

Aus dem Institut für Virologie  
Klinische Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **MicroRNA-Profil EBV-assoziiertes NK/T- Zell Lymphome und Identifizierung von microRNA-Zielgenen**

**Dissertation**

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

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2010

Vorgelegt von Natalie Motsch

geb. am 09.03.1983 in Völklingen

„Man muss viel gelernt haben,  
um über das, was man nicht  
weiß, fragen zu können.“

*Jean-Jacques Rousseau*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Summary</b> .....	<b>2</b>
<b>3. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1. Das Epstein-Barr-Virus</b> .....	<b>3</b>
3.1.1. Die Epstein-Barr-Virus Infektion.....	4
3.1.2. EBV assoziierte Tumorerkrankungen .....	5
3.1.3. NK/T-Zell Lymphome .....	7
<b>3.2. RNA-Interferenz</b> .....	<b>9</b>
3.2.1. microRNAs .....	10
3.2.2. Die Rolle von miRNAs bei der Entstehung von Krebs .....	15
3.2.3. Virale und EBV-kodierte miRNAs .....	16
<b>3.3. Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>19</b>
<b>4. Material</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1. Geräte</b> .....	<b>21</b>
<b>4.2. Chemikalien, Membranen, Reagenzien</b> .....	<b>21</b>
<b>4.3. Puffer und Lösungen</b> .....	<b>23</b>
<b>4.4. Enzyme</b> .....	<b>28</b>
<b>4.5. Größen- und Molekulargewichtsmarker</b> .....	<b>28</b>
4.5.1. DNA-Größenstandard .....	28
4.5.2. Protein-Molekulargewichtsmarker.....	28
<b>4.6. Antikörper</b> .....	<b>29</b>
<b>4.7. Patientenmaterial</b> .....	<b>29</b>
<b>4.8. Zelllinien</b> .....	<b>30</b>
4.8.1. Adhärente Zelllinien .....	30
4.8.2. Suspensionszellen .....	30
<b>4.9. Nährmedien</b> .....	<b>31</b>
4.9.1. Bakterien .....	31
4.9.2. Kulturmedien für Säugerzellen.....	31
<b>4.10. Bakterienstämme</b> .....	<b>32</b>
<b>4.11. Vektoren</b> .....	<b>32</b>
4.11.1. pGEM-T.....	32
4.11.2. pSG5 .....	33
4.11.3. pEGFP-C1.....	34
4.11.4. pMIR-REPORT™ .....	35
4.11.5. Volllängen-cDNA-Klone .....	35
4.11.6. miRNA-Expressionsplasmide .....	36
4.11.7. Reporterplasmide.....	38
<b>4.12. Oligonukleotide</b> .....	<b>40</b>

---

<b>4.13.</b>	<b>Software</b> .....	<b>41</b>
<b>5.</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>43</b>
<b>5.1.</b>	<b>Bakterielle Zellkultur</b> .....	<b>43</b>
5.1.1.	Aufzucht und Lagerung von Bakterien.....	43
5.1.2.	Herstellung kompetenter Bakterien (CaCl <sub>2</sub> /RbCl-Methode) .....	43
5.1.3.	Transformation kompetenter Bakterien .....	44
5.1.4.	Blau-Weiß-Selektion .....	44
<b>5.2.</b>	<b>Eukaryotische Zellkultur</b> .....	<b>45</b>
5.2.1.	Kultur von adhärenenten Monolayer-Zellkulturen.....	45
5.2.2.	Kultur von Suspensionszellen.....	45
5.2.3.	Zellzahlbestimmung mittels CASY .....	45
5.2.4.	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Nanofectin.....	46
5.2.5.	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Metafectene .....	46
5.2.6.	Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Nucleofector .....	46
<b>5.3.</b>	<b>DNA-Techniken</b> .....	<b>47</b>
5.3.1.	Isolierung von Plasmid-DNA .....	47
5.3.1.1.	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA (Boiling Präparation) .....	47
5.3.1.2.	Plasmid-DNA-Präparation mittels NucleoBond™ .....	47
5.3.2.	Photometrische Konzentrationsbestimmung .....	48
5.3.3.	PCR.....	48
5.3.4.	Zielgerichtete Mutagenese.....	50
5.3.5.	Agarosegelelektrophorese .....	51
5.3.6.	NucleoSpin-Extraktion von DNA.....	53
5.3.7.	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen .....	53
5.3.8.	Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	54
5.3.9.	Ligation von DNA-Fragmenten .....	54
5.3.10.	Ligation von PCR-Fragmenten in pGEM®-T .....	55
<b>5.4.</b>	<b>RNA-Techniken</b> .....	<b>56</b>
5.4.1.	RNA-Isolation .....	56
5.4.2.	Northern Blot.....	56
5.4.2.1.	Herstellung des Polyacrylamidgels und Gelelektrophorese .....	56
5.4.2.2.	RNA Transfer .....	57
5.4.2.3.	Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde.....	57
5.4.2.4.	Spezifischer Nachweis von RNA .....	59
5.4.3.	cDNA-Synthese.....	59
<b>5.5.</b>	<b>Quantitative Real-Time PCR</b> .....	<b>61</b>
5.5.1.	qRT-PCRs für miRNAs mit SYBRGreen .....	61
5.5.2.	qRT-PCRs für mRNAs mit Hilfe der Universal ProbeLibrary .....	62
5.5.3.	Relative Quantifizierung .....	63
<b>5.6.</b>	<b>Luciferase-Assays</b> .....	<b>64</b>

