mit Glasmilch reisoliert. Auch bei Vektoren, die mit zwei unterschiedlichen Enzymen geschnitten wurden und deren „sticky ends“ demzufolge nicht komplementär zueinander sind, ist eine Rezirkularisierung zwar unwahrscheinlich, eine Verbindung mehrere Vektoren miteinander jedoch möglich. Aus diesem Grund wird auch hier eine Dephosphorylierung vorgenommen.

3.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten

(Dugaiczkyk, Boyer, and Goodman, 1975; Sgaramella, Van de Sande, and Khorana, 1970 1970)

Zwei Nukleinsäuremoleküle können *in vitro* mit Hilfe der T4-DNA-Ligase miteinander verknüpft werden. Dieses Enzym lässt sich aus *E.coli*-Bakterien isolieren, die zuvor mit dem Bakteriophagen T4 infiziert wurden; es gehört zu den DNA-Reperaturenzymen. Die Verknüpfung besteht aus einer Phosphordiesterbindung zwischen den 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden, d.h. die Bildung einer intakten, rekombinanten dsDNA wird somit geschaffen. Als Cofaktor und Energiequelle für die Katalyse benötigt die T4-DNA-Ligase ATP.

Die Effektivität der Reaktion wird beeinflusst von der Konzentration an eingesetzter Vektor- und Insert-DNA. Es wird daher eine etwa fünf Mal höhere Stoffmenge Insert eingesetzt als Vektor. Nach Zugabe von 2µl 10fach Ligasepuffer und 1µl T4-DNA-Ligase [1U/µl] wird der Ligationsansatz auf ein Gesamtvolumen von 20µl mit H₂O_{bidest} aufgefüllt und für vier Stunden oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Handelt

es sich um eine Ligation mit einem nicht vorher modifiziertem PCR-Fragment wird der TA-Klonierungsvektor pGEM-TTM (Promega) eingesetzt und der Ansatz für eine Stunde oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Transformation in die kompetenten Bakterien werden in der Regel nur 10µl des Ligationsansatzes eingesetzt, der Rest kann für einen eventuell nötigen Wiederholungsschritt bei 4°C gelagert werden. Auch bei der Ligation werden verschiedene Kontrollen angesetzt. Zum Einen zur Überprüfung einer erfolgreichen Dephosphorylierung des Vektors eine „CIP-Kontrolle“ (dephosphorylierter Vektor ohne Insert), denn bei mangelnder Dephosphorylierung wäre ein Wachstum von Transformanten sichtbar. Zum Anderen wird eine Transformationskontrolle mit einem zirkulären Vektor durchgeführt, der den Bakterien nach erfolgreicher Transformation eine Antibiotikaresistenz verleiht. D.h. nach erfolgreicher Transformation ist ein Bakterienwachstum zu erwarten.

Ligasepuffer (10x): ATP 10 mM
 MgCl₂ 50 mM
 DTT 10 mM
 Tris/HCl (pH7,5) 660 mM

3.5 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels der PCR wird es ermöglicht, enzymatisch *in vitro* aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen einen DNA-Bereich definierter Länge und Sequenz selektiv zu amplifizieren. Die Fähigkeit der DNA-Polymerase wird in diesem Verfahren dazu genutzt, um von einem freien 3'-Hydroxyende eines Doppelstrangbereichs ausgehend einen zur einzelsträngigen DNA-Matrize (Template) komplementären Strang zu synthetisieren. Dazu müssen zunächst definierte, künstlich synthetisierte Oligonukleotide als „Primer“ zu einem bestimmten Sequenzabschnitt der Vorlage hergestellt. Für die Polymerase-Kettenreaktion werden zwei solche Oligonukleotide benötigt. Man wählt die Primer so aus, dass der eine Primer an den positiven, der andere an den negativen Strang der denaturierten, einzelsträngigen DNA bindet. Um die Primer spezifisch wählen zu können muß die DNA-Sequenz des Templates bekannt sein. Die PCR wird in automatisierten Thermocyclern durchgeführt, die nach entsprechender Programmierung automatisch die Reaktionsschritte durchführt.

Im ersten Reaktionsschritt der Amplifikation kommt es zu einer Denaturierung (Melting) der dsDNA-Matrize (Template). Zum Melting muß auf eine Temperatur über dem Schmelzpunkt der Matrize erhitzt werden, auf etwa 94°C für 30 Sekunden. Nach erfolgter Abkühlung können sich die synthetischen Oligonukleotide (Primer), die zu jeweils einem der Matrizenstränge komplementäre Bereiche besitzen, an die Matrize anlagern (Annealing). Die Annealing-Temperatur ist hierbei abhängig von der Schmelztemperatur der Primer bzw. deren GC-Gehalt. Diese Temperatur ist der wichtigste Parameter, der über Erfolg und Scheitern der PCR entscheidet. Sie wird für jeden Primer bestimmt und dann der Mittelwert festgelegt. Meist bewegt man sich in Bereichen zwischen 51°C und 65°C. Der folgende Schritt wird als Elongation bezeichnet, denn nun steht der DNA-Polymerase ein freies 3'Ende zur Verfügung, das als Ausgangspunkt für die Synthese eines zum Template komplementären Tochterstranges nicht definierter Länge dient. Diese Reaktion findet bei der für das Enzym optimalen Temperatur (72°C) und in Gegenwart der zur Synthese benötigten dNTPs (Desoxyribonucleosidtriphosphate) statt.

Während des zweiten Reaktionszykluses (Denaturierung, Primeranlagerung und Synthese) wird die DNA erneut aufgeschmolzen. Nun findet man zwei Typen von Tochtersträngen: einerseits die beiden ursprünglichen einzelsträngigen DNA-Templates und andererseits die beiden neusynthetisierten Stränge, deren 5'-Ende einer der beiden Primer darstellt. In diesem zweiten Zyklus dienen nun 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. Theoretisch sind millionenfache Amplifikationen der Fragmente zu erwarten, aber durch limitierende Faktoren, wie abnehmende Enzymaktivität und steigende DNA-Konzentration, entstehen ungünstigere Reaktionsbedingungen, weshalb dieses theoretisch zu erwartende Ergebnis in der Praxis nie erreicht werden kann.

Durch eine PCR können einer DNA spezifische Mutationen eingefügt werden, da die Primer bei entsprechend gewählter Annealing-Temperatur auch dann noch an das Template binden, wenn die Sequenz nicht vollkommen übereinstimmt. Die verwendeten Primer werden als „mutagen Primer“ bezeichnet, da sie Mutationen in die Endbereiche der Amplifikate einbauen.

Die eingesetzte DNA-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase). Sie besitzt ein für Enzyme außergewöhnlich hohes

Temperaturoptimum von 72°C und ist auch noch bei 94°C, wenn die DNA denaturiert, stabil und bleibt während allen Zyklen aktiv. Neben der *taq*-Polymerase gibt es mittlerweile eine Vielzahl weiterer hitzestabiler Polymerasen aus anderen thermophilen Bakterien, aber auch rekombinant hergestellte, wie zum Beispiel die Phusion-DNA-Polymerase (Finnzymes) mit sogenannter proof-reading Funktion.

Zu berücksichtigen bei der Primerauswahl ist, dass diese möglichst ähnliche Schmelztemperaturen besitzen, keine Selbstkomplementarität aufweisen und keine Sekundärstrukturen ausbilden können.

Um eine evtl. Kontamination des Ansatzes ausschließen zu können wird zusätzlich eine H₂O-Kontrolle durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen kompletten Ansatz, allerdings ohne die Matrizen-DNA.

Abschließend werden 20µl jedes Ansatzes in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Ein typischer PCR-Ansatz ist in Tabelle 2 aufgeführt und ein entsprechendes Programm in Tabelle 3. Neben den Reagenzien, die in jeder PCR-Reaktion erforderlich sind, existieren verschiedene Zusätze, wie beispielsweise DMSO (Dimethylsulfoxid), das die Schmelztemperatur herabsetzt und so eine Erhöhung der Stringenz bewirkt, um in gewissen Fällen eine höhere Ausbeute bzw. überhaupt ein Produkt zu erhalten.

Verwendete Reagenzien:

<i>Taq</i> (<i>Thermus aquaticus</i>)-Polymerase (Sigma) :	5 U/µl
Phusion-DNA-Polymerase (Finnzymes) :	2 U/µl
10 x Polymerase-Reaktionspuffer (Sigma) :	KCl 500 mM Tris-HCl, pH 8,3 100 mM MgCl ₂ 25 mM Gelatine 1 mg/ml
5 x HF-Puffer (Finnzymes) :	enthält 7,5 mM MgCl ₂
DMSO (Finnzymes) :	DMSO
dNTPs (Boehringer Mannheim oder Finnzymes) :	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM

Tab. 2: Pipettierschema eines 50µl-Standard-PCR-Ansatz

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
10 x Reaktionspuffer	5 µl	1 x
dNTPs (je 10 mM)	1 µl	je 200 µM
forward-Primer (25 µM)	1 µl	0,5 µM
reverse-Primer (25 µM)	1µl	0,5 µM
template-DNA	0,1 – 1 µg	0,1 – 1µg
taq-Polymerase	0,5 µl	2,5 U
H ₂ O bidest	ad 50 µl	

Tab. 3: Schema eines PCR-Standardprogramms

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	5 min
Denaturierung	94°C	30 sec
Annealing	55 °C	30 sec
Extension	72°C	2 min
Extension	72°C	10 min
	4°C	∞

3.6 Der Luciferase-Reportergen-Assay

Der Luciferase-Reportergen-Assay ist ein sehr sensitiver und leicht zu handhabender Assay, der zur Untersuchung von Promotoren und Induktionsstudien dient, aber auch anderweitig vielseitig einsetzbar ist. Bei der Luciferase handelt es sich um ein 61kDa großes Protein des Glühwürmchens und bedarf keiner posttranslationalen Modifikation, um seine enzymatische Aktivität zu erreichen. Die Luciferase katalysiert in einer ATP-abhängigen Reaktion die Oxidation des Substrates Luciferin unter Abgabe von Licht. Hierbei ist die Lichtproduktion proportional zur Luciferasemenge, was eine quantitative Auswertung des Luciferase-Reportergen-Assays ermöglicht. Gemessen wird die Lumineszenz in einem Luminometer (Berthold).

Die in der vorliegenden Arbeit zu untersuchenden 3'UTRs, mit entsprechenden regulierenden Eigenschaften, werden nun unmittelbar hinter das Luciferasegen des Vektors „pGL3-Promotor“ kloniert. miRNAs, die an die oben genannten 3'UTRs binden und somit einen Einfluss auf die Expression der Luciferase ausüben sollen, wurden über pSG5-Konstrukte kotransfiziert. Anhand der dabei entstandenen

Luciferasemenge mit entsprechend gemessener Lichtmenge konnte Aufschluß über die regulierenden Eigenschaften der verwendeten miRNAs in Bezug auf die entsprechende 3'UTR gewonnen werden.

Hierzu wurden in den durchgeführten Experimenten 293T-Zellen in 24-Loch-Platten laut Herstellerangaben (NanofectinTM) ausgesät und mit den in den einzelnen Experimenten angegebenen Effektor- und Reporterkonstrukten kotransfiziert. Diese kodieren zum Einen für die gewählte miRNA und zum Anderen für die entsprechende 3'UTR, die bereits direkt hinter das Luciferasegen in den pGL3-Promotor Vektor einkloniert wurde. Zur späteren Kontrolle der Transfektionseffizienz per FACS-Analyse wird der grün-fluoreszierende Vektor pEGFP-C1 in alle Ansätze kotransfiziert. Es werden jeweils 0,8µg des pSG5-abgeleiteten, miRNA-kodierenden Effektorkonstruktes, 0,2µg des pGL3-abgeleiteten Reporterkonstruktes und 0,2µg des pEGFP-C1 Vektors eingesetzt. Die DNA-Gesamtmenge beläuft sich auf 1,2µg pro Transfektionsansatz und wurde, wo nötig, durch Zugabe von Heringssperme-DNA konstant gehalten. In jedem Transfektionsexperiment wird ein Ansatz lediglich mit Heringssperma-DNA transfiziert, der in der FACS-Analyse zur Eingrenzung der lebenden Zellpopulation dient.

Zwei Tage nach Transfektion werden die Zellen zunächst abtrypsiniert und zweimal mit PBS gewaschen. 100µl werden zur späteren Transfektionskontrolle entnommen. Die restlichen Zellen werden nach kurzem Antrocknen bei RT in 100µl 1xCCLR-Puffer (Promega) lysiert. Die Zellrümpfer werden durch Zentrifugation entfernt und die Luciferase-Aktivität mit Hilfe des Promega Luciferase Assay SystemsTM (Promega) gemäß der Herstellerangaben in einem Lumat LB9501-Luminometer (Berthold) ermittelt. Die Versuche werden in der Regel drei Mal mit jeweils doppeltem Ansatz durchgeführt und durch die Verrechnung mit den Werten der Durchflußzytometrie bezüglich der Transfektionsrate der einzelnen Ansätze standardisiert. Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der einzelnen, unabhängigen Experimente wird das Programm Sigma Plot 4.1TM (SPSS) benutzt.

Als statistisches Hilfsmittel zur Überprüfung der Signifikanz der Abweichungen wird der programmierte t-Test benutzt und p-Werte kleiner als 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

3.7 RNA-Techniken

3.7.1 Gesamt-RNA Isolierung aus kultivierten Zellen

Die Gesamt-RNA Extraktion wird nach dem Standardprotokoll von peqGOLD TriFast™ durchgeführt. Dabei wird auf den Waschschrift der gefällten RNA mit 75%igem Ethanol verzichtet, um den Verlust kleiner RNAs, die in höher konzentriertem Ethanol noch löslich sind, zu vermeiden. Mit der TriFast™ Methode können gleichzeitig RNA, DNA und Protein extrahiert werden. Das entsprechende Reagenz enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat in einphasiger Lösung. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in drei Phasen auf. Die RNA ist in der wässrigen, oberen Phase enthalten, die DNA in der organischen, unteren Phase und Interphase. Proteine befinden sich in der organischen Phase. Die RNasen werden durch das Guanidinisothiocyanat effektiv gehemmt, so dass die Durchführung der Extraktion bei RT möglich ist. Man erhält qualitativ und quantitativ gute Ausbeuten an nicht-degradierten RNAs.

3.7.2 Northern Blot

3.7.2.1 Herstellung eines SequaGel™ Sequenzierungsgels

Zur Herstellung eines 12% Gels werden gemäß der Herstellerangaben 48ml des SequaGel™ Konzentrates mit 42ml des SequaGel™ Verdünnners und 10ml des Puffers gemischt und anschließend 20µl TEMED und 400µl APS zum eingesetzten 50ml Ansatz gegeben. Nun wird das Gel zwischen zwei gereinigte und entfettete Glasplatten (15x17cm) gegossen, ein Kamm für 16 Taschen eingefügt und polymerisieren gelassen (vgl. auch 3.9.4).

3.7.2.2 Elektrophorese und Membrantransfer

Zur Auftrennung der zuvor gewonnenen Gesamt-RNA mittels des peqGOLD TriFast™-Verfahrens wird ein 1,5mm dickes, 15x17cm großes 12% SequaGel™ Sequenziergel

mit 16 Taschen benutzt. Pro Tasche werden 100µg der jeweiligen Gesamt-RNA aufgetragen, die zuvor mit dem gleichen Volumen an 2x Bromphenolblau Ladepuffer gemischt wurden, wobei das Endvolumen 40µl nicht überschreiten sollte. Als Laufpuffer wird 1xTBE-Puffer verwendet. Die Leistung für die elektrophoretische Aufspaltung beträgt in den ersten 10 Minuten 10W, danach 30W für etwa eine weitere Stunde, wobei die Bromphenolblau-Bande den unteren Rand des Gels erreichen soll. Zur Sichtbarmachung der RNA-Auftrennung wird das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt (10min in 100ml 1xTBE-Puffer mit 10µl Ethidiumbromid-Lösung). Die Banden können nach Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 254nm sichtbar gemacht werden und mittels Geldokumentationssystem MWG Biotech Gel Print 2000i dokumentiert werden.

Der Geltransfer wird durch das Semidry-Blotting Verfahren durchgeführt. Hierbei wird die aufgetrennte RNA vom Gel auf eine Hybond-N+-Membran (Amersham Biosciences) in einer Star Lab Semidry Blot-Kammer (Star Lab GmbH, Ahrensburg) in 1xTBE Puffer übertragen. Dabei wird über 2 Stunden eine konstante Stromstärke von 2mA/cm² angelegt (Membrangröße: 20x20cm), wobei die Spannung 25V nicht übersteigen sollte wegen Überhitzungsgefahr. Anschließend wird die Membran mit einem Fön getrocknet. Um die RNA kovalent an die Membran zu binden wird ein UV cross-link im UV Stratalinker™ 1800 (Stratagene) bei 1200J für 30sec durchgeführt. Abschließend wird die Membran eine Stunde lang im Wärmeschrank bei 80°C „eingebacken“, um eine Bindung der Sonden zu verbessern.

3.7.2.3 Endmarkierung der Sonde mit Gamma-³²P-ATP

Das als Sonde verwendete antisense BART2 DNA-Oligonukleotid wird an seinem 3'-Ende mit Gamma-³²P-ATP endmarkiert. Dazu wird nach folgendem Schema ein Reaktionsansatz erstellt:

1µl	22nt as BART2 (20µM)
5µl	Gamma- ³² P-ATP (6000Ci/mmol)
2µl	10x T4 Polynukleotidkinase-Puffer (NEB)
11,8µl	Wasser
0,2µl	T4 Polynukleotidkinase (NEB)

Tab. 4: Reaktionsansatz zur Endmarkierung der miR-Sonde mit Gamma-³²P-ATP

Der Ansatz wird für 30min bei 37°C inkubiert und anschließend wird die Reaktion mit 30µl 30mM EDTA (pH 8,0) abgestoppt. Zum Abfangen der freien, radioaktiv-markierten Nukleotide wird der Ansatz auf eine equilibrierte, trockene Sephadex G25 Spin-Säule (Roche) aufgetragen. Die verbleibende Polynukleotidkinase wird durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 90-95°C für 1min inaktiviert. Somit kann der Ansatz dem Hybridisierungs-Cocktail zugegeben werden.

3.7.2.4 Vorhybridisierung und Hybridisierung

Zur Vorhybridisierung werden 30µl des Hybridisierungspuffers in die Hybridisierungsflasche (100ml zylindrische Flasche) gegeben, die den vorbereiteten Blot enthält. Es folgt ein weiterer Inkubationsschritt für 1h bei 50°C unter Drehung der Flasche. Anschließend wird die Vorhybridisierungslösung gegen die bei 50°C erwärmte Hybridisierungslösung ausgetauscht und es werden 3.000.000cpmA der markierten Sonde zugegeben. Inkubiert wird dieser Ansatz erneut bei 50°C über Nacht.

3.7.2.5 Waschen und Belichten

Am nächsten Tag wird die Hybridisierungslösung ausgeschüttet und weitere Reste durch zweimaliges Waschen (15min) mit 100ml der Waschlösung I (5xSSC/1%SDS) bei 50°C und anschließendem zweimaligem Waschen (10min) mit 100ml der Waschlösung II (1xSSC/1%SDS), ebenfalls bei 50°C.

Abschließend wird die Blot-Membran in Frischhaltefolie eingewickelt und entweder auf einen Phosphor-Imager Screen aufgelegt oder einen Kodak X-Omat Röntgenfilm (Bremaphot, Saarbrücken).

3.7.2.6 Alternative Markierungsmethode des Oligonukleotids mittels des *mirVana*TM Verfahrens

Das Verfahren wird gemäß dem Protokoll zur Konstruktion der *mirVana*TMmiRNA Sonde durchgeführt und die im dazugehörigen Kit mitgelieferten Puffer und Enzyme verwendet (Ambion, Inc.).

Hierzu muss an das geeignete 2'O-Methyl-Oligonukleotid ein T7-Promotor-Primer an das 5'-Ende angehängt werden. Dies erfolgt über eine Hybridisierungsreaktion. Der Gegenstrang wird mit Hilfe der Exo-Klenow DNA-Polymerase aufgefüllt. Auf diese Weise erhält man ein dsDNA-Template mit T7-Promotor-Primer, das für die folgende Transkription eingesetzt wird. Dieser Transkriptionsreaktion wird nun ³²P-markiertes UTP zugefügt, wodurch nun ein zur miR-Detektion eingesetztes Oligonukleotid zur Verfügung steht, das nicht nur eine Endmarkierung aufweist, sondern an mehreren Stellen der Sequenz radioaktiv markiert ist. Somit ist eine erhebliche Signalverstärkung möglich, was die miR-Detektion um ein Vielfaches erleichtert.