5.6.1.	Dual-Luciferase <sup>®</sup> Reporter Assays .....	64
5.6.2.	Luciferase-Assay System .....	65
<b>5.7.</b>	<b>Durchflusszytometrie .....</b>	<b>66</b>
5.7.1.	Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	66
5.7.2.	Intrazelluläre Färbung von Proteinen zum durchflusszytometrischen Nachweis .....	67
<b>5.8.</b>	<b>Proteintechniken .....</b>	<b>68</b>
5.8.1.	Herstellen von Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen.....	68
5.8.2.	SDS-PAGE.....	69
5.8.3.	Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels und Gelelektrophorese.....	69
5.8.4.	Western Blot.....	70
5.8.5.	ELISA .....	71
<b>5.9.</b>	<b>Herstellung der cDNA-Banken.....</b>	<b>72</b>
5.9.1.	Isolierung der kleinen RNA-Fraktion aus Gewebe.....	72
5.9.2.	cDNA-Synthese.....	72
<b>5.10.</b>	<b>Auswertung der Sequenzdaten .....</b>	<b>74</b>
5.10.1.	Generierung einer miRNA-Datenbank.....	74
5.10.2.	Entfernen von Adaptersequenzen und Poly(A)-Schwanz .....	74
5.10.3.	Vereinfachen der Sequenz-Banken.....	75
5.10.4.	Sequenz Vergleich.....	75
5.10.5.	Manuelle Überprüfung der Annotationen.....	75
5.10.6.	Identifizierung von ncRNAs und neuen miRNAs .....	76
5.10.7.	Auswertung der analysierten Sequenzbanken .....	76
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>77</b>
<b>6.1.</b>	<b>Fragestellung.....</b>	<b>77</b>
<b>6.2.</b>	<b>Herstellung von cDNA-Banken aus Tumor- bzw. Normalgewebe.....</b>	<b>78</b>
<b>6.3.</b>	<b>Sequenz-Analyse der hergestellten cDNA-Banken .....</b>	<b>79</b>
6.3.1.	Klassifikation kleiner nicht-kodierender RNAs in den untersuchten cDNA-Banken .....	79
6.3.2.	Expressionsanalyse zellulärer miRNAs .....	80
6.3.2.1.	Vergleich der miRNA-Expression zwischen EBV-negativen T-Zell Lymphomen und Thymus .....	81
6.3.2.2.	Relative miRNA-Expression in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen im Vergleich zum Normalgewebe .....	83
6.3.2.3.	miRNA-Expressionsvergleich zwischen EBV-positiven NK/T- und EBV- negativen T-Zell Lymphomen .....	84
6.3.3.	Identifizierung von potentiell neuen miRNAs .....	86
6.3.4.	Expressionsanalyse der viralen miRNAs.....	89
<b>6.4.</b>	<b>Validierung differentiell exprimierter miRNAs .....</b>	<b>90</b>
<b>6.5.</b>	<b>Untersuchung differentiell exprimierter miRNAs in Zelllinien .....</b>	<b>94</b>
<b>6.6.</b>	<b>Identifizierung von Ziel-mRNAs differentiell exprimierter miRNAs in NK/T-Zell Lymphomen .....</b>	<b>96</b>
6.6.1.	Herstellung von miRNA-Expressionsvektoren.....	97
6.6.2.	FOS, CD44 und IL1R1 als mögliche Zielgene differentiell exprimierter miRNAs.....	98

6.6.2.1.	Regulation der 3'UTR von FOS, CD44 und IL1R1 durch miRNAs.....	99
6.6.3.	IL1A als Target von miR-142 .....	102
6.6.3.1.	Regulation der 3'UTR von IL1A durch miR-142-3p .....	103
6.6.3.2.	Korrelation zwischen der Expressionsmenge von miR-142-3p und der IL1A-mRNA in den untersuchten Tumoren.....	105
6.6.3.3.	miR-142 inhibiert die Expression eines IL1A-Vollängen-Konstrukts in 293T-Zellen .....	107
6.6.3.4.	Einfluss von miR-142 auf die endogene Proteinmenge von IL1A in NK bzw. T-Zellen..	108
6.6.3.5.	miR-142 reduziert die endogene Proteinmenge und die Sekretion von IL1A in HaCaT-Zellen .....	109
6.6.4.	BCL6 als Target von miR-205.....	111
6.6.4.1.	Einfluss verschiedener miRNAs auf die Aktivität eines BCL6-Reporterkonstrukts .....	112
6.6.4.2.	miR-205 reduziert die endogene Proteinmenge von BCL6 .....	114
<b>6.7.</b>	<b>Identifizierung von zellulären Zielgenen EBV-kodierter miRNAs .....</b>	<b>115</b>
6.7.1.	Expressionskontrolle von BART-miRNA Expressionsplasmiden .....	116
6.7.2.	Die 3'UTR von ELK3 und SOCS3 wird nicht durch BART-miRNAs reguliert.....	117
6.7.3.	Regulation von TOMM22 durch die virale miRNA BART16 .....	120
<b>7.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>125</b>
<b>7.1.</b>	<b>Auswahl der Tumoren und Herstellung der cDNA-Banken .....</b>	<b>125</b>
<b>7.2.</b>	<b>Analyse der cDNA-Banken.....</b>	<b>126</b>
7.2.1.	Verteilung der kleinen ncRNAs in den untersuchten Geweben.....	126
7.2.2.	Differentielle Expression zellulärer miRNAs in den untersuchten Geweben .....	127
7.2.2.1.	Expressionsunterschiede der EBV-negativen T-Zell Lymphome im Vergleich zum Normalgewebe .....	128
7.2.2.2.	Differentiell exprimierte miRNAs in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen verglichen zum Thymus .....	130
7.2.2.3.	Expressionsunterschied in EBV-positiven im Vergleich zu EBV-negativen Lymphomen .....	132
7.2.3.	Identifizierung möglicher neuer miRNAs .....	136
7.2.4.	Expression viraler miRNAs in NK/T-Zell Lymphomen .....	137
<b>7.3.</b>	<b>Validierung der Expression zellulärer miRNAs mittel quantitativer Real-Time PCR</b>	<b>139</b>
<b>7.4.</b>	<b>Expression der deregulierten miRNAs in Zelllinien .....</b>	<b>140</b>
<b>7.5.</b>	<b>Identifizierung von Targets differentiell exprimierter miRNAs in NK/T-Zell Lymphomen.....</b>	<b>141</b>
7.5.1.	miR-142 reguliert posttranskriptionell die Expression von IL1A .....	142
7.5.2.	BCL6 als Target von miR-205.....	146
<b>7.6.</b>	<b>Identifizierung von zellulären Ziel-mRNAs EBV-kodierter miRNAs.....</b>	<b>147</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>150</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>171</b>
9.1.	Tabellen.....	171
9.2.	Publikationen.....	180
9.3.	Danksagung.....	181