3.8 DNase Verdau

Für bestimmte Arbeitsschritte ist es notwendig, die aus eukaryotischen Zellen isolierte RNA von DNA-Resten zu befreien. Um dies zu bewerkstelligen, wird zur isolierten RNA RNase-freie DNase von Roche pipettiert und mindestens 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reinheit der RNA kann mittels einer sogenannten ALU-PCR kontrolliert werden, bei der bestimmt, nur in genomischer DNA auftretende, repetitive Sequenzen amplifiziert werden. Eine weniger sensitive Methode ist die photometrische Bestimmung des Reinheitsgrades. Dabei sollte der Quotient aus dem Absorptionswert bei 260nm und 280nm um den Wert 1,9 liegen. Ein Abweichen nach oben deutet auf eine Verunreinigung mit DNA hin, eine auf Werte unter 1,65 auf eine Verunreinigung mit Proteinen.

3.9 Proteintechniken

3.9.1 Herstellung von 2x Sample-Buffer-Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen

(Maniatis, 1989)

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Gesamtzellextrakte aus Monolayerkulturen und Suspensionskulturen hergestellt. Die Monolayerzellen wurden aus einer dicht gewachsenen 75cm² Kulturflasche geerntet, indem sie abtrypsiniert wurden und in Medium aufgenommen werden. Dieser Arbeitsschritt entfällt bei den

Suspensionskulturen. Die Zellen werden zunächst für 10 Minuten, 1200rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 RF). Das entstandene Pellet wird zweimal in kaltem PBS gewaschen und anschließend in einer definierten Menge 2fach SDS-Probenpuffer resuspendiert. Der SDS-Probenpuffer enthält 3-Mercapto-1,2-Propandiol, das Disulfidbrücken reduziert, wodurch die Tertiärstruktur der Proteine zerstört wird. Fehlt die Tertiärstruktur ist die Wanderungsstrecke der Proteine im Gel proportional zu ihrer Größe und die saubere Auftrennung der Proteine ist verbessert. Außerdem werden Protein-Protein-Interaktionen wegen der fehlenden nativen Struktur nicht mehr eingegangen. Durch eine zehn Sekunden lange Ultraschallbehandlung werden die Zellen aufgeschlossen. Abschließend werden die Proben für zehn Minuten bei 95°C gekocht und anschließend weitere zehn Minuten bei 13000rpm (Sigma Kryofuge 202MK) abzentrifugiert, um nicht gelöste Zellbestandteile zu sedimentieren. Der proteinhaltige Überstand kann bei -20°C gelagert werden.

3.9.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280nm und ist hauptsächlich geprägt von dem Gehalt an Tyrosin- und Tryptophanresten. Eine Absorptionseinheit entspricht in diesem Fall einer Konzentration von 1,8mg/ml. Durch die Verwendung von 2xSDS-Proben-Puffer ohne Bromphenolblau konnte der Proteingehalt der Extrakte photometrisch bestimmt werden. Dazu wird der Proteinextrakt 1:50 mit 0,1M NaOH-Lösung verdünnt. Die gemessene Extinktion bei 280nm dieser Lösung wird in folgende Formel eingesetzt. Sie dient dazu, die Proteinmenge zu berechnen, die in der Gelelektrophorese eingesetzt werden soll.

$6,4 / OD_{280nm} = x \mu\text{l}$, die 15 μg Gesamt-Protein enthalten

OD_{280nm} = optische Dichte des Proteinextraktes bei 280nm

Das Ergebnis der angegebenen Formel entspricht dem Volumen [μl] 2xSample-Buffer-Extrakt, die man benötigt, um 15 μg Protein zu erhalten.

3.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Maniatis, 1989)

In einer SDS-Page werden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung kann nach Molekulargewicht, der Gesamtladung oder der dreidimensionalen Struktur der Proteine erfolgen. In den beschriebenen Experimenten wird ausschließlich unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet und eine Auftrennung der Proteine nur nach Molekulargewicht durchgeführt. Im Puffer und in der Gelmatrix befindet sich das negativ geladene SDS im Überschuß und lagert sich an die hydrophoben Regionen der Proteine an. An der Aminosäurenkette lagert sich pro zwei Aminosäurenreste je ein SDS-Molekül an. Hierdurch wird erreicht, dass die positiven Ladungen der Proteine kompensiert werden und sie erhalten eine stark negative Ladung. So wird die Eigenladung des Proteins überlagert und das SDS ist zu der Proteinmasse proportional. Auf diese Art und Weise wird die Wanderung der Proteine ausschließlich zur Anode und eine vollständige Denaturierung erreicht. Durch das SDS werden fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen gelöst und die Tertiärstruktur geht verloren.

Die Matrix des Gels besteht aus Ketten polymerisierten Acrylamids quervernetzt durch N,N'-Methyl-Bisacrylamid. Ammoniumpersulfat (APS) startet die Polymerisation und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) dient als Katalysator. Die Mengenverhältnisse der eingesetzten Acrylamid- und Bisacrylamidkonzentration bestimmen die Porengröße und somit die Auftrennungseigenschaften der chemisch inerten Polyacrylamid-Gelmatrix. Die Proteine wandern somit in einem Gel geeigneter Porengröße entsprechend ihrer Molmasse, wobei die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine eine lineare Funktion des Logarithmus ihres Molekulargewichts darstellt. Eine diskontinuierliche Gelelektrophorese wird durchgeführt um eine hohe Auflösung bei der Trennung zu erreichen. Hierzu wird das zu analysierende Proteingemisch in einem Gel aufgetrennt, das aus zwei Gelsystemen mit unterschiedlicher Porengröße und unterschiedlichen pH-Werten besteht. Zunächst laufen die Proteine durch ein grobporiges Sammelgel (Uppergel), in dem sie konzentriert werden und eine einheitliche Lauffront erreicht wird. Anschließend wandern sie in ein feinporiges Trenngel (Bottomgel), in dem die Auftrennung erfolgt.

Markerproteine, deren Molekulargewicht bekannt ist, werden parallel zu den zu untersuchenden Proteinen aufgetrennt, um das relative Molekulargewicht der Proteine zu ermitteln.

3.9.4 Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels

Das Gel wird zwischen zwei Glasplatten (14,5cm x 16,5cm) gegossen, von denen eine an einer Seite eine Aussparung aufweist. Gereinigt und entfettet werden die Platten vor ihrer Verwendung mit Ethanol (70% [v/v]). Die Teflon-Abstandshalter werden an die drei Seiten ohne Aussparung eingelegt und die Platten mit Klammern aufeinander befestigt. Die Ränder werden mit Agarose (1%) abgedichtet, damit das noch nicht polymerisierte Gel aus der Gießkammer ausläuft.

Zunächst wird das Trenngel zwischen die beiden Glasplatten gegossen (bis etwa 3cm unter den Rand) und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ überschichtet um die sich bildenden Luftblasen zu verdrängen. Sobald das Trenngel auspolymerisiert ist kann das Sammelgel nach vorheriger Entfernung des $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ darauf gegossen werden. Um später die Proteinproben auftragen zu können, werden Geltaschen mit einem Teflonkamm ausgespart. Nach erfolgter Polymerisation des Sammelgels werden der Kamm sowie der Abstandshalter an der Unterseite des Trenngels entfernt. Dann kann das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt werden. Diese besteht aus zwei Kammern, die mit Laufpuffer gefüllt werden. Durch das Gel wird eine „Brücke“ für den Strom gebildet, der fließt, wenn Spannung an die Kammer angelegt wird. Die Proteinproben werden mit Hilfe einer Hamilton-Mikropipette in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt im Sammelgel bei 25mA und im Trenngel bei 35mA für zweieinhalb bis drei Stunden.

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

Tab. 6: Komponenten für ein 10%iges Polyacrylamidgel

3.9.5 Western Blot (Immunoblot)

Der Western Blot dient dazu, die zuvor in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Membran (Nylon oder Nitrocellulose) zu übertragen. Dabei bleibt das nach der Auftrennung entstandene Proteinmuster immobilisiert auf der Membran erhalten. Bei niedriger Ionenstärke binden die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran. Dadurch bleibt sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine weitestgehend erhalten. Somit können die Proteine durch den Einsatz spezifische Antikörper immunologisch nachgewiesen werden (Immunoblot).

3.9.5.1 Proteintransfer

Bevor der Blot aufgebaut wird, wird die verwendete Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schuell) in PBS äquilibriert. Dieser wird in einer mit Transferpuffer gefüllten Wanne aufgebaut. Die verwendete Vorrichtung besteht aus zwei PVC-Gittern, die zusammengesteckt werden können. Auf das erste Gitter wird ein Wattetuch gelegt, darauf zwei Whatman-Papiere, gefolgt vom Polyacrylamidgel. Dieses wird mit der zuvor äquilibrierten Nitrocellulosemembran bedeckt. Darauf werden erneut zwei Whatman-Papiere und ein Wattetuch gelegt. Durch das zweite Gitter wurde der Blot luftblasenfrei abgeschlossen. Anschließend wird der Blot, in richtiger Orientierung zur Anode hin, in eine mit Transferpuffer gefüllte Kammer (LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit) eingespannt. Der Transfer wird bei 330mA in einer Stunde oder alternativ bei 35mA über Nacht durchgeführt. Nach erfolgtem Transfer wird die Nitrocellulosemembran zur unspezifischen Färbung aller Proteine ca. zehn Minuten mit PonceauS™ (Sigma-Aldrich) gefärbt. Dies führt zu einer reversiblen Färbung der Proteine auf der Membran, die mit Wasser wieder abgewaschen werden kann. Davor wird die Markerspür mit einem Skalpell abgetrennt, 15 Minuten in Amidoschwarz-Lösung angefärbt und anschließend wieder entfärbt. Die restliche Membran wird für etwa 30 Minuten bei RT in 5%iger PBS-Milch geblockt, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen.

3.9.5.2 Nachweisverfahren von Proteinen

3.9.5.2.1 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Der immunologische Nachweis wird mit Antikörpern gegen die zu untersuchenden Proteine durchgeführt. Dabei kann die Detektion der gebundenen Antikörper radioaktiv erfolgen oder durch Chemolumineszenz, wobei bei den beschriebenen Experimenten die Chemolumineszenz-Methode im Vordergrund steht. Nach dem Blocken wurde die Nitrocellulosemembran mit dem entsprechenden Antikörper in 2-5ml PBS-Milch (5% [w/v]) luftblasenfrei in eine Klarsichthülle eingeschweißt und auf dem Taumler über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wird die Membran drei Mal für 15 Minuten in PBS-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wird die Membran mit dem entsprechenden Sekundäntikörper, der mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist in 2-5ml PBS-Milch (5% [w/v]) luftblasenfrei in eine Klarsichthülle eingeschweißt und auf dem Taumler eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten von 15 Minuten in PBS-Puffer erfolgt die Detektion gebundener Sekundäntikörper mit Hilfe des ECL™-Kits (Enhanced Chemoluminescence, Amersham). Bei der Detektion erfolgt eine durch Peroxidase katalysierten Reduktion von H₂O₂ und gleichzeitig eine Oxidation von Luminol mit einer Lichtemission einer Wellenlänge von $\lambda = 428\text{nm}$, die durch einen blaulichtempfindlichen ECL™-Film (Hyperfilm ECL™, Amersham) dokumentiert werden kann. Dazu wird die Membran mit den kurz zuvor 1:1 gemischten ECL™-Lösungen 1 und 2 (je 3ml) für eine Minute inkubiert, mit Whatman-Papier getrocknet und der ECL™-Film für die entsprechende Expositionszeit aufgelegt. Der Film wird anschließend entwickelt, fixiert und zum Trocknen aufgehängt.

3.9.5.2.2 Nachweis radioaktiv markierter Proteine

Mit diesem Verfahren werden Proteine aus Zellen nachgewiesen, die zuvor radioaktiv markiert wurden und in den zu dieser Promotionsarbeit durchgeführten Experimenten aus Immunopräzipitationen stammen. Hierbei werden die zu untersuchenden Proteine mittels spezifischer monoklonaler Antikörper gebunden und es werden denaturierende Sample Buffer Proteinextrakte hergestellt. Diese

Proteinextrakte werden in einer SDS-PAGE aufgetrennt; parallel dazu der ^{14}C -Protein-Größenmarker.

Das Gel wird nach erfolgter Elektrophorese 15 Minuten in Fixierlösung (10% [v/v] Essigsäure, 30% [v/v] Isopropanol) zur Proteinfällung geschüttelt. Anschließend wird es drei Mal für fünf Minuten gewässert, um die SDS- und Essigsäure-Reste zu entfernen, die den Trocknungsprozess stören würden. Entwässert wird das Gel in DMSO für 30 bis 45 Minuten, dem PBO zugefügt sein kann, um das radioaktive Signal etwa zehnfach zu verstärken (Fluorographie). Nachdem das Gel auf dem Geltrockner getrocknet wird, wird ein Kodak X-Omat Röntgenfilm (Bremaphot, Saarbrücken) aufgelegt.

Ein weitaus sensitiveres Auswertungsverfahren liefert das Phosphorimager System (mit freundlicher Genehmigung durch das Institut für klinische Biochemie und Molekularbiologie (Herr Dr. Martin Jung), Homburg).

3.10 Immunologischer Proteinnachweis

3.10.1 Herstellung nativer Proteinextrakte

Native eukaryotische Proteinextrakte werden hergestellt, indem man zunächst ca. 5×10^6 Zellen zwei Mal in PBS wäscht. Danach erfolgt eine Resuspension in 2Vol Lysispuffer (PufferK: 100mM Tris/HCl [pH8,0], 100mM NaCl, 5mM KCl, 0,5mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 0,5% [v/v] NP40, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, 0,5mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin A, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin) mit anschließender Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Abschließend wird der Zell-Debris pelletiert (Zentrifugation für 20 Minuten bei 1300rpm und 4°C , Sigma Kryofuge 202MK) und der Extrakt kann bei alsbaldiger Verwendung auf Eis zwischengelagert oder aber bei -70°C eingefroren werden.

3.10.2 Radioaktive Markierung von eukaryotischer Zellen

Zur metabolischen Markierung mit ^{35}S wurden ca. 200ml dicht gewachsener Raji-Suspensionszellen zweimal in PBS und zweimal in Methionin-freiem RPMI-1640-Medium gewaschen und anschließend in 8ml Methionin- und Cystein-freiem RPMI-

1640-Medium, supplementiert mit 10% dialysiertem FKS und 1mCi ^{35}S -Methionin-Cystein-Gemisch, für ca. 6 Stunden bei 37°C inkubiert.

Zur Markierung mit ^{32}P werden die Zellen nach zweimaligem Waschen in PBS dagegen in Phosphat-freiem Medium gewaschen und anschließend in 10ml Phosphat-freiem RPMI-1640-Medium resuspendiert, dem 1mCi ^{32}P zugegeben werden.

Nach dreimaligem Waschen in eiskaltem PBS werden die Zellen unter nativen Bedingungen extrahiert und in Immunopräzipitations-Experimenten eingesetzt.

3.10.3 Immunpräzipitation

Immunopräzipitationen werden mit transfizierten oder TPA induzierten Rajis durchgeführt. Dazu werden zunächst 1ml der entsprechenden Antikörper mit der in PBS gewaschenen Protein-G-Sepharose (etwa 100 μl) über Nacht bei 4°C im Drehrad inkubiert. Das Antikörper-Sepharose-Gemisch wird mit 1ml Lysispuffer (s. 3.10.1) gewaschen (Zentrifugation: <5000rpm für wenige Sekunden, Sigma Kryofuge 202MK) und der Überstand verworfen. Zurück bleiben die an die Sepharose-gekoppelten Antikörper, die nun mit etwa 300 μl nativem Zellextrakt (s. 3.10.1) resuspendiert werden. Das Protein-Antikörper-Gemisch wird erneut auf dem Drehrad inkubiert (etwa 2 Stunden bei 4°C) und anschließend in einem Lysispuffer einer Molarität von 0,8M drei Mal gewaschen. Ein vierter Waschschrift mit 0,15M Lysispuffer löst das im Polyacrylamid-Gel störende Salz. Da das konstante Ende der Antikörper eine hohe Affinität zur Protein G-Sepharose besitzt ist eine Präzipitation der entstandenen Immunkomplexe möglich. Das Sepharose-Pellet, das nun an den Antikörper gebundenes Protein enthält wird in 2x Sample Buffer (blau) für zwei bis drei Minuten aufgekocht und die Sepharose-Reste werden bei 13000rpm und 4°C abzentrifugiert (Sigma Kryofuge 202MK). Der Überstand enthält das nachzuweisende Protein und kann nun in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot Verfahren nachgewiesen werden.

3.11 Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenzen werden angefertigt mit TPA-induzierten Rajis und nicht induzierten Rajis als Negativkontrolle. Hierzu werden die Zellen zunächst einmal in

PBS gewaschen und dann in einem ausreichenden Volumen PBS resuspendiert, dass ein getrockneter Tropfen der Zellsuspension auf dem Objektträger sich nicht überlagernde Zellen zeigt. Die auf dem Objektträger getrockneten Zellen werden für etwa 10 Minuten in vorgekühltem Aceton oder Methanol bei -20°C fixiert. In diesen Experimenten wurden die besseren Resultate mit Methanol-fixierten Zellen erzielt. Die so fixierten Zellen können, wenn sie nicht gleich weiterverarbeitet werden sollen, bei -20°C eingefroren werden.

Leicht angetaute Zellen werden mit dem 1:10 verdünnten BALF5-Antikörper überschichtet und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Erstantikörper wird gründlich mit PBS von den Zellen abgewaschen und $350\mu\text{l}$ des Zweitantikörpers (anti-Ratte-FITC 1:200) wird auf die Objektträger getropft. Es folgt eine erneute Inkubation von einer Stunde bei 37°C . Nachdem auch dieser Antikörper gründlich mit PBS vom Objektträger gewaschen wurde werden Deckgläser mit Elvanol auf die Objektträger aufgebracht. So können die gefärbten Zellen bei 4°C im Dunkel bis zur Auswertung mit Hilfe eines Immunfluoreszenzmikroskops (Leica DM IRB/E) mit angeschlossener Kamera (Axio-Cam Color Kamera (Zeiss) und der Software Axio Vision 3.0 gelagert werden.

4. Ergebnisse

Das onkogen wirkende Epstein Barr Virus kodiert für 23 mikroRNAs (Pfeffer et al., 2004; Cai et al., 2006; Grundhoff et al., 2006), von denen im Rahmen dieser Arbeit im Besonderen die miRNA-BART2 und deren Einfluß auf die virale DNA-Polymerase BALF5 untersucht werden sollte. MiRNAs können durch translationale Inhibition, durch Spaltung ihrer Ziel-mRNA oder durch Deadenylierung Einfluß auf die Protein-Expression nehmen. Die miRNA-BART2 ist als antisense-Transkript der 3'UTR von BALF5 perfekt komplementär zu ihrer Ziel-mRNA, weshalb eine Spaltung der Zielsequenz wahrscheinlich ist (Pfeffer et al., 2004). Mit den nachfolgend aufgeführten Experimenten soll eine Funktionsanalyse der miR-BART2 durchgeführt werden. Der Einfluß der miRNA-BART2 wurde in ersten Experimenten auf molekularer Ebene durch Reporter-Gen Experimente erbracht, nachfolgend auf Proteinebene. Um einen Einfluß der miRNA auf die Proteinexpression überprüfen zu können, wurde als Werkzeug ein monoklonaler Antikörper gegen das BALF5-Protein hergestellt. Die virale DNA-Polymerase stellt ein zentrales Enzym der viralen Replikation dar, weshalb um so erstaunlicher ist, dass bisher nur ein polyklonales Kaninchenserum in der Literatur beschrieben wurde, das BALF5 lediglich unspezifisch erkennt (Lin et al., 1991).

4.1 Die Spaltung der EBV DNA Polymerase BALF5 durch die miRNA-BART2

Im Jahr 2004 veröffentlichten Pfeffer et al., dass das Epstein-Barr Virus für fünf virale miRNAs kodiert, wovon die eine, miR-BART2, als antisense-Transkript zur 3'UTR des BALF5-Gens gebildet wird. Da ein Abschnitt der BALF5-mRNA somit perfekt komplementär zur miR-BART2 ist, gilt diese mRNA als potentielle Ziel-mRNA der entsprechenden miRNA. Aufgrund der 100%igen Komplementarität geht man von einer Spaltung der mRNA aus. Furnari et al. hatten bereits 1992 entdeckt, dass die EBV-kodierte DNA-Polymerase BALF5 in zwei unterschiedlich großen mRNA-Transkripten existieren. Sie konnten in Northern Blot Analysen der Zelllinien P3HR1, Raji, W-91 und FF-41 ein Transkript der Länge 5,08kb nachweisen und in B95.8-

Zellen eine verkürzte Variante der Länge 3,7kb. Damals spekulierte man, dass ein viraler Faktor für die Prozessierung dieser mRNA existieren muss. Bei diesem Faktor handelt es sich nach unseren Erkenntnissen vermutlich um die EBV-kodierte miR-BART2. Da eine Vorhersage der Ziel-mRNA bisher nur durch Computerberechnungen existiert, soll im Rahmen dieser Arbeit eine experimentelle Bestätigung der Vorhersage erfolgen.