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>182</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EBV-Viruspartikels (Young and Rickinson, 2004).....	3
Abbildung 2: Patient mit nasalem NK/T-Zell Lymphom.....	8
Abbildung 3: Übersicht über die Biogenese und Funktion von miRNAs (Bi et al., 2009) .....	12
Abbildung 4: Mögliche Mechanismen der miRNA-vermittelten posttranskriptionellen Genrepression .	14
Abbildung 5: Schematische Übersicht über die Lokalisation von Latenzgenen und miRNAs im EBV-Genom .....	17
Abbildung 6: 1 kb Plus DNA-Leiter (Quelle: Invitrogen) .....	28
Abbildung 7: pGEM-T Vektor der Firma Promega zur Zwischenklonierung von PCR-Produkten (Quelle:Promega).....	33
Abbildung 8: Vektorkarte von pSG5 (Quelle: Stratagen) .....	34
Abbildung 9: Vektorkarte von pEGFP-C1 (Quelle:Clontech) .....	34
Abbildung 10: Schematische Darstellung des pMIR-REPORT™ (Ambion) .....	35
Abbildung 11: Beispiel zur Transfektionsbestimmung mittels FACS .....	67
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Reaktionsabläufe von der RNA bis hin zur Sequenzierung .....	73
Abbildung 13: Qualitätskontrolle der aus den Geweben isolierten RNA und der PCR-amplifizierten cDNA (Quelle: vertis Biotechnologie AG) .....	78
Abbildung 14: Verteilung verschiedener kleiner, nicht-kodierender RNAs bzw. Transkripte in den cDNA-Banken der untersuchten Gewebe.....	79
Abbildung 15: Vergleich der relativen miRNA-Expression zwischen EBV-negativen T-Zell Lymphomen und Thymus .....	82
Abbildung 16: Relative miRNA-Expression in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen verglichen zu Thymus .....	83
Abbildung 17: Differentielle Expression zellulärer miRNAs in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen im Vergleich zu EBV-negativen T-Zell Lymphomen.....	84
Abbildung 18: Relative miRNA-Expression der im Vergleich EBV-positiven zu EBV-negativen Lymphomen induzierten miRNAs in allen cDNA-Banken.....	85
Abbildung 19: Relative miRNA-Expression der im Vergleich EBV-positiver zu EBV-negativer Lymphome reprimierten miRNAs in allen cDNA-Banken .....	86
Abbildung 20: Northern Blot zum Nachweis potentiell neuer miRNAs.....	88
Abbildung 21: Verteilung der EBV-kodierten miRNAs in NK/T-Zell Lymphomen .....	89
Abbildung 22: Northern Blot zur Untersuchung der Expression von BHRF1-miRNAs in NK- bzw-T-Zelllinien.....	90
Abbildung 23: Relative Expressionsänderung induzierter miRNAs in Sequenzierung und quantitativer Real-Time PCR.....	92
Abbildung 24: Relative Expressionsänderung reprimierter miRNAs in Sequenzierung und qRT-PCR	93
Abbildung 25: Untersuchung induzierter miRNAs in NK- bzw. T-Zelllinien.....	95
Abbildung 26: Expression reprimierter miRNAs in NK- bzw. T-Zelllinien.....	96