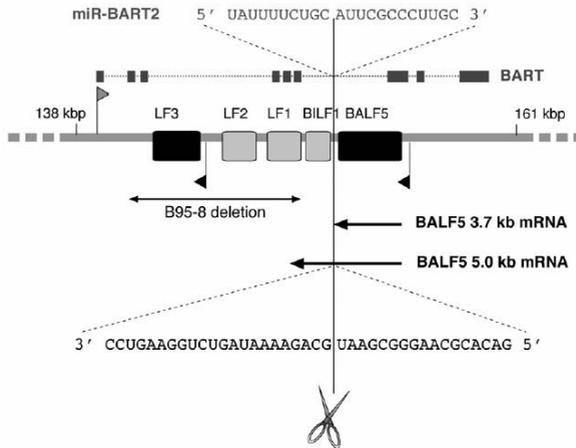


Abb.16: Schnittstelle der miR-BART2 in der 3'UTR von BALF5

Die miR-BART 2 ist ein antisense Transkript zur 3'UTR des BALF 5 Genes und somit ist diese miRNA laut Computervorhersagen in der Lage, diese als Ziel-mRNA vorhergesagte 3'UTR aufgrund der perfekten Komplementarität zu spalten. Die Schnittstelle liegt immer zwischen den Positionen 10 und 11 vom 5' Ende der miRNA.

(Pfeffer et al., 2004)

Die Spaltung der Ziel-mRNA erfolgt zwischen der Position 10 und 11 vom 5' Ende der miRNA, unabhängig von der Länge der miRNA (Elbashir et al., 2001; Hutvagner and Zamore, 2002).

In ersten Versuchen wurde auf molekularer Ebene der Einfluß der miR-BART2 auf die 3'UTR von BALF5 überprüft. Dazu wurde zunächst die miR-BART2 in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert und die Expression anhand eines Northern Blots validiert.

4.1.1 Klonierung der miR-Konstrukte

4.1.1.1 Klonierung der miR-BART2

Als Expressionsvektor für die miRNA-BART2 wurde der pSG5-Vektor gewählt. Um eine korrekte Prozessierung des miRNA-Vorläufers zu gewährleisten, wurde mittels des Primerpaars BART2-pSG5' und BART2-pSG3' ein insgesamt 240bp großes Fragment amplifiziert, welches auf der 5'Seite des 62bp großen Vorläufers 82 und auf der 3'Seite 98 flankierende Basenpaare enthält.

In Abbildung 17 sind positive Klone der Zwischenklonierung in dem pGEM-Vektor zu erkennen. Ausgewählt wurden die Klone, die im EcoRI-Verdau ein Insert der Länge von 240bp aufweisen, wie es in den Spuren 2, 3, 4, 5, 7 und 8 zu erkennen ist. Die entsprechenden aus dem Gel extrahierten Inserts standen zur Ligation in den vorbereiteten pSG5-Vektor zur Verfügung.

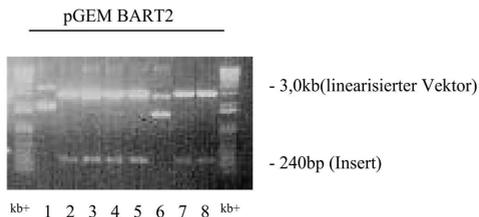


Abb.17: EcoRI-Verdau des pGEM BART2-Konstrukts

Nach erfolgter PCR-Amplifikation der gewünschten Vorläufer-miR BART2 wurde das Amplifikat in den pGEM-Vektor inkloniert und das Insert mit dem Restriktionsenzym EcoRI aus dem Vektor herausgeschnitten. Die Banden auf der Höhe von 240bp (vgl. Spuren 2, 3, 4, 5, 7 und 8) wurden zum Teil ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel reisoliert. Das 240bp-große Fragment steht zur Ligation in den Expressionsvektor pSG5 bereit.

Nach der Umklonierung des pre-miR-BART2-Fragmentes vom pGEM- in den pSG5-Vektor wurde zur Überprüfung der Orientierung ein Verdau mit dem Bgl II-Restriktionsenzym durchgeführt. Eine entsprechende Bgl II-site wurde dafür bei der Primerentwicklung eingeplant. Der Reaktionsansatz wurde anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Dabei erhielt man bei sense-Orientierung aufgrund der endständigen Enzym-site nur die Bande des linearisierten Vektors (4,1kb) und ein nicht nachzuweisendes Fragment der Länge von 18bp, wie in den Spuren 2, 3, 5, 8,

9 und 10 der Abbildung 18 zu sehen. Bei antisense-Orientierung des Inserts wurde dagegen ein 249bp langes Fragment ausgeschnitten und war als zweite Bande neben dem linearisierten Vektor zu sehen (vgl Spuren 1,4,6,7 und 11 der Abb 18).

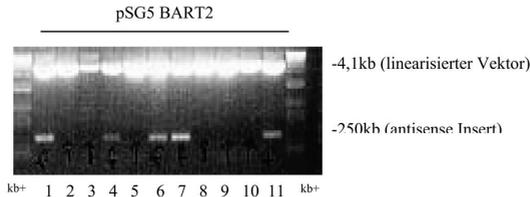


Abb.18: Orientierungsverdau des Effektorplasmids pSG5 BART2

Die elf erhaltenen Plasmide wurden mit dem Restriktionsenzym Bgl II verdaut, dessen Enzymsite endständig im Insert liegt. Für Klone, die das Insert in sense Orientierung enthielten, erhielt man ein nicht nachzuweisendes Fragment der Länge 18bp und den linearisierten Vektor (4,1kb), wie in den Spuren 2, 3, 5, 8, 9 und 10 zu sehen. Im umgekehrten Fall erhielt man ein Fragment der Länge 249bp wie in den Spuren 1, 4, 6, 7 und 11 zu sehen.

Die Klone, die das Insert in sense-Orientierung enthalten, können nun für die geplanten Versuche eingesetzt werden, wobei diese vor Gebrauch zum Ausschluß einer unerwünschten Mutation im Fremdlabor (GATC, Konstanz) sequenziert wurden.

4.1.1.2 Klonierung der miR-155

Parallel zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zur Überprüfung des Einflusses der miR-BART2 auf BALF5 führte Frau Petra Goutier im Rahmen ihrer Promotionsarbeit Versuche durch, die die Regulation der miR-BHRF1-2 und 1-3 auf deren Ziel-mRNA BFLF2 untersuchen. Als Negativkontrolle wurde in beiden Versuchsreihen der Vektor pSG5-miR155 verwendet, der von Frau Petra Goutier hergestellt wurde.

Aus humaner genomischer DNA wurde mittels PCR (Primerpaar 5' Eco miR155 und 3'Bgl miR155) der Abschnitt der humanen BIC-mRNA amplifiziert (Position 162-391), der als miR-155 bezeichnet wird. Das BIC-Gen gilt als Onkogen, das im Hodgkin-

Lymphom überexprimiert wird. Es wird kein Einfluß auf die virale DNA-Polymerase BALF5 erwartet.

In der Abbildung 19 wird die Überprüfung der Orientierung der gewonnenen Klone gezeigt. Durch die eingebaute EcoRI-Schnittstelle in den Primern wurde nach entsprechendem Verdau bei in „sense“-Orientierung eingebautem Insert ein Fragment der Länge von etwa 240bp erwartet. Ein solches Fragment ist in der Spur 2 zu erkennen. Dieser Klon wurde nach entsprechender Sequenzierung (GATC, Konstanz) für die weiteren Experimente verwendet.

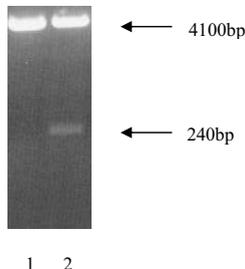


Abb.19: Orientierungsverdau des Effektorplasmids pSG5-miR155

Die gewonnenen Plasmide wurden mit dem endständig liegenden Bgl II-Restriktionsenzym verdaut, wobei bei sense-Orientierung des Inserts zum Einen eine Bande bei 4,1kb zu erkennen ist und eine zweite mit der Größe des Inserts von 240bp (vgl. Spur 2). In Spur 1 ist lediglich der linearisierte Vektor zum Vergleich aufgetragen. Im Fall der antisense-Orientierung hat das zweite Fragment eine Größe von 18bp und war auf dem 1%igen Agarosegel nicht darzustellen.

4.1.2 Expressionskontrolle der miRNA-Konstrukte

4.1.2.1 Expressionskontrolle des pSG5-miR-BART2-Konstrukts

Die erste Voraussetzung für das Arbeiten mit den erstellten Konstrukten ist, dass diese in Zellen exprimieren. Zur Expressionkontrolle der erstellten miRNA-Konstrukte wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt.

Hierzu wurden die Zelllinien BL41 (EBV neg.), BL41 B95-8 (EBV pos.) und mit pSG5-BART2 transfizierte HeLa-Zellen (EBV neg., BART2 pos.) eingesetzt. Aus diesen

Zellen wurde 48h nach Transfektion mit dem TriFast™-Verfahren Gesamt-RNA gewonnen, diese auf ein 12% SequaGel™ aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennte RNA wurde auf eine Hybond-N+ Membran mittels „Semidry“-Blot Verfahren transferiert und dann mit dem ATP-endmarkierten antisense miR-BART2 DNA-Oligonukleotid hybridisiert. Die auf diese Art markierte miR-BART2 konnte nun mittels Phosphor-Imager Screen (Institut für klinische Biochemie und Molekularbiologie, Homburg/ Saar) oder per Kodak X-Omat Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

In der Abbildung 20 wurde in der ersten Spur als Negativkontrolle die Gesamt-RNA der EBV-negativen BL41-Zellen aufgetragen. Wie erwartet waren keine Banden zu erkennen. In der zweiten Spur dagegen wurde RNA der EBV-positiven Zellen aufgetragen und es ist eine schwache Bande auf Höhe der reifen miRNA zu sehen. Wurde nun RNA mit dem pSG5-miRBART2-Konstrukt transfizierter HeLa-Zellen aufgetragen können zwei Banden erkannt werden. In Spur 3 läßt sich sowohl auf der Höhe von 62nt eine deutliche Bande der Precursor miRNA erkennen sowie die Bande auf Höhe von 22nt, die der reifen miRNA entspricht. Somit ist die erste Voraussetzung für das Weiterarbeiten mit dem erstellten Konstrukt erfüllt.

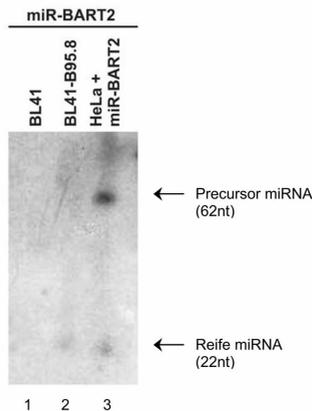


Abb.20: Northern Blot- Analyse zum Nachweis der ektopischen Expression der miRNA-BART2

Nach Transfektion des Konstrukts in die HeLa-Zelllinie wurde aus diesen Gesamt-RNA isoliert, die RNA elektrophoretisch aufgetrennt, mittels Semidry-Blot auf eine Membran

überführt, mit einer radioaktiv markierten Sonde gekennzeichnet und mittels des Phosphor-Imager Verfahrens sichtbar gemacht. In der Spur 1 ist zur Kontrolle Gesamt-RNA der EBV-negativen Zellen BL41 aufgetragen, in Spur 2 RNA der EBV-positiven BL41-B95.8 Zellen, bei denen auf Höhe der reifen miRNA bereits eine schwache Bande zu erkennen ist. Die mit dem pSG5-BART2-Konstrukt transfizierten HeLa-Zellen zeigten in der Auftrennung der Gesamt-RNA deutliche Banden sowohl auf der Höhe der Precursor miRNA bei etwa 62nt als auch auf Höhe der reifen miRNA bei 22nt.

Die Vorläufer- und die reife miRNA sind mit Pfeilen markiert.

4.1.2.2 Expressionskontrolle des pSG5-miR155-Konstrukts

Zum Nachweis der Expression des pSG5-miR155-Konstrukts wurde grundsätzlich nach der oben beschriebenen Methode vorgegangen, wobei hier zum Einen EBV negative BL41-Zellen als Negativkontrolle eingesetzt wurden, zum Anderen die HeLa-Zell-RNA aus zwei voneinander unabhängigen Transfektionen mit dem zu überprüfenden Konstrukt verwendet wurde. Eine weitere Änderung besteht in der Markierung der für den miRNA genutzten Sonde. In diesem Fall handelt es sich nicht wie oben um eine reine Sonden-Endmarkierung, sondern es wurde nach dem Protokoll zur *mirVana*TM miRNA-Sondenkonstruktion vorgegangen. Hierbei ergibt sich der Vorteil, dass sich nicht nur an einem Ende der verwendeten Sonde ein radioaktives Nukleotid befindet, sondern alle eingesetzten UTPs radioaktiv markiert werden können, was das Verfahren deutlich sensitiver macht.

In der Abbildung 21 ist in der ersten Spur als Negativkontrolle Gesamt-RNA aus BL41 Zellen aufgetragen, in der zweiten und dritten Spur sind Gesamt-RNA-Extrakte aus HeLa-Zellen aufgetragen, die mit zwei unterschiedlichen DNA-Präparationen des pSG5-miR-BART2-Konstruktes transfiziert wurden. In diesen beiden Spuren kann man sowohl auf der Höhe der Precursor-miRNA (~60nt) sowie auf der Höhe der reifen miRNA (22nt) eine deutliche Bande erkennen.

In diesem Experiment gelang der Nachweis der Vorläufer-miRNA sowie der reifen miRNA in den transfizierten HeLa-Zellen (Spuren 2 und 3 der Abb. 21). Somit steht das Konstrukt als Negativkontrolle für die folgenden Experimente zur Verfügung.

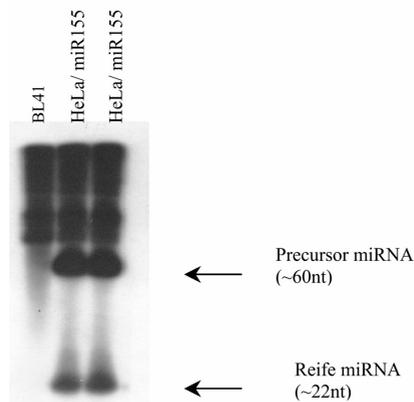


Abb.21: Northern Blot- Analyse zum Nachweis der ektopischen Expression der miRNA-miR155

Hierzu wurde die Gesamt-RNA von EBV negative BL41-Zellen vergleichend mit der Gesamt-RNA aus zwei voneinander unabhängigen Transfektionen von HeLa-Zellen mit dem pSG5-miR155-Konstrukt aufgetragen und im Northern Blot analysiert. In der ersten Spur der BL41-Zellen war weder eine Vorläufer- noch eine reife miR155 nachweisbar, was in den Spuren 2 und 3 der Fall ist. Somit ist ein Nachweis der Expression des Konstruktes erbracht.

Die Vorläufer- und die reife miRNA sind mit Pfeilen markiert.

4.1.3 Klonierung der 3'UTR von BALF5

Die mRNA der EBV kodierten DNA-Polymerase BALF5 ist potentielle Ziel-mRNA der miR-BART2 (Pfeffer et al., 2004). Aufgrund der vollständigen Komplementarität wird eine Spaltung der mRNA vorhergesagt. Da nach der Degradation der mRNA eine Translation weniger wahrscheinlich geworden ist, ist eine Abnahme der Proteinmenge zu erwarten. Um diese Verringerung der Translationsrate nachzuweisen, wurde der Luciferase-Reportergen-Assay eingesetzt. Als Reporterkonstrukt wurde in den Luciferase-Reportervektor pGL3-Promotor der betreffende Bereich der 3'UTR des Zielgens BALF5 unmittelbar hinter den ORF (open reading frame) des Luciferase-Gens einkloniert. Die Bindung der miRNA-BART2 an den angefügten 3'UTR-Bereich sollte so zu einer negativen Regulation der Luciferase-Expression führen.



Abb.22: Schematische Darstellung der Regulation der miR-BART2 auf ihre potentielle Ziel-mRNA BALF5

Im Luciferase-Reportergen-Assay sollte die nach Computeranalysen-vorhergesagte Negativregulation durch die miR-BART2 auf die 3'UTR des BALF5-Genes nachgewiesen werden. Dazu wurde der entsprechende Abschnitt der Ziel-mRNA direkt hinter den Luciferase-ORF des pGL3-Vektors inkloniert. Die miR-BART2 sollte an die Zielsequenz binden und so zu einer negativen Regulation des vorgeschalteten Luciferase-Gens führen.

Die negative Regulation der BALF5-3'UTR durch die miR-BART2 sollte durch Messen der Luciferase-Aktivität im Luminometer indirekt nachgewiesen werden.

Es wurde die vollständige 3'UTR des BALF5-Genes (Position 152188 bis 153228 des EBV-Genoms (Gene Bank AJ507799)) mit einer Länge von 1058bp aus der genomischen B95.8-Zell-DNA amplifiziert. Die vorhergesagte Bindungsstelle durch die miRNA liegt zwischen den Positionen 152747 und 152768. An den Enden des Amplifikats liegen entsprechend XbaI-Enzymschnittstellen, um das Fragment in den XbaI-geschnittenen und dephosphorylierten pGL3-Promotor-Vektor einfügen zu können.

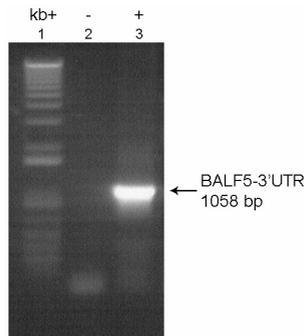


Abb.23: Kontrollgel des PCR-Amplifikats BALF5-3'UTR

PCR-Amplifikation des BALF5-3'UTR mit dem Primerpaar aus genomischer B98.8 DNA bei einer Annealingtemperatur von 64°C. In Spur 2 wurde eine Negativkontrolle aufgetragen, in Spur 3 eine Aliquot der PCR-Reaktion.

Zur Überprüfung des Vorliegens eines „sense“-orientierten Klons wurde das Konstrukt mit Bgl II verdaut (nicht gezeigt). Es wurde zum Ausschluss einer Mutation des BALF5-3'UTR Inserts ein positiver Klon sequenziert (GATC, Konstanz) und anschließend als Reporterplasmid im Luciferasereporter-Assay eingesetzt.

4.1.4 Luciferase-Reportergen-Assay

Mittels der Luciferase-Reportergen-Assays soll die negative Regulation der BALF5-Proteinmenge durch die miR-BART2 erfasst werden. Es wurden hierzu die zuvor hergestellten Konstrukte in die in 24-Loch-Platten nach Herstellerangaben ausgesäten 293T-Zellen mittels Nanofectin™ – Reagenz transfiziert. Um die Transfektionseffizienz durch FACS-Analyse quantifizieren zu können, wurde der Vektor pEGFP-C1-Vektor kotransfiziert. Geerntet wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion und Proteinextrakte hergestellt. Die gemessene Luciferase-Aktivität wurde mit der durchflußzytometrisch bestimmten Transfektionseffizienz standardisiert.

4.1.4.1 Einfluß der miRNA BART2 auf die BALF5 3'UTR

In einem ersten Versuchsansatz wurde das Reporterkonstrukt pGL3-BALF5 3'UTR eingesetzt und überprüft, ob die miR-BART2 eine signifikante Verringerung der Luciferaseaktivität auslösen kann. Die Spuren 1 und 2 der Abbildung 24 dienen als Kontrollen. Diese Zellen wurden nicht mit einem Konstrukt transfiziert, das die Luciferasegen enthält und es ist somit keine Luciferaseaktivität zu erwarten. In Spur 3 ist die Luciferaseaktivität der Extrakte von Zellen dargestellt, die mit dem pGL3-BALF5 3'UTR-Konstrukt und dem pSG5-Vektor transfiziert wurden. Die Aktivität wird auf 100% normiert. Im Vergleich dazu ist in Spur 4 die Co-Transfektion des Effektor- und Reporterkonstruktes dargestellt. Man kann einen signifikanten ($p=0,001667$, [$p<0,005$]) Aktivitätsverlust von etwa 45% feststellen was die oben aufgestellte

Hypothese deutlich bestätigt. Die Aussage, dass die miRNA-BART2 in der Lage ist, die Ziel-mRNA zu spalten wird durch diese relativ starke Abnahme bestätigt. Dies war der entscheidende Hinweis darauf, dass die miR-BART2 tatsächlich die Aktivität der BALF5-3'UTR negativ reguliert.

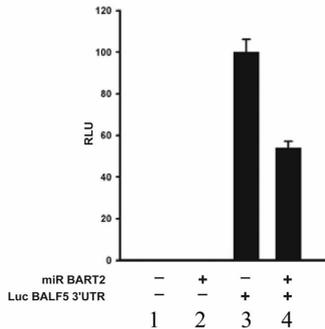


Abb.24: Einfluß der miR-BART2 auf das pGL3-BALF5-Reporterkonstrukt

Zum Nachweis des spezifischen Einflusses der miR-BART2 auf das pGL3-BALF5-Konstrukt wurden in diesem Versuch 293T-Zellen mit 0,2µg pEGFP-C1 sowie mit verschiedenen Kombinationen aus 0,2µg Reporter- und 0,8µg Effektorplasmiden (x-Achse) transfiziert. Auf der y-Achse wurde die standardisierte, relative Luciferase-Aktivität (RLU in %) aufgetragen. Der Wert für pGL3-BALF5 wurde auf 100% gesetzt. Die Balken stellen Mittelwerte aus fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit jeweils doppeltem Ansatz dar. Ebenfalls wurde der mittlere Fehler angezeigt.

Wie aus dem Balkendiagramm hervorgeht, reduzierte die miR-BART2 die Luciferaseaktivität des pGL3-BALF5-Reporterkonstruktes signifikant um etwa 45% ($p=,001667$, [$<0,05$]).

miR BART2: pSG5-miRBART2-Effektorkonstrukt

Luc BALF5 3'UTR: pGL3-BALF5-Reporterkonstrukt

4.1.4.2 Einfluß der miRNA BART2 auf den pGL3-Vektor

Um einen unspezifischen Einfluß der miR-BART2 auf den pGL3-Promotor-Vektor ausschließen zu können, wurde das oben beschriebene Experiment unter gleichen Bedingungen mit dem leeren pGL3-Vektor statt dem pGL3-BALF5-3'UTR Konstrukt wiederholt. Es wurde erneut die relative Luciferaseaktivität einer Negativkontrolle (Extrakte aus pSG5-transfizierten Zellen) (vgl. Spur 1, Abb. 25) gemessen und

Extrakte von Zellen mit der miR-BART2 alleine (Spur 2), ohne den Luciferase-Reporter-Vektor. Die Luciferaseaktivität der Zellextrakte nach Transfektion mit dem pGL3-Promotor-Vektor und dem pSG5-Konstrukt (Spur 3) wurde als Referenzwert auf 100% normiert. In Spur 4 ist schließlich die Aktivität der hergestellten Zellextrakte nach Co-Transfektion des Effektor- und Reporterkonstruktes dargestellt.

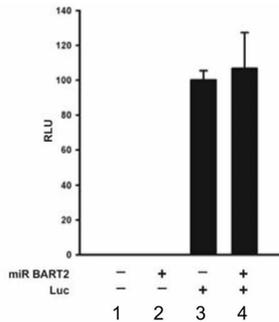


Abb.25: Einfluß der miR-BART2 auf den pGL3-Promotor-Vektor

Um einen unspezifischen Einfluss des pSG5-BART2-Effektorkonstruktes auf die Luciferaseaktivität ausschließen zu können wurden 293T-Zellen mit 0,2µg pEGFP-C1 sowie mit verschiedenen Kombinationen aus 0,2µg pGL3-Vektor und 0,8µg Effektorplasmiden (x-Achse) transfiziert. Auf der y-Achse wurde die standardisierte, relative Luciferase-Aktivität (RLU in %) aufgetragen. Der Wert für pGL3 wurde auf 100% gesetzt (Spur 3). Die Balken stellen Mittelwerte aus fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit jeweils doppeltem Ansatz dar. Ebenfalls wurde der mittlere Fehler angezeigt.

Wie aus dem Balkendiagramm hervorgeht, reduziert die miR-BART2 die Luciferaseaktivität des pGL3-Vektors nicht (vgl. Spuren 3 und 4).

miR BART2: pSG5-miR-BART2-Effektorkonstrukt

Luc: pGL3-Promotor-Vektor

4.1.4.3 Einfluß der unspezifischen miR155 auf die BALF5 3'UTR

Als weitere Frage blieb nun zu klären, ob es sich bei der oben gemessenen Reduktion um einen miRNA-BART2-spezifischen Effekt handelt oder ob prinzipiell jede mikroRNA die gleiche Veränderung hervorrufen kann. Im folgenden Versuch wurde statt des pSG5-BART2-Konstruktes das pSG5-miR-155-Konstrukt als

Effektorplasmid eingesetzt und erneut die Luciferase-Aktivität gemessen und mit der Transfektionseffizienz standardisiert.

Wie aus Abbildung 26 hervorgeht, war dieses Effektorplasmid mit der EBV-unspezifischen miR155 nicht in der Lage, eine Reduktion der Luciferase-Aktivität hervorzurufen (vgl. Spur 4). Vergleicht man die Aktivität der Transfektion mit pGL3-BALF5 3'UTR (Spur 3) mit der Aktivität bei Co-Transfektion von Effektor- und Reporterkonstrukt wurde lediglich eine nicht signifikante ($p=0,811$) Aktivitätserhöhung um etwa 6% beobachtet.

Damit wurde gezeigt, dass BALF5 nicht von einer unspezifischen miRNA zu beeinflussen ist, sondern dass es sich hierbei um einen spezifischen Effekt zwischen der miRNA-BART2 und der dazugehörigen Ziel-Sequenz der BALF5 3'UTR handelt.

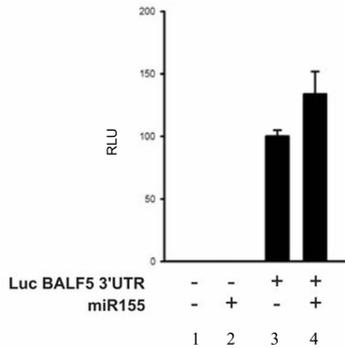


Abb.26: Regulierung der BALF5-Expression durch die EBV-unspezifische miR-155

293T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Reporter- und Effektorplasmiden (x-Achse) transfiziert. Die y-Achse zeigt die standardisierte, relative Luciferaseaktivität [%]. Der Wert für pGL3 wurde auf 100% gesetzt. Die Balken stellen die Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit jeweils doppeltem Ansatz dar. Der mittlere Fehler des Mittelwertes wurde wiederum angezeigt.

Dieses Experiment diente dazu, eine unspezifische Regulation der 3'UTR von BALF5 auszuschließen. Wie aus dem Balkendiagramm hervorgeht, führt die miR-155 nicht zu einer signifikanten Verringerung der BALF5-Proteinexpression ($p=0,0923$).

Luc BALF5 3'UTR: Reporterkonstrukt pGL3-BALF5 3'UTR

miR155: Effektorkonstrukt pSG5-miR-155

4.2 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das BALF5-Protein

Nachdem aus den Luciferase-Reporter-Experimenten erste Erkenntnisse über einen negativen regulativen Einfluß der miR-BART2 auf die 3'UTR von BALF5 gewonnen waren, sollte das Ergebnis in einem weiteren Schritt *in vivo* auf Proteinebene verifiziert werden. Allerdings musste das dazu notwendige Werkzeug, ein monoklonaler Antikörper gegen das BALF5-Protein, zunächst hergestellt werden. Bisher ist nur ein polyklonales Kaninchenserum gegen dieses zentrale Enzym der lytischen EBV-Vermehrung beschrieben (Lin et al., 1991). Dieses ist für die hier geplanten Untersuchungen nicht spezifisch genug, deshalb musste der monoklonale Antikörper zunächst hergestellt werden.

In ersten Ansätzen wurde versucht, über ein GST-Fusionsprotein, das Teile der kodierenden Sequenz von BALF5 enthält und ein Molekulargewicht von 64,3kDa aufweist (PCR-Amplifikation und Einklonieren in den pGEX-4T-1 Vektor), eine Immunreaktion mit entsprechender Bildung monoklonaler Antikörper in Ratten und Kaninchen hervorzurufen. Allerdings konnte in keiner der verwendeten Ratten eine entsprechende Antikörperproduktion nachgewiesen werden bzw. die in den Kaninchen produzierten Antikörper erkannten nicht das vollständige BALF5-Protein (110kDa).

In dem folgenden Experiment entschloss man sich zur Herstellung eines BALF5-Peptids zur Immunisierung von Ratten durch Frau Dr. med. Elisabeth Kremmer, GSF München.

4.2.1.1 Herstellung des BALF5-Peptids zur Immunisierung von Ratten

Vom Peptide Specialty Laboratory (PSL, Heidelberg) wurde anhand einer von uns vorgegeben Sequenz ein BALF5-Peptid hergestellt. Bei dem Peptid handelt es sich um ein internes Peptid (Aminosäuren 66-87: G66KGMWWRQRAQEGTARP EADT87C) der EBV-DNA-Polymerase BALF5. Um dieses für Versuchstiere immunogen zu machen mußte es über Schwefelbrücken an ein KLH-Tetramer (Keyhole-Limpet-Haemocyanin), dem Blutfarbstoff einer Schneckenart, gekoppelt werden. Das Screening der Antikörper erfolgte im ELISA über das an Ovalbumin gekoppelte Peptid (OVA-Peptid). Das OVA-Peptid war auf einer Mikrotiterplatte gebunden. Als Negativkontrolle diente ein unspezifisches OVA-Peptidkonjugat.

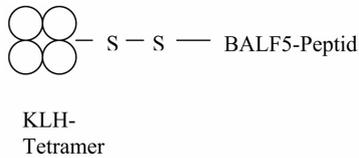


Abb.27: BALF5-Peptid zur Immunisierung von Ratten

4.2.1.2 Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen BALF5

Die Immunisierung der Ratten und das Gewinnen der Antikörper wurde von Frau Dr. med. Elisabeth Kremmer, GSF München, durchgeführt. Die zugrundeliegende Methode ist bei (Kremmer et al., 1995) ausführlich beschrieben.

Zur Antikörperherstellung werden Lou/C-Ratten benutzt, denen nach Antigenexposition die Milz entfernt wird. B-Zellen aus dem Milzgewebe werden mit ungehemmt-wachsenden Myelomzellen (B-Zell-Tumor) fusioniert. Diese Fusionszellen werden als Hybridomazellen bezeichnet und sind schnellwachsende Tumorzellen, die große Mengen Antikörper produzieren. Die so produzierten Antikörper-Klone werden in einem ELISA-Verfahren gegen das dem Peptid angehängtem Ovalbumin-Peptid auf ihre spezifische Antikörpererkennung gescreent. Im ELISA-Test positive Klone wurden an unsere Arbeitsgruppe versandt zur weiteren Charakterisierung und Verwendung.

4.2.2 Charakterisierung der gewonnenen monoklonalen BALF5-Antikörper

4.2.2.1 Western Blot

Nach der ersten Fusion konnte Frau Dr. Elisabeth Kremmer (GSF, München) acht monoklonale Antikörper etablieren, die das BALF5-spezifische Peptid in einem Screening-ELISA erkannten.

Zur Charakterisierung der erhaltenen Klone wurde zunächst eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden aus verschiedenen Zelllinien Proteinextrakte hergestellt. Als Negativkontrollen dienten die Extrakte von Zelllinien, die kein EBV-

Protein enthalten. Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um die EBV- und somit auch BALF5-negative Zelllinie BL41, außerdem wurden EBV-positive Raji-Zellen benutzt, zum Einen in Latenz (d.h. ohne DNA-Polymerase), zum Andern durch TPA-Induktion (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) im lytischen Zyklus replizierend (d.h. mit DNA-Polymerase). Pro Zelllinie werden 30µg Protein auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Eine Antigen-Antikörper-Reaktion wurde nur in der Spur erwartet, in der der entsprechende Proteinextrakt aufgetragen wurde, der aus den TPA-induzierten Raji-Zellen gewonnen wurde. Die anderen Extrakte dienten als Negativkontrolle.

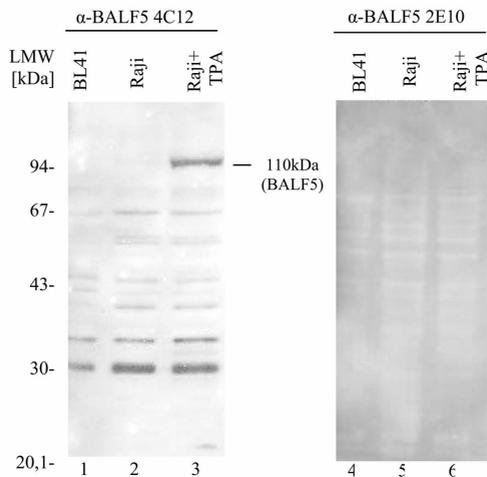


Abb.28: Western Blot Nachweis des BALF5-Proteins mit den monoklonalen Antikörper 4C12 und 2E10

Es wurden denaturierende Proteinextrakte von BL41-Zellen (EBV/BALF5 neg.), nicht-induzierten Raji-Zellen (EBV pos./BALF5 neg.) und TPA-induzierten Raji-Zellen (EBV/BALF5 pos.) gewonnen, diese in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und dann mit dem jeweils zu testenden Antikörper angefärbt. Dabei stellte sich heraus, dass nur der Antikörper BALF5-4C12 (s. Abb. links) spezifisch das Protein erkannte. Deutlich zu erkennen ist, dass nur in Spur 3 eine Bande auf der Höhe von 110kDa verläuft, die Spuren 1 und 2 (Negativkontrollen) zeigen auf der entsprechenden Höhe keine reaktiven Proteinbanden.

In der links danebenliegenden Spur dienten als Molekulargewichtsmarker in absteigender Reihenfolge Phosphorylase b (94kDa), Kälberserumalbumin (67kDa), Ovalbumin (43kDa),

Carboanhydrase (30kDa), Trypsininhibitor aus Sojabohnen (20,1kDa) und Lactalbumin (14,4kDa).

Der in Abbildung *rechts* dargestellte Western Blot wurde mit dem Antikörper BALF5-2E10 gefärbt und ist stellvertretend für die anderen negativ getesteten Antikörper gezeigt. Auf der zu erwartenden Höhe von 110kDa ist keine reaktive Bande zu erkennen.

Aus dieser Abbildung geht hervor, dass der monoklonale Antikörper 4C12 BALF5 spezifisch erkennt. Die Bande in Spur 3 liegt bei 110kDa, auf entsprechender Höhe in den Negativkontrollen (Spuren 1, 2, 4 und 5) sind keine reaktiven Banden zu sehen. Die übrigen Banden in Abbildung 28 *links* sind unspezifische Reaktionen, die vermutlich durch den Zweitantikörper (anti-rat pox) hervorgerufen wurden.

Von den acht zur Verfügung gestellten Peptid-spezifischen Antikörpern erkannte nur der Klon 4C12 das BALF5-Protein im Western Blot. Stellvertretend für die sieben negativen Antikörper ist der Antikörper 2E10 dargestellt.

Somit steht ein erster monoklonaler BALF5-Antikörper zur Verfügung, wodurch weitere Versuche durchgeführt werden können. Bisher war lediglich ein polyklonaler, aus Kaninchen gewonnener Antikörper von (Lin et al., 1991) eingesetzt worden. Durch den monoklonalen Antikörper wird eine Differenzierungsmöglichkeit für EBV-infizierte Zellen geschaffen. Es kann nun unterschieden werden, ob sich diese in einem Stadium der Latenz befinden, in dem BALF5 nicht exprimiert wird oder ob eine lytische Replikation des Virus stattfindet.

4.2.2.2.1 Immunpräzipitation

Da lediglich einer der ersten acht Antikörper eine positive Reaktion im Western Blot zeigte, sollte in einem weiteren Verfahren geklärt werden, ob ein weiterer Antikörper spezifisch auf das BALF5-Protein reagiert.

Hierzu wurden aus TPA-induzierten Raji-Zellen native Proteinextrakte gewonnen, denn im folgenden Versuchsansatz mussten die BALF5-Bindungsstellen in einem nativen Zustand erhalten sein. Somit stehen zur Erkennungsreaktion weitere Antigenstrukturen zur Verfügung, wodurch möglicherweise auch die anderen Antikörper eine effiziente Bindung eingehen können.

Die verschiedenen zu testenden Antikörper und der als Negativkontrolle dienende Antikörper BDV p40 5F11 (Grässer und Kremmer, unveröffentlicht) wurden, um eine spätere Präzipitation zu ermöglichen, an Protein G-Sepharose gekoppelt, denn der

konstante Teil der Antikörper hat eine hohe Affinität zur Protein G-Sepharose. Der Raji-Zell-extrakt wurde auf die verschiedenen Antikörper zu gleichen Teilen aufgeteilt. In mehreren Waschschrritten wurde überschüssiges Antigen entfernt und das an den Antikörper gekoppelte BALF5-Protein konnte durch eine Fällung der anhängenden Protein G-Sepharose gewonnen werden. Die präzipitierten Proben wurden in SDS-Gelpuffer gelöst und jeweils gleiche Proteinmengen pro getestetem Antikörper wurden in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach anschließendem Transfer auf die Nitrozellulosemembran wurde das BALF5-Protein mit dem BALF5-Antikörper 4C12 gefärbt.

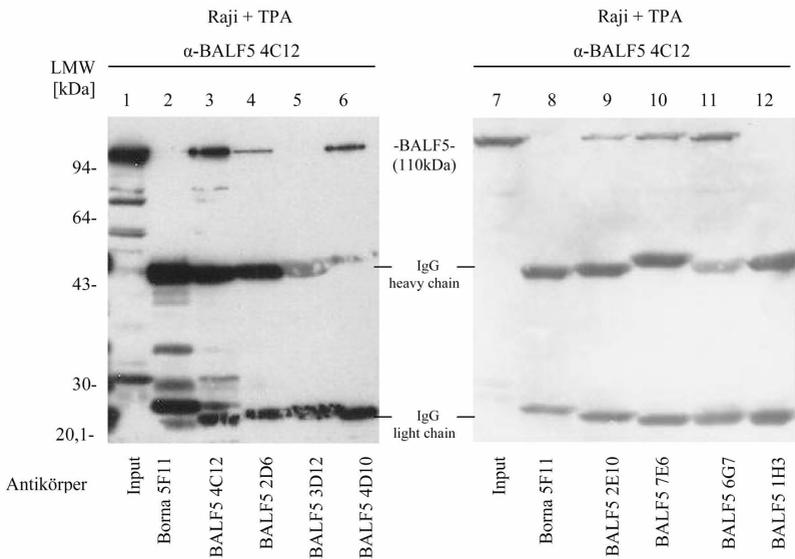


Abb.29: Nachweis des BALF5-Proteins mit monoklonalen Antikörpern in der Immunpräzipitation

Ein Extrakt aus TPA-induzierten, EBV-positiven Zellen wurde mit den angezeigten Antikörpern einer Immunpräzipitation unterworfen. Die an Protein-G-Sepharose gebundenen Immunkomplexe wurden in SDS-Gelpuffer resuspendiert und im Western Blot mit dem BALF5-spezifischen monoklonalen Antikörper 4C12 gefärbt.

Die Ladekontrolle zeigt, dass der Zellextrakt lösliches BALF5-Protein enthält (Spuren 1 und 7). Zur Kontrolle wurde ein irrelevanter Antikörper (anti BDV p40, Klon 5F11) mitgeführt (Spuren 2 und 8).

Eine spezifische Erkennung des BALF5-Proteins in der Immunpräzipitation zeigen die BALF5-Antikörper 4C12 (Spur 3), 2D6 (Spur 4), 4D10 (Spur 6), 2E10 (Spur 9), 7E6 (Spur 10) und 6G7 (Spur 11).

Als Ladekontrolle wurde auf jedes Gel der gewonnene native Proteinextrakt der TPA-induzierten Raji-Zellen aufgetragen (vgl. Spuren 1 und 7, Abb. 29), um sicherzugehen, dass das BALF5-Protein im Extrakt enthalten war. Zum Ausschluss einer unspezifischen Reaktion der Antikörper wurde das Präzipitat des unspezifischen Kontroll-Antikörpers in den Spuren 2 und 8 aufgetragen.