---

Abbildung 27: Expressionskontrolle zellulärer miRNA-Expressionsplasmide im Northern Blot .....	98
Abbildung 28: Regulation der 3'UTR von FOS durch miR-181a und miR-181b .....	100
Abbildung 29: Einfluss differentiell exprimierter miRNAs auf die CD44-3'UTR .....	101
Abbildung 30: Einfluss von miR-125a und miR-205 auf die 3'UTR von IL1R1 .....	102
Abbildung 31: Regulation der IL1A-3'UTR durch miR-142, miR-181a und miR-181b .....	103
Abbildung 32: Schematische Übersicht über die vorhergesagten Bindestellen für miR-142 in der IL1A-3'UTR .....	104
Abbildung 33: Identifikation der Zielsequenz von miR-142 in der IL1A-3'UTR .....	105
Abbildung 34: Expressionsverhältnis von miR-142-3p and IL1A-mRNA zwischen EBV-positiven und EBV-negativen Lymphomen .....	106
Abbildung 35: miR-142 reduziert die Expression eines Volllängen-cDNA-Klons von IL1A in 293T-Zellen .....	107
Abbildung 36: IL1A-Expression in GFP-transfizierten NK-92 Zellen .....	109
Abbildung 37: Einfluss von miR-142 auf die endogene Expression von IL1A in HaCaT-Zellen .....	110
Abbildung 38: Reduktion der IL1A-Sekretion von HaCaT-Zellen durch miR-142 .....	111
Abbildung 39: Einfluss verschiedener miRNAs auf die BCL6-3'UTR .....	112
Abbildung 40: Schematische Übersicht der Bindung von miR-205 in der BCL6-3'UTR .....	113
Abbildung 41: Identifizierung der Bindungsstelle von miR-205 in der BCL6-3'UTR .....	114
Abbildung 42: Reduktion von BCL6 durch miR-205 in SUP-T1 Zellen .....	115
Abbildung 43: Expressionskontrolle viraler miRNA-Expressionsplasmide im Northern Blot .....	117
Abbildung 44: Einfluss der verschiedenen BART-Cluster auf die Aktivität des Leervektors pMIR-RNL-TK .....	118
Abbildung 45: BART-miRNAs haben keinen Einfluss auf die Aktivität des ELK3-3'UTR-Reporterkonstrukts .....	119
Abbildung 46: Einfluss der BART-miRNAs auf die SOCS3-3'UTR .....	120
Abbildung 47: Regulation der TOMM22-3'UTR durch BART6-16 .....	121
Abbildung 48: Expressionskontrolle von BART6, BART16 und BART17 im Northern Blot .....	122
Abbildung 49: Reduktion der Luciferase-Aktivität des TOMM22-3'UTR-Reporterkonstrukts durch BART16 .....	123
Abbildung 50: Schematische Darstellung der vorhergesagten Bindestelle von BART16 in der TOMM22-3'UTR .....	123
Abbildung 51: Einfluss der BART16 auf die <i>wt</i> -3'UTR von TOMM22 und ihre Mutante .....	124
Abbildung 52: Chronische Entzündung oder Infektion stimuliert Zytokine und Chemokine, die zur Entstehung maligner Erkrankungen führen .....	145
Abbildung 53: miR-142-3p beeinflusst die Expression von IL1A direkt und indirekt durch posttranskriptionelle Regulation .....	146



---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Expressionsprofile der verschiedenen EBV-Latenztypen .....	5
Tabelle 2: Die viralen miRNAs von Säugetier-Viren (Skalsky and Cullen, 2010) .....	16
Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben .....	29
Tabelle 4: Übersicht über die klonierten miRNA-Expressionskonstrukte einschließlich der zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide .....	37
Tabelle 5: Pipettierschema eines 50 µl Standard-PCR-Ansatzes .....	50
Tabelle 6: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms .....	50
Tabelle 7: Standardreaktionsansatz zur Durchführung der zielgerichteten Mutagenese .....	51
Tabelle 8: PCR-Programm zur Durchführung der zielgerichteten Mutagenese .....	51
Tabelle 9: Eingesetzte Agarosegele je nach aufzutrennender Fragmentgröße .....	52
Tabelle 10: Pipettierschema zum quantitativen Nachweis von miRNAs mittels SYBRGreen I .....	61
Tabelle 11: Programm zur Amplifizierung von miRNAs mittels LightCycler .....	62
Tabelle 12: PCR-Ansatz für die Amplifikation von cDNA mittels Universal ProbeLibrary .....	63
Tabelle 13: PCR-Programm zur Amplifizierung von cDNA mit Hilfe der Universal ProbeLibrary .....	63
Tabelle 14: Komponenten für ein 10%iges Polyacrylamidgel .....	70
Tabelle 15: Übersicht über die während der Vorbereitung zur 4-5-4-Sequenzierung addierten Adaptersequenzen .....	73
Tabelle 16: Eingesetzte Barcodesequenzen zur Identifizierung der entsprechenden cDNA-Banken ..	74
Tabelle 17: miRNAs, die in EBV-negativen Lymphomen nicht oder kaum exprimiert werden .....	82
Tabelle 18: Neue miRNAs von bereits bekannten miRNA-Vorläufern .....	87
Tabelle 19: Neue potentielle miRNA-Vorläufer .....	87
Tabelle 20: Expression der EBV-kodierten miRNAs in NK/T-Zell Lymphomen .....	171
Tabelle 21: Expression zellulärer miRNAs in den untersuchten cDNA-Banken .....	172