In diesem Experiment zeigen nun neben dem BALF5 4C12-Antikörper auch die Antikörper 2D6, 4D10, 2E10, 7E6 sowie 6G7 eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion. Man kann in den Spuren 3, 4, 6, 9, 10 und 11 der Abbildung 29 jeweils eine Bande bei 110kDa erkennen, die dem BALF5-Protein zugeordnet wird. Die Bande bei ca. 45kDa entspricht der schweren Kette der Antikörper, die bei etwa 25kDa der leichten Kette.

Die hier positiv getesteten Antikörper stehen zum weiteren Gebrauch in Immunpräzipitationsversuchen zur Verfügung, beispielsweise zur Präzipitation von neu gebildetem BALF5-Protein zu Beginn einer lytischen EBV-Replikation.

4.2.2.2 Immunpräzipitation von radioaktiv markiertem BALF5-Protein

Mit der durchgeführten radioaktiven Immunpräzipitation hat man eine weitere Nachweismethode sehr geringer Proteinmengen, wie sie in den folgenden Experimenten zu erwarten sind. Hier wurde der BALF5-Antikörper 4C12, der sich bereits im Western Blot und in der Immunpräzipitation als spezifisch erwiesen hat, auf seine Eignung für weiterführende Experimente getestet.

Als EBV-positive Zelllinie diente wiederum der Raji-Stamm, bei dem mit TPA der lytische Zyklus und somit die BALF5-Proteinproduktion induziert wurde. Als Vorbereitung für die jeweilige radioaktive Markierung wurden die Zellen in Spezialmedien gewaschen. Für die Markierung mit ^{35}S in Methionin-freiem RPMI-Medium, für die Markierung mit ^{32}P in Phosphat-freiem RPMI-Medium. Anschließend wurde zu den in PBS suspendierten Zellen entsprechend $100\mu\text{l}$ ^{35}S bzw. $20\mu\text{l}$ ^{32}P mit je einer Aktivität von 1mCi zugegeben. Nach etwa fünfständiger Inkubationszeit wurden native Zellextrakte gewonnen. Der BALF5 4C12-Antikörper und die als

Negativkontrolle dienenden Antikörper BFLF2 Klone 3F3+7H11 sowie anti-BDV p40 Klon 5F11 wurden an die Protein G Sepharose gekoppelt. Die Zellextrakte wurden auf die zuvor gewaschenen Antikörper aufgeteilt und das Gemisch zur Bindung der Partner auf dem Drehrad bei 4°C über Nacht belassen. Gewaschen wurden die Sepharose-Immunopräzipitate mit der ^{35}S -Markierung in einem PBS/Triton-Puffer mit einer Salzkonzentration von 0,8M, das ^{32}P -markierte Protein etwas schonender mit Puffer einer 0,5M Salzkonzentration. Aus dem Antigen-Antikörper-Gemisch wurden sample buffer-Extrakte hergestellt und diese auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach Auftrennung der Proteine in der Elektrophorese wurde das Gel entsprechend fixiert, getrocknet und zur Proteindetektion ein Röntgenfilm aufgelegt.

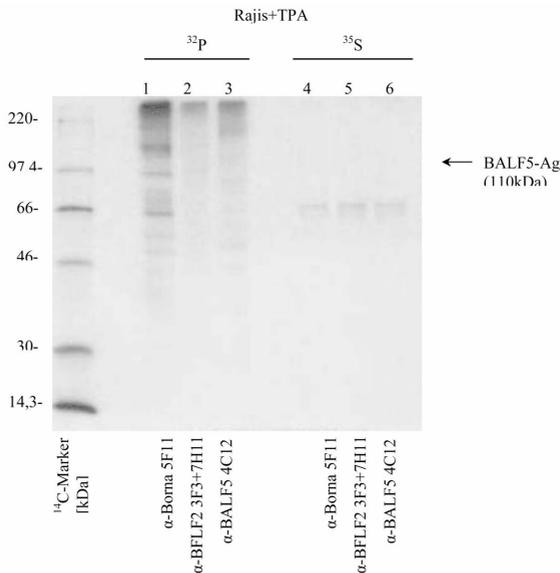


Abb. 30: Nachweis des BALF5-Proteins in der radioaktiv markierten Immunpräzipitation

Wie bei der oben beschriebenen Immunpräzipitation wurden auch hier native Extrakte TPA-induzierter Raji-Zellen hergestellt, die aber zusätzlich mit den radioaktiven Isotopen ^{32}P bzw. ^{35}S markiert wurden. Die zur Erkennung des BALF5-Proteins eingesetzten Antikörper wurden mit den Zellextrakten inkubiert und die anschließend gewonnenen sample buffer-Extrakte auf das SDS-Gel aufgetragen. Zur Detektion des radioaktiven Signals wird ein Röntgenfilm aufgelegt.

Die Antikörper Borna 5F11 und BFLF2 3F3+7H11 dienen als Negativkontrolle.

Auf der Höhe von 110kDa ist eine schwache Bande in der Spur 3 zu erkennen, in der der BALF5-spezifische Antikörper 4C12 zur Erkennung des ³²P-markierten Zellextraktes eingesetzt wurde.

Zur Größenmarkierung diente der ¹⁴C-Proteinmarker, der in der links danebenliegenden Spur befindet und sich wie folgt zusammensetzt: Myosin (220kDa), Phosphorylase b (97,4kDa), Kälberserumalbumin (66kDa), Ovalbumin (46kDa), Carboanhydrase (30kDa) und Lysozym (14,3kDa).

Man kann eine schwache Bande in der Spur 3 des BALF5 4C12-Antikörpers im ³²P-markierten Raji-Zellextrakt bei einem Molekulargewicht von 110kDa erkennen. Im mit ³⁵S markiertem Extrakt ist keine Bande beim entsprechenden Molekulargewicht zu erkennen, was möglicherweise mit den stringenteren Waschbedingungen im Zusammenhang steht. Die übrigen Banden stellen unspezifische Reaktionen mit Proteinen des Zellextraktes dar.

Für die im folgenden beschriebenen Experimente zur Induktion des lytischen Zyklus steht somit auch die Möglichkeit der Immunpräzipitation von radioaktiv-markiertem BALF5-Protein zur Verfügung.

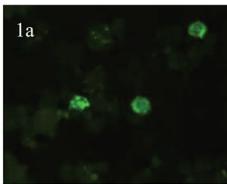
4.2.2.3 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe spezifischer Antikörper kann man durch immunologische Markierung mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern Zellen nachweisen, die entsprechende antigene Proteine enthalten. In diesem Fall soll untersucht werden, ob die gewonnenen Antikörper-Klone spezifisch BALF5-Antigen in Zellen erkennen können und das gebundene Protein sichtbar gemacht werden kann. Wie schon in den vorausgegangenen Versuchen wurden Raji-Suspensionszellen benutzt. Hierbei wurde ein Teil der Zellen im latenten Zustand belassen, in dem die DNA-Polymerase nicht exprimiert wurde, ein anderer Teil der Zellen wurde mit TPA versetzt, um bei diesen eine lytische Replikation und somit die Expression der DNA-Polymerase BALF5 anzuregen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, darin resuspendiert und auf die Objektträger getropft. Nach der Fixierung in Methanol wurden die verschiedenen BALF5-Antikörper 1:10 verdünnt und mit TPA induzierten und nicht-induzierten Zellen (als Negativkontrolle) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschriff mit PBS wurden die Zellen erneut 1 Stunde bei 37°C mit einem mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem anti-Ratte FITC-Antikörper (1:200 verdünnt)

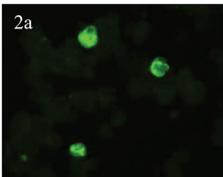
inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Objektträger mit Elvanol beschichtet und Deckgläser aufgelegt. Abschließend wurden die angefertigten Präparate im Fluoreszenzmikroskop (Leica DM IRBIE) betrachtet, mit der Kamera Axio-Cam Color (Zeiss) fotografiert und der Software Axio-Vision 3.0 ausgewertet. Da es sich bei der verwendeten Zelllinie um Suspensionszellen handelt kann man im mikroskopischen Bild keine Aussage über die Verteilung des Proteins in einzelnen Zellkompartimenten treffen. Der Zellkern ist sehr groß im Vergleich zum Zytoplasmaanteil und somit überlagern sich beide Kompartimente großflächig.

TPA-induzierte Raji-Zellen native Raji-Zellen

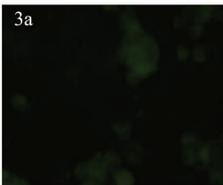
anti-BALF5



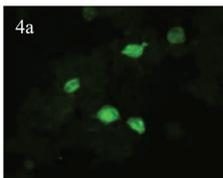
1) 4C12



2) 2D6

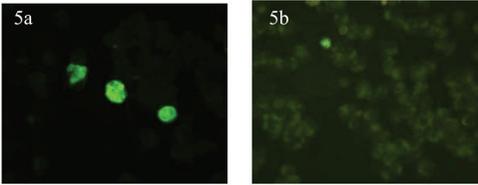


3) 3D12

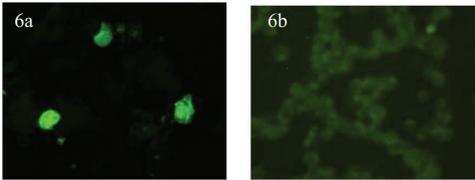


4) 4D10

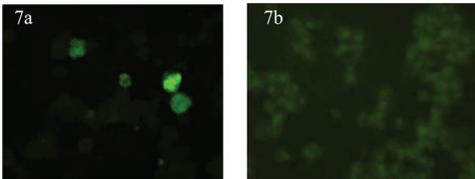




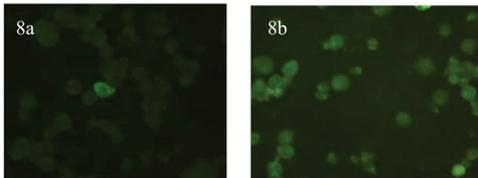
5) 2E10



6) 7E6



7) 6G7



8) 1H3

Abb.31: Überprüfung der BALF5-Antikörper auf ihre spezifische Erkennung des BALF5-Proteins in der Immunfluoreszenz

Auf Methanol-fixiert TPA-induzierte und nicht-induzierte Raji-Zellen wurden die verschiedenen zu testenden BALF5-Antikörper zur Antigenerkennung gegeben und nach einer zweiten Färbung mit dem fluoreszierenden anti-Ratte-FITC-gekoppelten Antikörper im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Antikörper mit einer spezifischen Bindung zeigen Zellen mit einer diffusen in der Zelle verteilten Fluoreszenzfärbung. Eine Unterscheidung zwischen der Färbung von Kern und Zytoplasma kann nicht getroffen werden, da es sich bei den verwendeten Rajis um getrocknete Suspensionszellen handelt, bei denen der große Zellkern das Zytoplasma weitestgehend überlagert.

Eine spezifische Erkennung des BALF5-Proteins in der Immunfluoreszenz zeigen die BALF5-Antikörper 4C12, 2D6, 4D10, 2E10, 7E6 und 6G7.

Die nicht TPA-induzierten Raji-Zellen wurden mit einer längeren Belichtungszeit und einer höheren Signalverstärkung abgebildet.

Die längere Belichtungszeit und die höhere Signalverstärkung bei den nicht TPA-induzierten Raji-Zellen wurde gewählt, um zeigen zu können, dass Zellen im Präparat zu erkennen waren, die allerdings keine Fluoreszenz aufwiesen. Als positive Antikörper stellen sich hier BALF5 4C12, 2D6, 4D10, 2E10, 7E6 und 6G7 heraus, was das oben beschriebene Reaktionsmuster der Immunpräzipitation widerspiegelt.

Somit stehen weitere Werkzeuge zur Verfügung, um die EBV DNA-Polymerase BALF5 sichtbar zu machen.

Die oben beschriebenen Ergebnisse zur Charakterisierung der BALF5-spezifischen monoklonalen Antikörper werden in 4.2.2.4 tabellarisch zusammengefasst.

4.2.2.4 Übersicht zur Charakterisierung der BALF5-Antikörper

Klon	Western Blot	Immunpräzipitation	Immunfluoreszenz
4C12	+	+	+
2D6	-	+	+
3D12	-	-	-
4D10	-	+	+
2E10	-	+	+
7E6	-	+	+
6G7	-	+	+
1H3	-	-	-

Tab. 7: Übersicht der charakterisierten BALF5-Antikörper

Aus den oben beschriebenen Versuchen werden die gewonnenen Charakteristika der getesteten Antikörper tabellarisch zusammengefasst.

+: Der Klon kann in dieser Analyseverfahren das BALF5-Antigen spezifisch erkennen

-: Der Klon kann in dieser Analyseverfahren das BALF5-Antigen nicht spezifisch erkennen

4.3 Aufhebung der Latenz EBV-positiver Zellen durch antisense miRNAs

Wie in der Literatur beschrieben sind miRNAs möglicherweise für die Aufrechterhaltung der Latenz verantwortlich. Beim B95.8-Stamm, in dem der Genomabschnitt deletiert ist, in dem viele der von Grundhoff beschriebenen miRNAs von EBV liegen, befinden sich relativ zu anderen EBV-positiven Zelllinien eine größere Anzahl von Zellen im lytischen Zyklus (Grundhoff, Sullivan, and Ganem, 2006). Im folgenden Experiment wurde versucht, mittels des antisense 2'-O-Methyl-Oligonukleotides der miR-BART2 diese mikroRNA wegzufangen und so den lytischen Zyklus zu induzieren. Dies sollte durch die Steigerung der BALF5-Proteinexpression erreicht werden. Von BALF5 als „early gene“ des lytischen Zyklus wird vermutet, dass das Protein bereits im Frühstadium der lytischen Replikation nachzuweisen ist.

Die 2'-O-Methyloligonukleotide sind in der Literatur als Werkzeug beschrieben, um auf antisense-Basis sequenzspezifisch die miRNPs (miRNA containing ribonucleoprotein complex) zu inaktivieren (Meister et al., 2004a). Es stellte sich heraus, dass nur die Transfektion der 2'-O-Methyl-Oligonukleotiden und nicht die von Deoxyoligonukleotiden die RISC (RNA induced silencing complex) -assoziierte miRNP-Aktivität in Säugerzellen ausreichend hemmt. Die 2'-O-Methyl-Modifizierung wird hierbei zum Schutz der Oligonukleotide vor dem Abbau in Zellextrakten bzw. Zellkulturen genutzt (Lamond and Sproat, 1993; Verma and Eckstein, 1998). Außerdem sind die 2'-O-Methyl-Oligonukleotide für ihre Nuklease-Resistenz und für ihre schnelle und stabile Hybridisierung mit einzelsträngiger RNA bekannt (Cummins et al., 1995; Majlessi, Nelson, and Becker, 1998). Somit steht ein nützlicher Inhibitor der miRNAs zur Verfügung, um deren Funktion zu untersuchen.

Im folgenden Versuch wurden als EBV-positive Zelllinie erneut Raji-Zellen benutzt, von denen ein Teil als Positivkontrolle mit TPA induziert wurde. In die nicht-induzierten Zellen wurden 12µl einer 100µM Lösung des antisense 2'-O-Methyl-Oligonukleotid der miR-BART2 entsprechend den Herstellerangaben von Amaxa™ in die Zellen transfiziert. Alle Zellen wurden nach 24 Stunden in Phosphat-freiem Medium mit ³²P-Isotop radioaktiv markiert und daraus native Zellextrakte gewonnen. Zur Detektion des BALF5-Proteins wurde der Antikörper 4D10 an Protein G-

Sepharose gekoppelt und als Negativkontrolle der GST-Antikörper 6G9. Das weitere Vorgehen entsprach dem bereits beschriebenen Verfahren der radioaktiv-markierten Immunpräzipitation.

Auf dem zunächst auf das getrocknete Gel aufgelegten Röntgenfilm war weder Marker noch Proben zu erkennen (ohne Abbildung). Aus diesem Grund bediente man sich einem sensitiveren Auswertungsverfahren, dem PhosphorImager™SF (Molecular Dynamics) im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie (Herr Dr. Martin Jung).

Hierbei wurde der Versuch zwar auswertbar, allerdings blieb es unklar, ob die Bande in Spur 2 der Abbildung 32 spezifisch für das BALF5-Protein ist, denn sie liegt etwas niedriger als 110kDa. In dieser Spur wurde der als Positivkontrolle dienende Proteinextrakt aus mit TPA-induzierten Raji-Zellen aufgetragen, der mit dem BALF5-Antikörper 4D10 Immunkomplexe ausbildet. In Spur 4 wurde der Extrakt aus den Raji-Zellen aufgetragen, die mit dem antisense miR-BART2 2'O-Methyl-Oligonukleotid transfiziert waren, aber es ist kein Hinweis auf die Ausbildung BALF5-spezifischer Immunpräzipitate mit dem eingesetzten Antikörper zu erkennen. Somit konnte keine gesteigerte BALF5-Expression nachgewiesen werden. Die Spuren 1 und 3 dienen als Negativkontrollen.

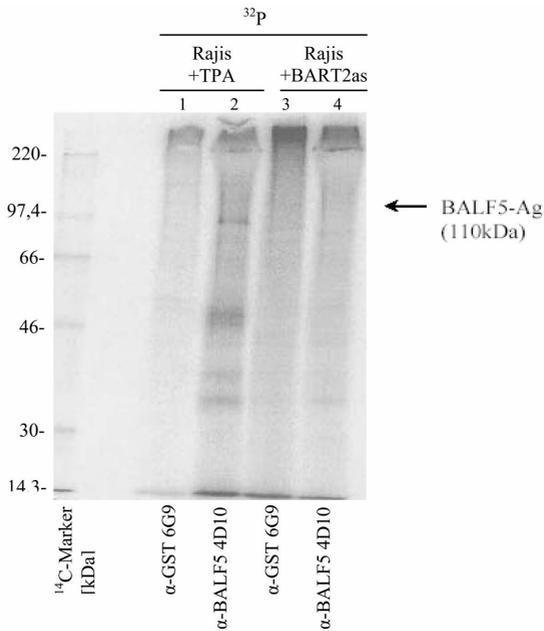


Abb.32: Versuch zur Aufhebung der Latenz EBV-positiver Zellen durch die antisense miRNA BART2

Hierzu wurde in die latente EBV-positive Raji-Zelllinie die antisense miRNA-BART2 elektroporetisch transfiziert, die theoretisch die vorhandene miRNA BART2 blockieren und somit der lytische Zyklus der Raji-Zellen induziert werden soll. Der Nachweis der Induktion des lytischen Zykluses erfolgte indirekt über den Nachweis des BALF5-Proteins als Vertreter der early genes des lytischen Zyklus. In den Spuren 1 und 2 waren TPA-induzierte Raji-Zelllextrakte verwendet worden, wobei die Spur 2 als Positivkontrolle diente. Die Bande die etwa auf der Höhe von 110kDa liegt könnte die spezifische BALF5-Bande sein. Allerdings konnte in der Spur 4 keine Bande dargestellt werden, die als Nachweis einer Induktion des lytischen Zyklus mittels Transfektion der antisense mikroRNA dienen sollte. Wie aus der Abbildung ersichtlich, konnte mittels des monoklonalen Antikörpers BALF5 4D10 keine gesteigerte Produktion des BALF5-Proteins nachgewiesen werden.

Nach den Ergebnissen von Pfeffer et al. aus dem Jahr 2004 wurden in B95.8-Zellen zunächst fünf EBV-kodierte miRNAs identifiziert. Da evtl. nicht nur die BALF5 spezifische miR-BART2 zur Aufrechterhaltung der Latenz dient, sondern die vier anderen mikroRNAs ebenfalls an diesem Prozess beteiligt sind, wurde im folgenden Versuch eine Mischung der antisense 2'-O-Methyloligonukleotide aller fünf bis dahin

beschriebenen miRNAs in die Rajis mittels AmaxaTM transfiziert. Der weitere Ablauf entspricht dem oben beschriebenen.

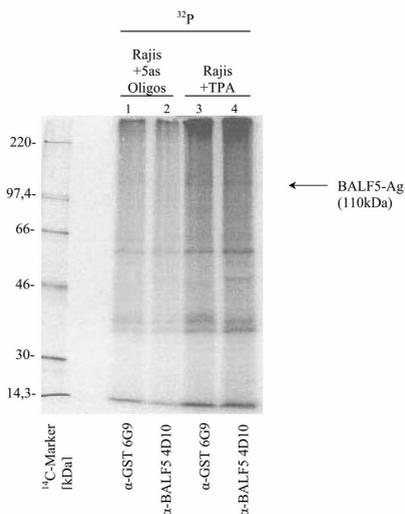


Abb.33: Versuch zur Aufhebung der Latenz EBV-positiver Zelllinien durch antisense-Oligonukleotide der miRNAs BHRF1-1, BHRF1-2, BHRF1-3, BART1 und BART2

Auch hier wurden die verwendeten antisense miRNA-Oligonukleotide durch Elektroporation in die latenten EBV-positiven Raji-Zellen in die Zellen transfiziert. Es sollte auf diese Weise der lytische Zyklus induziert werden und stellvertretend dafür die Menge an BALF5-Protein ansteigen. Das Protein hätte dann durch monoklonale BALF5-Antikörper detektiert werden können zum indirekten Nachweis des lytischen Zyklus. Allerdings gelang wie bereits im oben beschriebenen Versuch der Nachweis des BALF5-Proteins nicht, weshalb man eine Induktion eines lytischen Zyklus mit dieser Methode nicht nachweisen konnte.

In dieser Abbildung ist selbst in der Positivkontrolle (Spur 4, Abb. 33) kaum eine spezifische Bande zu erkennen. Das Experiment müsste, um eine spezifische Proteinsteigerung zeigen zu können, unter veränderten Bedingungen (höhere Proteinkonzentration der Zellextrakte, höhere Radiaktivität) wiederholt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde darauf verzichtet. Es liegt erneut kein Hinweis für die Induktion des lytischen Zyklus vor.

5. Diskussion

Das Epstein Barr Virus ist dafür bekannt, unter bestimmten Bedingungen, wie beispielsweise Immunsuppression, ursächlich für die Bildung einiger lymphoproliferativer Tumorerkrankungen verantwortlich zu sein. Von besonderem Interesse ist hierbei die Entdeckung der EBV-kodierten mikroRNAs, die möglicherweise für die Aufrechterhaltung der Latenz der viralen Infektion verantwortlich sind. Die EBV-kodierte miRNA miR-BART2 ist ein antisense-Transkript der DNA-Polymerase BALF5. Sie ist somit perfekt komplementär zu ihrer vorhergesagten Ziel-mRNA, der BALF5-3'UTR und könnte dadurch den Abbau der mRNA beeinflussen. Dies würde die Expressionsrate des Enzyms reprimieren und eine lytische Virusreplikation erschweren.

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Themenschwerpunkte behandelt: zum Einen die Funktionsanalyse der EBV-kodierten miRNA-BART2 auf molekularer Ebene und zum Anderen die Charakterisierung der neu hergestellten monoklonaler Antikörper gegen das BALF5-Protein. Mit diesen sollte versucht werden, eine Induktion des lytischen Zyklus durch das Abfangen der miR-BART2 nachzuweisen.

Bei der miR-BART2 handelt es sich um eine der fünf von Pfeffer et al. klonierten EBV-kodierten miRNAs. Die Besonderheit dieser miRNA besteht darin, dass sie vollständig komplementär zu ihrer vorhergesagter Ziel-mRNA BALF5 ist. In einem solchen Fall geht man davon aus, dass die mRNA degradiert wird und somit durch die miRNA nicht nur die Proteinmenge verringert wird, sondern auch die mRNA-Menge. Zur Beobachtung der Abnahme der Proteinmenge wurden Luciferase-Assays durchgeführt als indirekter Nachweis der regulatorischen Funktion der miR-BART2.

Um einen Einfluß der miRNA-BART2 auf die virale DNA-Polymerase BALF5 auf Proteinebene untersuchen zu können wurden monoklonale Antikörper hergestellt. BALF5 wird im frühen lytischen Zyklus der EBV-Replikation exprimiert und somit kann indirekt eine lytische Replikation über das Auftreten des BALF5-Proteins nachgewiesen werden. In der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Elisabeth Kremmer, GSF München, wurden Ratten mit einem BALF5-Peptid immunisiert. Die gewonnenen Antikörper wurden uns zur weiteren Charakterisierung zugesandt. Die Antikörper wurden auf ihre Fähigkeit, das BALF5-Protein im Western Blot, in der

Immunpräzipitation und in der Immunfluoreszenz zu erkennen, getestet. Da miRNAs bei der Aufrechterhaltung der Latenz möglicherweise eine Rolle spielen, wurde abschließend versucht, den lytischen Replikationszyklus des Epstein-Barr Virus durch das Abfangen der miRNAs mittels 2'O-Methyl-Oligonukleotiden zu induzieren. Mit dem monoklonalen Antikörper-Klon 4C12 gegen das BALF5-Protein soll die lytische Vermehrung indirekt nachgewiesen werden.

In einem ersten Schritt sollte ein Nachweis des Einflusses der miRNA-BART2 auf die EBV DNA-Polymerase BALF5 auf molekularer Ebene erbracht werden. Hierzu mussten Effektor- und Reporterkonstrukte hergestellt werden. Das Hauptproblem bei dieser Klonierung bestand darin, dass die Effektorstrukturen in Zellkultur die reifen miRNAs exprimieren mussten. Um dies zu erreichen, wurden in ersten Versuchen DNA-Oligonukleotide mit der Sequenz der reifen miRNA in die Vektoren pSUPER und pCEP4 einkloniert. Diese Konstrukte exprimierten allerdings keine reife miRNA. In der Literatur wird beschrieben, dass eine reife und funktionelle miRNA erst dann effektiv durch Drosha prozessiert werden kann, wenn das primary miRNA-Transkript flankierende RNA-Sequenzen trägt (Zeng, Yi, and Cullen, 2005). Aus diesem Grund wurden in den weiteren Klonierungsansätzen die Primerpaare so gewählt, dass ein Insert entstand, welches die entsprechende Vorläufer-miRNA mit 5'- und am 3'-flankierenden Sequenzen beinhaltet. Man erhält so ein Insert, was die etwa 60bp-umfassende Vorläufer-miRNA enthält, sowie an beiden Enden von etwa 90bp-langen Sequenzen umgeben ist. Diese entsprechenden PCR-Amplifikate wurden in den pSG5-Expressionsvektor ligiert, da sich dieser Vektor als geeignet für die geplanten Versuche herausstellte.

Als Nachweis der Expression der reifen miRNAs wurden Northern Blot-Versuche durchgeführt. In den ersten Ansätzen wurde die Sonde zur Erkennung der miRNA lediglich am 3'-Ende mit ³²P markiert, in den späteren Versuchen wurde den Sonden mit Hilfe des *miRVana*TM-Verfahrens am 3'Ende eine längere Sequenz ³²P-markierter UTPs ligiert, was zu einer deutlichen Signalverstärkung führte. Als ein weiterer Vorteil erwies sich die Sichtbarmachung des Signals mittels PhosphorImagerTMSF-Verfahrens (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Homburg) im Gegensatz zur Belichtung eines Röntgenfilms, die z.T. über mehrere Wochen aufliegen mussten, um ein schwaches Signal zu zeigen. Prinzipielle konnten wir in den durchgeführten Experimenten erkennen, dass miRNAs, die in der Zelle stark

exprimiert werden auch von pSG5 stärker exprimiert werden. Vergleicht man die Abbildungen 20 und 21 kann man bei der miR-155 ein sehr starkes Signal erkennen, bei der miR-BART2 nur ein schwaches, was den Ergebnissen von Pfeffer et al. (2004) entspricht. Interpretieren kann man diese schwache miR-BART2-Expression folgendermaßen: diese mikroRNA dient bei der EBV-Replikation als Notbremse, damit keine zu hohe lytische Virusvermehrung stattfindet. Die BALF5-mRNA wird durch die miR-BART2 gespalten, ohne dass die miRNA dadurch selbst zerstört wird. Somit reicht bereits eine geringe Menge an miR-BART2 in der Zelle aus, da diese vielleicht „nur“ eine rein katalytische Wirkung ausübt.

In Abbildung 20 kann in der Spur 2 (EBV-positive BL41-B95.8-Zellen) lediglich die reife miRNA dargestellt werden. Vermutlich liegt die Konzentration an Vorläufer-miRNA in den Zellen deshalb so niedrig, da die pre-miR-BART2 direkt zur reifen miRNA weiterprozessiert wird.

Zur Untersuchung der regulatorischen Funktion der miR-BART2 auf die BALF5-Expression wurden Luciferase-Reporter Assays durchgeführt. Kodiert wird die miRNA-BART2 auf dem Gegenstrang zu BALF5. Die BALF5-3'UTR stellt somit ein 100% komplementäres Target zur miR-BART2 dar, was uns zur Hypothese veranlasst, dass die 3'UTR im pGL3-Vektor gespalten wird und die Aktivität der Luciferase somit um bis zu 100% reduziert wird. Allerdings enthält die BALF5-3'UTR ein kryptisches Polyadenylierungssignal, was dazu führt, dass trotz der Spaltung im 3'UTR-Bereich eine Transkription nicht vollständig verhindert wird. D.h. die Luciferase-Aktivität sinkt zwar deutlich, aber nicht um 100%. In den durchgeführten Experimenten kann nun eine Aktivitätsabnahme um 40% nachgewiesen werden, was die oben aufgestellte Hypothese dennoch deutlich stützt.

Die hier durchgeführten Versuche auf Proteinebene konnten diesen deutlichen Einfluss zwar nicht bestätigen, was vermutlich am Versuchsaufbau lag.

Um überhaupt BALF5-Protein spezifisch in den Folgeversuchen nachweisen zu können, musste zunächst als geeignetes Werkzeug ein BALF5-Protein spezifischer, monoklonaler Antikörper hergestellt werden. Nach zunächst gescheiterten Versuchen durch Herrn Diplom-Biologen Alfredo Mamiani und Frau Petra Goutier (Tierärztin) monoklonale Antikörper gegen BALF5 mittels eines GST-BALF5-Fusionsproteins in Ratten beziehungsweise polyklonale Antikörper in Kaninchen herzustellen, wurde in

diesem Versuchsansatz ein entsprechendes BALF5-Peptid zur Immunisierung von Ratten eingesetzt. In der vorgelegten Arbeit wurden Antikörper charakterisiert, welche nach Immunisierung von Lou/C-Ratten mit einem Peptid-KLH-Konjugat gewonnen wurden. Die im Vortest positiven Klone wurden unserer Arbeitsgruppe zur weiteren Charakterisierung und Verwendung zur Verfügung gestellt.

Als ersten Schritt zur Charakterisierung der erhaltenen Antikörper wurde ein Western Blot durchgeführt. Hierbei wurden die verschiedenen von Frau Dr. Elisabeth Kremmer hergestellten BALF5-Antikörperklone darauf getestet, ob sie gelelektrophoretisch aufgetrenntes BALF5-Protein spezifisch erkennen und im Western Blot anfärben können. Nur in den sich durch die TPA-Induktion im lytischen Zyklus befindenden Raji-Zellen wird ein BALF5-Nachweis erwartet, die anderen Extrakte dienen als Negativkontrollen. Wie aus der Abbildung 28 ersichtlich ist, ist lediglich der BALF5-Antikörper 4C12 in der Lage, in der Western Blot Analyse das BALF5-Protein spezifisch anzufärben und ist somit der erste monoklonale BALF5-Antikörper, der das Protein im Blot erkennt. Dieser kann in den Folgeversuchen dazu dienen, dass durch eine Immunpräzipitation gebunden BALF5-Protein anzufärben. Bislang war in der Literatur nur ein polyklonales Kaninchenserum beschrieben, welches BALF5 nur unspezifisch erkennt (Lin et al., 1991). Der entwickelte monoklonale BALF5 Antikörper ist somit als wertvolles Werkzeug in der weiteren Erforschung des miR-BART2-Einflusses auf das BALF5-Protein anzusehen.

Die Immunpräzipitation stellt nun ein Verfahren dar, mit dem natives BALF5-Protein durch die BALF5-Antikörper-Klone gebunden werden kann und durch eine anschließende Western Blot Analyse sichtbar gemacht werden kann. Hierzu werden aus TPA-induzierten Raji-Zellen native Proteinextrakte hergestellt, die den Vorteil haben, dass die tertiäre Proteinstruktur unverändert vorhanden ist, was eine Antigen-Antikörpererkennung erleichtert. Dadurch wurde erhofft, dass einige der Antikörper, die im Western Blot keine Reaktion gezeigt haben, hier noch einen Proteinnachweis erbringen können.

Die verschiedenen an Protein G-Sepharose gekoppelten Antikörper binden BALF5-Protein, welches mit Hilfe des BALF5-Antikörpers 4C12 angefärbt werden konnte. Aus Abbildung 29 ist zu erkennen, dass mit diesem Vorgehen auch die Antikörper

2D6, 4D10, 2E10, 7E6 und 6G7 das native BALF5-Protein spezifisch erkennen können.

Um den Vorgang weiter zu sensitivieren und damit noch geringere Proteinmengen sichtbar machen zu können, werden in dem folgenden Experiment die verwendeten TPA-induzierten Raji-Zellen mit den radioaktiven Isotopen ^{32}P oder ^{35}S versetzt. Das weitere Vorgehen entspricht grundsätzlich der oben beschriebenen Immunpräzipitation. Ein weiterer Unterschied besteht im Sichtbarmachen des angefärbten Proteins, denn hier wurden direkt vom getrockneten Gel die radioaktiven Signale durch das Auflegen eines geeigneten Röntgenfilms sichtbar gemacht. Allerdings kann mit dieser Methode nur ein sehr schwaches Signal empfangen werden. Es dient kaum zur Unterscheidung von den Negativkontrollen. Eine geeignetere Methode zum Sichtbarmachen der Bande wäre die Auswertung im PhosphorImagerTM SF (Molecular Dynamics), wie sie im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie (Herr Dr. Martin Jung) zur Verfügung steht und in den anschließenden Experimenten genutzt wurde.

Außerdem wurden die mit ^{35}S -markierten Proben vermutlich unter zu stringenten Bedingungen gewaschen, weshalb hier keine Reaktionsbande zu erkennen ist.

Trotz des nur schwachen Signals mit der ^{32}P -markierten Probe wurde der Antikörper für die Anschlussversuche zur Induktion des lytischen Zyklus genutzt.

Ähnlich wie bei der zuvor beschriebenen Immunpräzipitation werden bei den durchgeführten Immunfluoreszenzexperimenten natives BALF5-Protein nachgewiesen. Hierbei ging es um die Fragestellung, ob BALF5-Protein enthaltende Zellen durch die zur Verfügung stehenden BALF5-Antikörper angefärbt und diese durch Markierung mit einem anti-Ratte-FITC-gelabeltem Fluoreszenzfarbstoff im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. Die entsprechenden Bilder sind in Abbildung 31 dargestellt. Ähnlich wie bereits in der Immunpräzipitation sind auch in diesem Nachweisverfahren mit nativem Protein die Antikörper 4C12, 4D10, 2E10, 7E6 und 6G7 positiv. D.h. die beiden komplementären Experimente bestätigen sich gegenseitig.

Diese BALF5-Antikörper können für spätere Experimente eingesetzt werden, in denen beispielsweise eine Unterscheidung von Zellen mit lytischer EBV-Replikation von denjenigen in der latenten Phase befindlichen Zellen unterschieden werden sollen. Allerdings kann keine Aussage über die Proteinverteilung in der Zelle

getroffen werden, denn der Zellkern ist so groß, dass er das Zytoplasma weitestgehend überlagert.

Abschließend wurde im Rahmen dieser Dissertation versucht durch Abfangen der EBV-kodierten mikroRNAs den lytischen Replikationszyklus zu induzieren.

In der Literatur wird spekuliert, dass mikroRNAs vermutlich unter anderem für die Aufrechterhaltung der latenten EBV-Infektion verantwortlich sind. Hinweise dafür liefern Untersuchungen, die gezeigt haben, dass sich beim EBV-positiven B95.8-Zellstamm, bei dem der Genomabschnitt deletiert ist, in dem viele der von Grundhoff beschriebenen miRNAs von EBV liegen, mehr Zellen im Vergleich zu anderen EBV-positiven Zelllinien im lytischen Zyklus befinden (Grundhoff, Sullivan, and Ganem, 2006). Als Hinweis einer Induktion des lytischen Zyklus soll das Protein BALF5 dienen, das als virale DNA-Polymerase zu den „early genes“ des lytischen Zyklus zählt. D.h. es wird vor allem in einem frühen Stadium der lytischen Replikation exprimiert und soll somit zur Repräsentation des Übergangs von der Latenz zur lytischen Replikation der EBV-Infektion genutzt werden.

Im ersten Versuch wurde hierzu lediglich das entsprechende antisense miR-BART2-2'O-Methyl-Oligonukleotid eingesetzt. Raji-Zellen wurden durch ein Elektroporationsverfahren mit dem beschriebenen Oligonukleotid transfiziert, die Zellen radioaktiv mit ³²P markiert. Aus den Zellen wurden native Extrakte gewonnen und eine Immunpräzipitation mit dem BALF5-Antikörper 4D10 durchgeführt.

In der Auswertung im PhosphorImager™ SF kann allerdings keine Bande bei einem Molekulargewicht von 110kDa identifiziert werden, die auf eine Induktion der BALF5-Expression hinweisen würde.

Deshalb wurden im nächsten Versuch die antisense 2'O-Methyl-Oligonukleotide gegen die fünf von Pfeffer et al. 2004 klonierten miRNAs eingesetzt. Aber auch in diesem Fall ist keine gesteigerte BALF5-Expression nachzuweisen, wie aus Abbildung 33 zu erkennen ist.

Aus neueren Studien von Grundhoff geht hervor, dass weitere EBV-kodierte miRNAs existieren, die in der Deletionsstelle des von Pfeffer verwendeten B95.8-Stammes liegen und von ihm 2004 nicht kloniert wurden (Grundhoff, Sullivan, and Ganem, 2006). So wäre eine mögliche Erklärung für die oben beschriebenen Ergebnisse, dass auch die weiteren existierenden miRNAs abgefangen werden müssen. Es existieren Hinweise darauf, dass die Funktion der hier abgefangenen miRNAs durch andere miRNAs ersetzt werden kann.

Eine methodische Ursache für den fehlgeschlagenen BALF5-Nachweis kann darin liegen, dass die Zellextrakte bereits in einem Stadium gewonnen wurden, in dem die BALF5-Expression noch so gering war, dass sie mit der oben beschriebenen Methode noch nicht nachzuweisen war. Bereits der oben beschriebene Versuch mit radioaktiv markierten TPA-induzierten Raji-Zellen liefert nur ein schwaches Signal trotz relativ hoher Proteinmenge. Hier wird vermutlich nur ganz wenig BALF5-Protein exprimiert und ist mit der hier angewandten Methode nicht mehr zu detektieren. Das schwache Signal könnte auch an der relativ schlechten Transfektionseffizienz liegen.

In weiterführenden Arbeiten, die in erster Linie von Fr. Dr. Stephanie Barth aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden konnte in einem ersten Experiment nachgewiesen, dass die Menge an BART2-miRNA durch die Induktion des lytischen Zyklus in B95-8 Kieff-Zellen (Typ 1 EBV-infiziert) bzw. in Jijoye-Zellen (Typ2 EBV-infiziert) mit TPA reduziert werden kann.

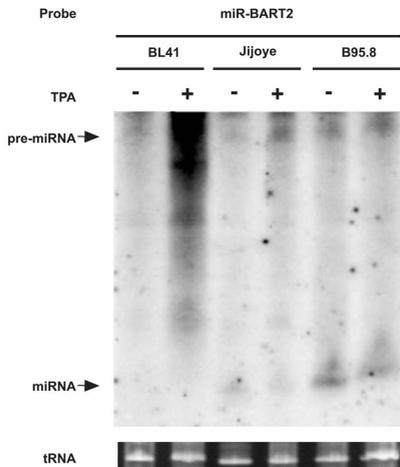


Abb. 34: Verringerung des miR-BART2-Levels während der lytischen Replikation

Gesamt-RNA von EBV neg. BL41-Zellen, von EBV pos. Jijoye-Zellen und ebenfalls EBV pos. B95.8-Zellen, in Latenz (TPA-) oder in Lyse (TPA+) wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und in der Northern Blot Analyse einer miR-BART2-spezifischen Sonde ausgesetzt. Die Mengen an reifer miRNA wurden im Phosphormager-Verfahren quantifiziert.

Es ist eine deutliche Abnahme der miRNA-Menge nach Induktion des lytischen Zyklus zu erkennen.