---

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BHRF	<i>Bam H1 rightward open reading frame 1</i>
BART	<i>Bam HI-A region rightward transcript</i>
BCL6	<i>B-cell lymphoma 6 protein</i>
BL	Burkitt-Lymphom
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	complementary (komplementäre) DNA
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i> (alkalische Phosphatase)
Ct	cycle threshold
CTP	Cytidintriphosphat
DLBCL	<i>Diffuse large B-cell lymphoma</i> (großzelliges B-Zell Lymphom)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Effizienz
EBER	Epstein-Barr Virus <i>encoded RNA</i>
EBNA	Epstein-Barr Virus <i>nuclear antigen</i>
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide)
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat

---

h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	bidestilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HL	Hodgkin-Lymphom
IL1A	Interleukin 1A
IL1R1	Interleukin 1 Rezeptor, Typ 1
IM	Infektiöse Mononukleose
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria Broth
LMP	<i>latent membrane protein</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	microRNA
ncRNA	<i>non-coding RNA</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NPC	Nasopharynxkarzinom
NTP	Nukleosidtriphosphate
Oligo	Oligonukleotid
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAP	Poly(A)-Polymerase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
piRNA	<i>PIWI-interacting RNA</i>
pre-miRNA	<i>precursor microRNA</i>
pri-miRNA	<i>primary microRNA</i>
PTLD	<i>post-transplant lymphoproliferative disease</i>
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro minute)

---

rRNA	ribosomale RNA
RS	Reed-Steinberg
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TOMM22	<i>translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer RNA
U	<i>Unit</i> (Einheit)
UTP	Uridintriphosphat
UTR	<i>untranslated region</i> (untranslatierte Region)
UV	ultraviolett
ü.N.	über Nacht
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen per Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht per Volumen)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranosid

## 1. Zusammenfassung

Das Epstein-Barr Virus ist als Onkovirus mit verschiedenen Krebserkrankungen assoziiert. Das Virus kodiert für 25 virale miRNAs und kann die Expression von zellulären miRNAs der infizierten Wirtszelle verändern. MiRNAs sind kleine nichtkodierende RNAs, die als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression als Onkogene oder Tumorsuppressoren zur Tumorentstehung oder –progression beitragen können.

Ziel dieser Arbeit war es den Beitrag virusregulierter bzw. viraler miRNAs zur Entstehung von NK/T-Zell Lymphomen näher zu untersuchen. Zur Identifikation von virusregulierten miRNAs wurden zunächst miRNA-Expressionsprofile von EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen, EBV-negativen T-Zell Lymphomen sowie Thymus als Normalgewebe mittels 4-5-4 Sequenzierung erstellt. Durch semimanuelle Analyse konnten differentiell exprimierte miRNAs bestimmt werden, deren Expression durch quantitative Real-Time PCR in den Tumoren bestätigt wurde. Die anschließende funktionelle Analyse von Ziel-mRNAs sollte mithelfen, den Beitrag differentiell exprimierter miRNAs zur Tumorigenese aufzuklären. Zum einen wurde das proinflammatorische Zytokin Interleukin 1A als Target für miR-142-3p identifiziert. Durch die Repression dieser miRNA in den EBV-assoziierten Lymphomen, könnte die induzierte Expression des Zytokins durch seine Eigenschaft als auto- bzw. parakriner Wachstumsfaktor, sowie seine Fähigkeit u.a. prometastatische Gene zu induzieren zur Entstehung bzw. Progression dieser Lymphome beitragen. Außerdem wurde das Onkogen BCL6 als Target für miR-205 identifiziert. Durch Repression dieser miRNA in den Lymphomen verglichen zum Normalgewebe könnte die Expression von BCL6 induziert sein und seine onkogenen Eigenschaften zur Entstehung oder Progression der Lymphome beitragen. In einem Teilprojekt sollten außerdem mögliche Ziel-mRNAs viruskodierter miRNAs aus den mit Hilfe von Immunpräzipitation der RISC-Komplexe aus EBV-infizierten und nichtinfizierten B-Zelllinien präzipitierten mRNAs verifiziert werden. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die virale miRNA BART16 die Expression von TOMM22, einem Vermittler der BAX-induzierten Apoptose, reguliert und somit wahrscheinlich zum Überleben der virusinfizierten Zelle beiträgt. Somit konnte also gezeigt werden, dass EBV die Expression von eigenen und zellulären miRNAs nutzt um günstige Bedingungen für die virusinfizierte Zelle zu schaffen.