(Barth et al., 2007)

Des weiteren konnte in EBV-positiven 293-Zellen gezeigt werden, dass durch die miRNA BART2 die Proteinmenge an BALF5 um 30-40% reduziert wird, was sich mit dem Ergebnis aus dem oben beschriebenen Luciferase-Experiment deckt. Hierzu wurden 293 EBV-Zellen mit dem immediate early-Protein BZLF1 (p509) induziert und entweder mit dem pSG5-Vektor (control) transfiziert oder mit dem Effektorkonstrukt pSG5-BART2 (BART2). In letzterem Fall ist eine Reduktion des Proteins zu erkennen. Der Proteinnachweis wird mit dem zuvor hergestellten monoklonalen BALF5-Antikörper 4C12 durchgeführt.

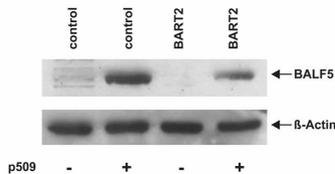


Abb. 35: MiR-BART2 verringert die Menge an BALF5-Polymerase

EBV-infizierte 293-Zellen wurden mit dem BZLF1-Expressionsvektor p509 wie dargestellt in Kombination mit dem miR-BART2-Expressionsvektor co-transfiziert. Das BALF5-Protein wurde mit dem 4C12-Antikörper angefärbt, β -Actin dient als Ladekontrolle. Es ist zu erkennen, dass durch eine Co-Transfektion mit dem miR-BART2-Expressionsvektor die Menge an BALF5-Protein deutlich verringert wurde.

(Barth et al., 2007)

In den von mir durchgeführten Experimenten mit Raji-Zellen konnten der umgekehrte Nachweise nicht erbracht werden. Raji-Zellen als Suspensionszellen lassen sich grundsätzlich schlechter transfizieren als die adhären wachsenden 293 EBV-Zellen. Somit konnte nur ein kleiner Teil der Zellen überhaupt transfiziert werden, das heißt selbst wenn durch eine Transfektion mit den antisense 2'O-Methyl-Oligonukleotiden ein lytischer Zyklus induziert wurde war die Menge an gebildetem BALF5 zu gering für unsere Nachweismethode. Durch die Wahl einer geeigneteren Zelllinie konnte dieses Problem gelöst werden.

Grundsätzlich liefern die computergestützten Vorhersagen von Ziel-mRNAs für bestimmte miRNAs immer nur Hinweise für eine mögliche regulatorische Beeinflussung. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Gunter Meister (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) wurde ein „Cleavage“-Assay durchgeführt, durch den die Spaltung der BALF5-mRNA durch die miR-BART2 zwischen den Nucleotiden 10 und 11 nachgewiesen wurde. In diesem Versuch wurden die Mengen an gespaltener mRNA durch eine Immunpräzipitation mit anti-Ago2-Protein erbracht. Konnte Ago2 präzipitiert werden, diente dies als Nachweis der gespaltenen BALF5-mRNA durch die miR-BART2. Es wurden BL41-B95.8 Zellen verwendet, die in latenter Zustand untersucht wurden bzw. mit TPA zur Lyse induziert wurden. Weist man die entstandene Menge an gespaltener BALF5 mRNA-Menge nach, fällt auf, dass durch die Induktion weniger mRNA gespalten wurde, denn nach Induktion ist weniger miRNA-BART2 zur Spaltung in den Zellen vorhanden.

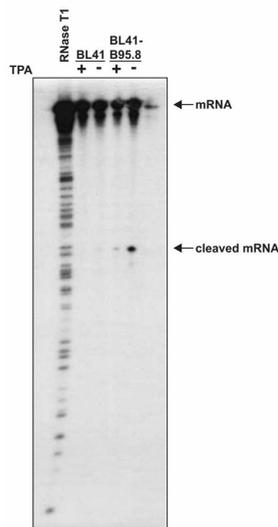


Abb. 36: MiR-BART2 führt zur Spaltung der BALF5-mRNA

Es wurden Zytoplasmaextrakte von TPA-induzierten BL41-Zellen (EBV neg.) und BL41-B95.8-Zellen (EBV pos.) mit Ago2 immunpräzipitiert. Als ³²P-markierte Sonde wurde ein Abschnitt der BALF5 3'UTR gewählt, der die miR-BART2 Erkennungssequenz enthält. Nach einer Induktion des lytischen Zyklus wurde die Spaltungsaktivität der miRNA deutlich verringert und es war keine gespaltene BALF5-mRNA mehr nachweisbar.

Als Größenmarker wurde ein Verdau mit RNase T1 aufgetragen.
(Barth et al., 2007)

Dies bestätigt sowohl die computergestützte Vorhersage als auch die Beobachtung von Furnari et al. aus dem Jahre 1992. Damals fielen in Northern Blot Analysen zwei unterschiedlich große BALF5-Transkripte auf. Zum Einen ein 5,08kb großes Fragment in EBV negativen Zellstämmen und zum Anderen ein 3,7kb großes Transkript in dem EBV-positiven B95.8-Zellstamm. Damals wurde ein viral-kodierter Faktor für das Auftreten der unterschiedlichen Transkripte verantwortlich gemacht. Dieser Faktor ist nach den unseren Erkenntnissen vermutlich die EBV-kodierte miR-BART2.

Ein weiteres durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführtes Experiment beschreibt den Einfluß der miR-BART2 auf die Viruslast im Zellüberstand von 293 EBV-Zellen. Wurden diese Zellen mit BZLF1 (p509) induziert und entweder mit dem pSG5-Vektor allein oder den miR-Konstrukten pSG5-BART2 oder pSG5-miR155 transfiziert, war deutlich zu sehen, dass im Fall der Überexpression der miR-BART2 die Viruslast um 20% in den Zellen reduziert wurde. Die lytische Vermehrung des EBV war durch das Abfangen von BALF5-Protein durch die mikroRNA verringert worden.

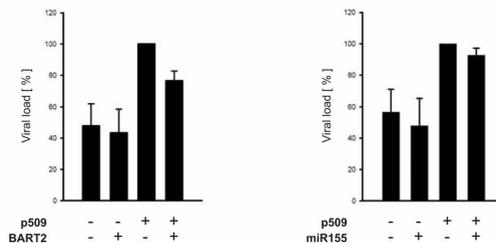


Abb. 37: MiR-BART2 unterdrückt Virusproduktion

EBV-infizierte 293-Zellen wurden in verschiedenen Kombinationen mit dem Kontrollvektor (-), mit dem BZLF1-Expressionsvektor p509 und mit dem miR-BART2-Expressionsvektor wie dargestellt transfiziert. *Rechts* ist das entsprechende Kontrollexperiment mit dem miR155-Expressionsvektor dargestellt.

Die Menge an freigesetztem Virus im Zellüberstand wurde mittels real-time PCR bestimmt. Der Wert der für die BZLF1-induzierten Zellen ermittelt wurde wurde auf 100% gesetzt. Es werden die Mittelwerte von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt.

Wurden die Zellen mit dem miR-BART2-Expressionsvektor transfiziert ist eine klare Abnahme der Viruslast zu erkennen, besonders deutlich ist der Unterschied nach Induktion des lytischen Zyklus.

(Barth et al, 2007)

Die BART2 mRNA ist vermutlich die letzte „Bremse“, um den Übergang in den lytischen Zyklus zu verhindern. Die Experimente mit den antisense-mRNAs zur Induktion des lytischen Zyklus können vermutlich nur dann funktionieren, wenn wirklich alle miRNAs blockiert werden. Die miRNAs verhindern möglicherweise den Übergang von der latenten Infektion (ohne Virusvermehrung) in die lytische Phase. Die miR-BART2 dient somit womöglich dazu, dass eine zu starke Virusvermehrung verhindert wird, um das Überleben der EBV-positiven Zellen zu gewährleisten. Das Virus überlebt so weitestgehend versteckt von der körpereigenen Abwehr.

Ein weiterer Beleg für regulatorische Einflüsse der miR-BART2 auf die Virusvermehrung liefert das folgende Experiment. Es wurden wieder mit BZLF1 induzierte und nicht-induzierte 293 EBV-Zellen verglichen, wobei ein Teil der Zellen mit dem pGL3-Vektor transfiziert wurde, der andere Teil mit dem pGL3-BALF5 3'UTR-Reporterkonstrukt. In den mit dem pGL3-Vektor transfizierten Zellen kann durch die Induktion der Lyse und somit der verringerten miR-BART2 Menge bereits eine Verdreifachung der Luciferaseaktivität beobachtet werden, betrachtet man die mit dem pGL3-BALF5 3'UTR-Konstrukt transfizierten Zellen wird sogar eine fast zehnfache Erhöhung der Luciferaseaktivität nachgewiesen.

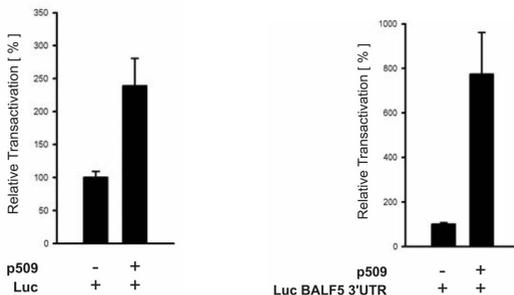


Abb. 38: Induktion des lytischen Zyklus hemmt Herrabregulation der BALF5-3'UTR

Links wird die Stimulation des leeren Luciferase-Expressionsvektors durch die Induktion des lytischen Zyklus der EBV-infizierten 293-Zellen durch p509 dargestellt. *Rechts* die Stimulation

des pGL3-BALF5-3'UTR-Reportervektors während der Induktion. Der Wert der Reporterkonstrukte allein wurde jeweils auf 100% gesetzt. Es werden die Mittelwerte aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je doppeltem Ansatz dargestellt.

Wurde der lytische Zyklus induziert, d.h. die Menge an miR-BART2 reduziert, kam es zu einer Aufhebung der Herabregulierung der BALF5-Polymerase.

(Barth et al., 2007)

Parallel zu den grundlegenden prä-klinischen miRNA-Studien sind bereits einige klinische Studien veröffentlicht. Hierbei werden vor allem neue Formen der Krebstherapie diskutiert, da eine veränderte miRNA-Expression mit dem Auftreten von verschiedenen Tumorformen in Zusammenhang gebracht werden (Zhang et al., 2006).

Von großem Interesse in der Öffentlichkeit war ebenso die Studie von Krutzfeld et al. aus dem Jahr 2005 in der eine Therapiemöglichkeit adipöser Mäuse untersucht wurde. Es wurde ein Zusammenhang der miR-122 mit dem Lipidmetabolismus festgestellt und durch ein Hemmen dieser miRNA durch ein entsprechendes antisense-Konstrukt (Antagomir) konnte der Cholesterolspiegel der Versuchsmäuse nachweislich gesenkt werden.

Im Fall der durch EBV-induzierten tumorösen Erkrankungen wäre es von Interesse, ob durch ein Abfangen der miRNA-BART2 der lytische Zyklus der Virusreplikation ausgelöst werden könnte, denn in diesem Stadium der Virusvermehrung kann die körpereigene T-Zell-Abwehr den Erreger erkennen und möglicherweise aus dem Organismus eliminieren. Dies könnte als neuer Ansatz in der Tumorthherapie genutzt werden.

6. Zusammenfassung

Aus Studien der Gruppe um Tuschl wurden im Jahre 2004 fünf EBV-kodierte mikroRNAs nachgewiesen. In computergestützten Verfahren wurden entsprechende Ziel-mRNAs vorhergesagt. In der vorliegenden Arbeit wird der funktionelle Einfluß der miRNA BART2 auf ihre Ziel mRNA BALF5 (virale DNA-Polymerase) untersucht. Diese ist vollständig komplementär zur miRNA, was darauf schließen lässt, dass durch die miRNA-BART2 eine Spaltung der BALF5 mRNA hervorgerufen wird. Zunächst soll eine Verringerung der Proteinmenge nachgewiesen werden. Hierzu wurden zunächst entsprechende Reporter- (pGL3-BALF5) und Effektorstrukture (pSG5-BART2) hergestellt für Luciferase-Reporter-Assays. Diese Konstrukte konnten einen Nachweis zur Herabregulierung der Proteinmenge um etwa 44% erbringen.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Gewinnung und Charakterisierung monoklonaler BALF5-Antikörper. Die DNA-Polymerase von EBV ist Ziel der miR-BART2 und somit ist es wichtig, auch auf Proteinebene einen Einfluß der miRNA nachzuweisen. Nach Immunisierung von Ratten durch Frau Dr. Kremmer mit einem BALF5-Peptid konnten verschiedene Antikörper-Klone charakterisiert werden. Vor allem der Klon 4C12 eignet sich sehr gut für weitere Versuche, denn er zeigt neben einer spezifischen Antigen-Antikörperreaktion in der Immunpräzipitation und der Immunfluoreszenz wie die Antikörper 2D6, 4D10, 2E10, 7E6 und 6G7 auch eine spezifische Erkennung des BALF5-Proteins in der Western Blot-Analyse.

Abschließend wurde mit den erhaltenen BALF5-Antikörpern versucht, einen indirekten Nachweis der Induktion des lytischen Zyklusses zu erbringen, der durch das Abfangen von miRNAs ausgelöst werden sollte. Allerdings war es mit den hier verwendeten Methoden nicht möglich, eine lytische Replikation von EBV auszulösen, welche indirekt über das Auftreten des early genes des lytischen Zyklusses, BALF5, nachzuweisen ist. Dies wäre von Interesse im Hinblick auf neue Ansätze in der Therapie der von latenten EBV-ausgelösten lymphoproliferativen Erkrankungen.

Resume

In the year 2004, Pfeffer et al. could proof the existence of EBV encoded miRNAs with their bioinformatically determined target mRNAs.

In this thesis the functional influence of the EBV-encoded miR-BART2 on its target BALF5, the viral DNA polymerase, was investigated. Particularly the complete complementarity of this pair is of special interest because of a possible cleavage of the mRNA by the miRNA.

First, the down-regulation of the BALF5 protein level was indirectly shown by luciferase experiments. Therefor the pSG5-BART2 effector-construct and the pGL3-BALF5 3'UTR reporter-construct were produced. In this assay a down regulation of the BALF5 mRNA level by the miRNA-BART2 of about 44% could be shown.

After having seen an influence on the molecular level, the second part of this thesis deals with the production and the testing of monoclonal BALF5 antibodies. They were produced to test the influence of the miR-BART2 on the BALF5-protein level *in vivo*. Rats were immunized against a BALF5 peptide by Elisabeth Kremmer, MD, GSF Munich. Eight different antibodies were characterized in Western blot, immuno precipitation, and immuno fluorescence experiments, whereas the antibody 4C12 is the most promising showing a specific antigene detection in the Western blot analysis as well as in the other assays. In the immuno precipitation and the immuno fluorescence experiments, where native BALF5 protein was used, the antibodies 2D6, 4D10, 2E10, 7E6, and 6G7 showed a specific antigene-antibody reaction.

Finally, an induction of the lytic cycle by the transfection of Raji-cells with antisense miRNAs was unsuccessfully tried to be shown with the applied methods. BALF5 as an early gene in the lytic replication, was hoped to be detected as an indirect proof of the induction of th lysis. It was of special interest for new therapeutical methods in cancer treatment. The idea behind was, that as soon as you could push a persitent to become a lytic infection the host's immuno system could eliminate the virus out of the body.

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.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., and Tuschl, T. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *Rna* **9**(3), 277-9.
- 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.
- Arrand, J. R., Rymo, L., Walsh, J. E., Bjorck, E., Lindahl, T., and Griffin, B. E. (1981). Molecular cloning of the complete Epstein-Barr virus genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments. *Nucleic Acids Res* **9**(13), 2999-3014.
- 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.
- Babcock, G. J., Hochberg, D., and Thorley-Lawson, A. D. (2000). The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* **13**(4), 497-506.
- Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (2000). Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein-Barr virus, express the restricted pattern of latent genes previously found only in Epstein-Barr virus-associated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22), 12250-5.
- 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.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**(2), 281-97.

- Barth, S., Pfuhl, T., Mamiani, A., Ehses, C., Roemer, K., Kremmer, E., Jäker, C., Höck, J., Meister, G., and Graesser, F. (2007). EBV miR-Bart2 regulates DNA polymerase BALF5. *Zur Veröffentlichung eingereicht*.
- 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.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**(6818), 363-6.
- Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V., and Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* **35**(3), 215-7.
- 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. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., and Boyer, H. W. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**(2), 95-113.
- Borchert, G. M., Lanier, W., and Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **13**(12), 1097-101.
- Brooks, L. A., Lear, A. L., Young, L. S., and Rickinson, A. B. (1993). Transcripts from the Epstein-Barr virus BamHI A fragment are detectable in all three forms of virus latency. *J Virol* **67**(6), 3182-90.

- Buell, P. (1974). The effect of migration on the risk of nasopharyngeal cancer among Chinese. *Cancer Res* **34**(5), 1189-91.
- Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* **46**(197), 218-23.
- Burkitt, D. (1962). A children's cancer dependent on climatic factors. *Nature* **194**, 232-4.
- 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., Hagedorn, C. H., and Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* **10**(12), 1957-66.
- 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.
- 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.
- Chaconas, G., and van de Sande, J. H. (1980). 5'-32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol* **65**(1), 75-85.
- 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.
- Chevallier-Greco, A., Gruffat, H., Manet, E., Calender, A., and Sergeant, A. (1989). The Epstein-Barr virus (EBV) DR enhancer contains two functionally different domains: domain A is constitutive and cell specific, domain B is transactivated by the EBV early protein R. *J Virol* **63**(2), 615-23.
- Chevallier-Greco, A., Manet, E., Chavrier, P., Mosnier, C., Daillie, J., and Sergeant, A. (1986). Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *Embo J* **5**(12), 3243-9.
- Clifford, P. (1970). A review on the epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* **5**(3), 287-309.

- Coffey, A. J., Brooksbank, R. A., Brandau, O., Oohashi, T., Howell, G. R., Bye, J. M., Cahn, A. P., Durham, J., Heath, P., Wray, P., Pavitt, R., Wilkinson, J., Leversha, M., Huckle, E., Shaw-Smith, C. J., Dunham, A., Rhodes, S., Schuster, V., Porta, G., Yin, L., Serafini, P., Sylla, B., Zollo, M., Franco, B., Bolino, A., Seri, M., Lanyi, A., Davis, J. R., Webster, D., Harris, A., Lenoir, G., de St Basile, G., Jones, A., Behloradsky, B. H., Achatz, H., Murken, J., Fassler, R., Sumegi, J., Romeo, G., Vaudin, M., Ross, M. T., Meindl, A., and Bentley, D. R. (1998). Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet* **20**(2), 129-35.
- Cohen, J. I., Wang, F., and Kieff, E. (1991). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 mutations define essential domains for transformation and transactivation. *J Virol* **65**(5), 2545-54.
- Cook, H. A., Koppetsch, B. S., Wu, J., and Theurkauf, W. E. (2004). The Drosophila SDE3 homolog armitage is required for oskar mRNA silencing and embryonic axis specification. *Cell* **116**(6), 817-29.
- Countryman, J., and Miller, G. (1985). Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(12), 4085-9.
- Croce, C. M., and Nowell, P. C. (1985). Molecular basis of human B cell neoplasia. *Blood* **65**(1), 1-7.
- Cullen, B. R. (2006). Viruses and microRNAs. *Nat Genet* **38 Suppl**, S25-30.
- Cummins, L. L., Owens, S. R., Risen, L. M., Lesnik, E. A., Freier, S. M., McGee, D., Guinasso, C. J., and Cook, P. D. (1995). Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity. *Nucleic Acids Res* **23**(11), 2019-24.
- 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.
- 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.
- Dugaiczyk, A., Boyer, H. W., and Goodman, H. M. (1975). Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* **96**(1), 171-84.

- 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.
- Epstein, M. A., Morgan, A. J., Finerty, S., Randle, B. J., and Kirkwood, J. K. (1985). Protection of cottontop tamarins against Epstein-Barr virus-induced malignant lymphoma by a prototype subunit vaccine. *Nature* **318**(6043), 287-9.
- Evans, A. S. (1982). The clinical illness promotion factor: a third ingredient. *Yale J Biol Med* **55**(3-4), 193-9.
- 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., Emberg, 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.
- Farrell, P. J., Rowe, D. T., Rooney, C. M., and Kouzarides, T. (1989). Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *Embo J* **8**(1), 127-32.
- 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 cooperative functions of two transactivators. *Embo J* **19**(12), 3080-9.
- Fingeroth, J. D., Weis, J. J., Tedder, T. F., Strominger, J. L., Biro, P. A., and Fearon, D. T. (1984). Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(14), 4510-4.
- Furnari, F. B., Adams, M. D., and Pagano, J. S. (1992). Regulation of the Epstein-Barr virus DNA polymerase gene. *J Virol* **66**(5), 2837-45.

- 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.
- Geser, A., Lenoir, G. M., Anvret, M., Bornkamm, G., Klein, G., Williams, E. H., Wright, D. H., and De-The, G. (1983). Epstein-Barr virus markers in a series of Burkitt's lymphomas from the West Nile District, Uganda. *Eur J Cancer Clin Oncol* **19**(10), 1393-404.
- Gilligan, K., Sato, H., Rajadurai, P., Busson, P., Young, L., Rickinson, A., Tursz, T., and Raab-Traub, N. (1990). Novel transcription from the Epstein-Barr virus terminal EcoRI fragment, DJJhet, in a nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* **64**(10), 4948-56.
- 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.
- Grasser, F. A., Murray, P. G., Kremmer, E., Klein, K., Remberger, K., Feiden, W., Reynolds, G., Niedobitek, G., Young, L. S., and Mueller-Lantzsch, N. (1994). Monoclonal antibodies directed against the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 (EBNA1): immunohistologic detection of EBNA1 in the malignant cells of Hodgkin's disease. *Blood* **84**(11), 3792-8.
- 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.
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**(1), 23-34.
- 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.
- Gutierrez, M. I., Bhatia, K., Barriga, F., Diez, B., Muriel, F. S., de Andreas, M. L., Epelman, S., Risueno, C., and Magrath, I. T. (1992). Molecular epidemiology of Burkitt's lymphoma from South America: differences in breakpoint location and Epstein-Barr virus association from tumors in other world regions. *Blood* **79**(12), 3261-6.
- Hadar, T., Rahima, M., Kahan, E., Sidi, J., Rakowsky, E., Sarov, B., and Sarov, I. (1986). Significance of specific Epstein-Barr virus IgA and elevated IgG antibodies to viral capsid antigens in nasopharyngeal carcinoma patients. *J Med Virol* **20**(4), 329-39.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1988). Identification and characterization of oriLyf, 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.
- Hanto, D. W., Frizzera, G., Purtilo, D. T., Sakamoto, K., Sullivan, J. L., Saemundsen, A. K., Klein, G., Simmons, R. L., and Najarian, J. S. (1981). Clinical spectrum of lymphoproliferative disorders in renal transplant recipients and evidence for the role of Epstein-Barr virus. *Cancer Res* **41**(11 Pt 1), 4253-61.
- Hayward, S. D., and Kieff, E. (1977). DNA of Epstein-Barr virus. II. Comparison of the molecular weights of restriction endonuclease fragments of the DNA of Epstein-Barr virus strains and identification of end fragments of the B95-8 strain. *J Virol* **23**(2), 421-9.
- 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**, 1987-1991.

- Henderson, B. E., Louie, E., SooHoo Jing, J., Buell, P., and Gardner, M. B. (1976). Risk factors associated with nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med* **295**(20), 1101-6.
- Henle, G., Henle, W., Clifford, P., Diehl, V., Kafuko, G. W., Kirya, B. G., Klein, G., Morrow, R. H., Munube, G. M., Pike, P., Tukei, P. M., and Ziegler, J. L. (1969). Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J Natl Cancer Inst* **43**(5), 1147-57.
- 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.
- Henle, W., and Henle, G. (1976). The sero-epidemiology of Epstein-Barr virus. *Adv Pathobiol*(5), 5-17.
- Herbst, H., Dallenbach, F., Niedobitek, G., Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Finn, T., Jautzke, G., Muller-Lantzsch, N., and Stein, H. (1991). [Expression of latent membrane proteins (LMP) of Epstein-Barr virus in malignant lymphomas]. *Verh Dtsch Ges Pathol* **75**, 175-8.
- Hirayama, T., and Ito, Y. (1981). A new view of the etiology of nasopharyngeal carcinoma. *Prev Med* **10**(5), 614-22.
- 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.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**(5531), 834-8.
- Hutvagner, G., and Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**(5589), 2056-60.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**(1), 163-8.
- Jones, J. F., Shurin, S., Abramowsky, C., Tubbs, R. R., Sciotto, C. G., Wahl, R., Sands, J., Gottman, D., Katz, B. Z., and Sklar, J. (1988). T-cell lymphomas containing Epstein-

- Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* **318**(12), 733-41.
- 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.
- Kalter, S. P., Riggs, S. A., Cabanillas, F., Butler, J. J., Hagemester, F. B., Mansell, P. W., Newell, G. R., Velasquez, W. S., Salvador, P., Barlogie, B., and et al. (1985). Aggressive non-Hodgkin's lymphomas in immunocompromised homosexual males. *Blood* **66**(3), 655-9.
- Kaye, K. M., Izumi, K. M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(19), 9150-4.
- Kieff, E. (1996). Epstein-Barr Virus and its replication. In "Fields Virology" (B. Fields, D. Knipe, and P. Howley, Eds.), Vol. 2, pp. 2343-2396. 2 vols. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Kieff, E., Liebowitz, D. (1990). Epstein-Barr virus and its replication. In "Fields Virology" (B. Fields, D. Knipe, and P. Howley, Eds.), Vol. 2, pp. 1889-1920. 2 vols. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Kikuta, H., Taguchi, Y., Tomizawa, K., Kojima, K., Kawamura, N., Ishizaka, A., Sakiyama, Y., Matsumoto, S., Imai, S., Kinoshita, T., and et al. (1988). Epstein-Barr virus genome-positive T lymphocytes in a boy with chronic active EBV infection associated with Kawasaki-like disease. *Nature* **333**(6172), 455-7.
- Kintner, C. R., and Sugden, B. (1979). The structure of the termini of the DNA of Epstein-Barr virus. *Cell* **17**(3), 661-71.
- Knecht, H., Odermatt, B. F., Bachmann, E., Teixeira, S., Sahli, R., Hayoz, D., Heitz, P., and Bachmann, F. (1991). Frequent detection of Epstein-Barr virus DNA by the polymerase chain reaction in lymph node biopsies from patients with Hodgkin's disease without genomic evidence of B- or T-cell clonality. *Blood* **78**(3), 760-7.
- Kremmer, E., Kranz, B. R., Hille, A., Klein, K., Eulitz, M., Hoffmann-Fezer, G., Feiden, W., Herrmann, K., Delecluse, H. J., Delsol, G., Bornkamm, G. W., Mueller-Lantzsch, N., and Grassert, F. A. (1995). Rat monoclonal antibodies differentiating between the Epstein-Barr virus nuclear antigens 2A (EBNA2A) and 2B (EBNA2B). *Virology* **208**(1), 336-42.

- Krutzfeld, 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**, 685-689.
- 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., Tomancak, P., Williams, R. W., and Rubin, G. M. (2003). Computational identification of Drosophila microRNA genes. *Genome Biol* **4**(7), R42.
- Lamond, A. I., and Sproat, B. S. (1993). Antisense oligonucleotides made of 2'-O-alkylRNA: their properties and applications in RNA biochemistry. *FEBS Lett* **325**(1-2), 123-7.
- 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.
- Lecellier, C. H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, C., Saib, A., and Voinnet, O. (2005). A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* **308**(5721), 557-60.
- Lederberg, E. M., and Cohen, S. N. (1974). Transformation of Salmonella typhimurium by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **119**(3), 1072-4.
- 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. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E. J., and Carthew, R. W. (2004). Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* **117**(1), 69-81.
- 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, J. C., Sista, N. D., Besencon, F., Kamine, J., and Pagano, J. S. (1991). Identification and functional characterization of Epstein-Barr virus DNA polymerase by in vitro transcription-translation of a cloned gene. *J Virol* **65**(5), 2728-31.
- Lin, S. Y., Johnson, S. M., Abraham, M., Vella, M. C., Pasquinelli, A., Gamberi, C., Gottlieb, E., and Slack, F. J. (2003). The *C. elegans* hunchback homolog, hbl-1, controls temporal patterning and is a probable microRNA target. *Dev Cell* **4**(5), 639-50.
- 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.
- Lindahl, T., Klein, G., Reedman, B. M., Johansson, B., and Singh, S. (1974). Relationship between Epstein-Barr virus (EBV) DNA and the EBV-determined nuclear antigen (EBNA) in Burkitt lymphoma biopsies and other lymphoproliferative malignancies. *Int J Cancer* **13**(6), 764-72.
- 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.
- 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.
- Majlessi, M., Nelson, N. C., and Becker, M. M. (1998). Advantages of 2'-O-methyl oligoribonucleotide probes for detecting RNA targets. *Nucleic Acids Res* **26**(9), 2224-9.
- Maniatis, T., Sambrook, J., and Fritsch, E.F. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, Laboratory Press 1-3 2nd ed.*
- Manolov, G., and Manolova, Y. (1972). Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphomas. *Nature* **237**(5349), 33-4.
- McGeoch, D. J., Rixon, F. J., and Davison, A. J. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* **117**(1), 90-104.
- Meister, G., Landthaler, M., Dorsett, Y., and Tuschl, T. (2004a). Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *Rna* **10**(3), 544-50.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004b). 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.
- Miller, G., and Lipman, M. (1973). Comparison of the yield of infectious virus from clones of human and simian lymphoblastoid lines transformed by Epstein-Barr virus. *J Exp Med* **138**(6), 1398-412.
- Minarovits, J., Hu, L. F., Imai, S., Harabuchi, Y., Kataura, A., Minarovits-Kormuta, S., Osato, T., and Klein, G. (1994). Clonality, expression and methylation patterns of the Epstein-Barr virus genomes in lethal midline granulomas classified as peripheral angiocentric T cell lymphomas. *J Gen Virol* **75 (Pt 1)**, 77-84.
- 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.
- Modrow, S., Falk, D. (1997). "Molekulare Virologie." Spektrum Verlag, HD.
- 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.

- 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.
- Nichols, K. E. (2000). X-linked lymphoproliferative disease: genetics and biochemistry. *Rev Immunogenet* **2**(2), 256-66.
- Niederman, J. C., McCollum, R. W., Henle, G., and Henle, W. (1968). Infectious mononucleosis. Clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *Jama* **203**(3), 205-9.
- Niedobitek, G. (1995). Patterns of Epstein-Barr virus infection in non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* **175**(3), 259-61.
- 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.
- Nonoyama, M., Huang, C. H., Pagano, J. S., Klein, G., and Singh, S. (1973). DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(11), 3265-8.
- Old, L. J., Boyse, E. A., Oettgen, H. F., Harven, E. D., Geering, G., Williamson, B., and Clifford, P. (1966). Precipitating Antibody in Human Serum to an Antigen Present in Cultured Burkitt's Lymphoma Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**(6), 1699-1704.
- 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.
- Pallesen, G., Hamilton-Dutoit, S. J., Rowe, M., and Young, L. S. (1991). Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. *Lancet* **337**(8737), 320-2.
- 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., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degnan, B., Muller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, 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.

- 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., 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.
- Pfeffer, S. a. V., O. (2006). Viruses, miRNAs and cancer. *Oncogene* **25**, 6211-6219.
- Polack, A., Hartl, G., Zimmer, U., Freese, U. K., Laux, G., Takaki, K., Hohn, B., Gissmann, L., and Bornkamm, G. W. (1984). A complete set of overlapping cosmid clones of M-ABA virus derived from nasopharyngeal carcinoma and its similarity to other Epstein-Barr virus isolates. *Gene* **27**(3), 279-88.
- 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.
- Pritchett, R. F., Hayward, S. D., and Kieff, E. D. (1975). DNA of Epstein-Barr virus. I. Comparative studies of the DNA of Epstein-Barr virus from HR-1 and B95-8 cells: size, structure, and relatedness. *J Virol* **15**(3), 556-9.
- Purtilo, D. T., Sakamoto, K., Saemundsen, A. K., Sullivan, J. L., Synnerholm, A. C., Anvret, M., Pritchard, J., Sloper, C., Sieff, C., Pincott, J., Pachman, L., Rich, K., Cruze, F., Cornet, J. A., Collins, R., Barnes, N., Knight, J., Sandstedt, B., and Klein, G. (1981). Documentation of Epstein-Barr virus infection in immunodeficient patients with life-threatening lymphoproliferative diseases by clinical, virological, and immunopathological studies. *Cancer Res* **41**(11 Pt 1), 4226-36.
- 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., and Bartel, D. P. (2002). Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* **297**(5588), 1831.
- 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 Moss, D. J. (1997). Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* **15**, 405-31.
- 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.
- Rickinson, A. B. a. K., E. (1996). Epstein-Barr Virus. In "Fields Virology" (B. Fields, D. Knipe, and P. Howley, Eds.), Vol. 2, pp. 2397-2446. 2 vols. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- 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.
- Rocchi, G., Felici, A., Ragona, G., and Heinz, A. (1977). Quantitative evaluation of Epstein-Barr-virus-infected mononuclear peripheral blood leukocytes in infectious mononucleosis. *N Engl J Med* **296**(3), 132-4.
- 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.
- Rolle, M. a. M., A. (2002). "Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre." 7. 7 vols. Enke Verlag, Stuttgart.
- Rowe, D. T., Clark, J.R. (1989). The type-specific epitopes of Epstein-Barr Virus nuclear antigen 2 are near the carboxy terminus of the protein. *J.Gen.Virol.* **70**, 1217-1229.
- Rowe, M., Rowe, D. T., Gregory, C. D., Young, L. S., Farrell, P. J., Rupani, H., and Rickinson, A. B. (1987). Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *Embo J* **6**(9), 2743-51.
- Sadler, R. H., and Raab-Traub, N. (1995). Structural analyses of the Epstein-Barr virus BamHI A transcripts. *J Virol* **69**(2), 1132-41.
- 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.
- Sawyer, R. N., Evans, A. S., Niederman, J. C., and McCollum, R. W. (1971). Prospective studies of a group of Yale University freshmen. I. Occurrence of infectious mononucleosis. *J Infect Dis* **123**(3), 263-70.

- Sayos, J., Wu, C., Morra, M., Wang, N., Zhang, X., Allen, D., van Schaik, S., Notarangelo, L., Geha, R., Roncarolo, M. G., Oettgen, H., De Vries, J. E., Aversa, G., and Terhorst, C. (1998). The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* **395**(6701), 462-9.
- Schepers, A., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1993). A transcript factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr Virus. *Embo J* **12**, 3021-3929.
- Scherer, E., Teske, H. J., Kuwert, E., and Gronemann, A. (1971). [Cytomorphologic studies on the modification by oxygen of the irradiation effect on tissue cultured tumor cells (HeLa cells)]. *Strahlentherapie* **141**(5), 591-8.
- 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.
- 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.
- Shiramizu, B., Barriga, F., Neequaye, J., Jafri, A., Dalla-Favera, R., Neri, A., Gutierrez, M., Levine, P., and Magrath, I. (1991). Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association. *Blood* **77**(7), 1516-26.
- Sixbey, J. W., Shirley, P., Chesney, P. J., Buntin, D. M., and Resnick, L. (1989). Detection of a second widespread strain of Epstein-Barr virus. *Lancet* **2**(8666), 761-5.
- Skare, J., and Strominger, J. L. (1980). Cloning and mapping of BamHI endonuclease fragments of DNA from the transforming B95-8 strain of Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(7), 3860-4.
- 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, P. R., de Jesus, O., Turner, D., Hollyoake, M., Karstegl, C. E., Griffin, B. E., Karran, L., Wang, Y., Hayward, S. D., and Farrell, P. J. (2000). Structure and coding content of CST (BART) family RNAs of Epstein-Barr virus. *J Virol* **74**(7), 3082-92.

- Smith, P. R., Gao, Y., Karran, L., Jones, M. D., Snudden, D., and Griffin, B. E. (1993). Complex nature of the major viral polyadenylated transcripts in Epstein-Barr virus-associated tumors. *J Virol* **67**(6), 3217-25.
- Smith, P. R., and Griffin, B. E. (1992). Transcription of the Epstein-Barr virus gene EBNA-1 from different promoters in nasopharyngeal carcinoma and B-lymphoblastoid cells. *J Virol* **66**(2), 706-14.
- 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.
- Sugihara, K., Reupke, H., Schmidt-Westhausen, A., Pohle, H. D., Gelderblom, H. R., and Reichart, P. A. (1990). Negative staining EM for the detection of Epstein-Barr virus in oral hairy leukoplakia. *J Oral Pathol Med* **19**(8), 367-70.
- Sugiura, M., Imai, S., Tokunaga, M., Koizumi, S., Uchizawa, M., Okamoto, K., and Osato, T. (1996). Transcriptional analysis of Epstein-Barr virus gene expression in EBV-positive gastric carcinoma: unique viral latency in the tumour cells. *Br J Cancer* **74**(4), 625-31.
- Sullivan, J. L. (1999). The abnormal gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Immunol*. **11**, 431-434.
- Takada, K., Komano, J., and Imai, S. (1999). [The role of Epstein-Barr virus in oncogenesis]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **44**(16), 2565-74.
- Takada, K., Shimizu, N., Sakuma, S., and Ono, Y. (1986). trans activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment. *J Virol* **57**(3), 1016-22.
- Tanner, J., Whang, Y., Sample, J., Sears, A., and Kieff, E. (1988). Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes. *J Virol* **62**(12), 4452-64.
- Thorley-Lawson, D. A. (2001). Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* **1**(1), 75-82.

- Tomari, Y., Du, T., Haley, B., Schwarz, D. S., Bennett, R., Cook, H. A., Koppetsch, B. S., Theurkauf, W. E., and Zamore, P. D. (2004). RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage. *Cell* **116**(6), 831-41.
- Tomkinson, B., Robertson, E., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* **67**(4), 2014-25.
- Uccini, S., Monardo, F., Stoppacciaro, A., Gradilone, A., Agliano, A. M., Faggioni, A., Manzari, V., Vago, L., Costanzi, G., Ruco, L. P., and et al. (1990). High frequency of Epstein-Barr virus genome detection in Hodgkin's disease of HIV-positive patients. *Int J Cancer* **46**(4), 581-5.
- Verma, S., and Eckstein, F. (1998). Modified oligonucleotides: synthesis and strategy for users. *Annu Rev Biochem* **67**, 99-134.
- Ward, M. H., Pan, W. H., Cheng, Y. J., Li, F. H., Brinton, L. A., Chen, C. J., Hsu, M. M., Chen, I. H., Levine, P. H., Yang, C. S., and Hildesheim, A. (2000). Dietary exposure to nitrite and nitrosamines and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *Int J Cancer* **86**(5), 603-9.
- Waterkouse, J., Muir, C.S., Shanmugaratnam, K., Powell, J. (1982). Cancer incidence in five continents. Volume IV. *IARC Sci Publ*(42), 1-807.
- Weiss, L. M., Movahed, L. A., Warnke, R. A., and Sklar, J. (1989). Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* **320**(8), 502-6.
- 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.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**(5), 855-62.
- 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.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* **17**(24), 3011-6.
- Yoshiyama, H., Shimizu, N., and Takada, K. (1995). Persistent Epstein-Barr virus infection in a human T-cell line: unique program of latent virus expression. *Embo J* **14**(15), 3706-11.
- 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.
- 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., Yi, R., and Cullen, B. R. (2005). Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *Embo J* **24**(1), 138-48.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., and Anderson, T. A. (2006). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*.
- 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.
- zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P., and Santesson, L. (1970). EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* **228**(5276), 1056-8.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Tilmann Rümenapf danke ich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit am Institut für Virologie, der Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Herrn Prof. Dr. Nikolaus Müller-Lantzsch danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie der Universitätskliniken, Homburg/Saar.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. A. Grässer für die Überlassung des interessanten Themas und sein Vertrauen, sowie seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

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

Bei Herrn Dipl. Biol. Thorsten Pfuhl möchte ich mich besonders für die Vermittlung molekularbiologischer Arbeitsmethoden, seine Hilfsbereitschaft und Betreuung, besonders bei der Anfertigung der Northern Blots, bedanken.

Bei Herrn Dipl. Biol. Alfredo Mamiani bedanke ich mich zusätzlich besonders für die Einführung in die Arbeit mit miRNAs.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. Stephanie Barth für ihre Motivation und die Vermittlung biologischer Sichtweisen.

Mein weiterer Dank gilt Frau Ruth Nord sowie Frau Barbara Best für ihre exzellenten Ratschläge und Hilfestellungen bei Problemen mit verschiedenen Arbeitsmethoden.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Prof. Grässer bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Allen Mitarbeitern der Virologie möchte ich für ihre freundliche Aufnahme und das angenehme Arbeitsklima danken.

Einen ganz besonderen und herzlicher Dank gilt meiner Familie, die mir die Möglichkeit zu diesem Studium gab und mir immer mit Rat und Tat, aber auch mit Kritik zur Seite stand.

Last but not least möchte ich bei meinen Freunden bedanken, die stets großes Interesse an meinem Studium zeigten und bei denen ich immer ein offenes Gehör fand.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündliche Auskünfte beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Claudia Ehses