---

## 2. Summary

The Epstein-Barr Virus is an oncovirus associated with several tumour diseases. The virus encodes 25 viral miRNAs and is also able to change the expression of cellular miRNAs in the infected host cell. MiRNAs are small non-coding RNAs which are posttranscriptional regulators of gene expression and act as oncogenes and tumour suppressor to contribute to the development and progression of tumours.

The aim of this thesis was to analyse the contribution of virus regulated and viral miRNAs to the development of NK/T-cell lymphoma. First, miRNA expression profiles of EBV-associated NK/T-cell lymphoma, EBV-negative T-cell lymphoma and Thymus as normal tissue were generated by 4-5-4 sequencing to identify virus regulated miRNAs. A differential expression could be determined for a number of miRNAs whose expression was validated in the tumour tissues by quantitative real-time PCR. In the following functional analysis of target mRNAs should help to further elucidate the contribution of differential expressed miRNAs to tumorigenesis. On the one hand the proinflammatory cytokine Interleukin 1A was identified as a target of miRNA miR-142-3p. The repression of this miRNA in EBV-associated lymphomas could result in an increased amount of the cytokine. Interleukin 1A might promote the development and progression of the lymphoma by its ability to act as an autocrine and paracrine growth factor and to induce prometastatic genes. In addition, the oncogene BCL6 was identified as a target of miR-205. The repression of this miRNA in lymphomas as compared to normal tissue might result in an induced expression of BCL and its oncogenic properties could also account for the development and progression of the lymphomas.

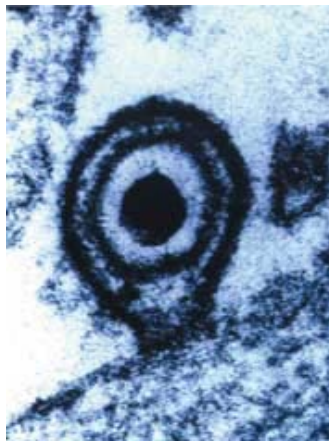
In an additional project, potential target mRNAs for viral miRNAs should be verified after precipitation of mRNAs from RISC-complexes derived from EBV-infected and uninfected B-cell lines. Thereby the mediator of BAX-induced apoptosis TOMM22 could be detected to be a target of the viral miRNA BART16. This probably contributes to the survival of the virus infected cell.

In summary, it could be shown that EBV takes advantage of the cellular and viral miRNA expression to create favourable conditions for the virus infected cell.

### 3. Einleitung

#### 3.1. Das Epstein-Barr-Virus

Ende der fünfziger Jahre des letzten Jahrhunderts beschrieb der britische Chirurg Dennis Burkitt ein Lymphom, welches die häufigste Tumorerkrankung für Kinder in Malariagebieten Zentral- und Ostafrikas darstellte (Burkitt, 1958). Da in den 60er Jahren das Konzept akzeptiert wurde, dass Viren Krebs verursachen können, gab es in dieser Zeit viele Versuche humane Tumoviren zu isolieren. 1964 gelang es Anthony Epstein, Bert Achong und Yvonne Barr Zelllinien aus einem Burkitt-Lymphom zu etablieren, in denen sie elektronenmikroskopisch herpesvirusähnliche Viruspartikel nachweisen konnten (Epstein et al., 1964). Aufgrund seiner Entdecker wurde das erste bekannte humane Tumovirus später als Epstein-Barr-Virus (EBV) bezeichnet. Abbildung 1 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines EBV-Viruspartikels.



**Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EBV-Viruspartikels (Young and Rickinson, 2004)**

Das Epstein-Barr-Virus ist ein doppelsträngiges, behülltes DNA-Virus, das zur Familie der  *$\gamma$ -Herpesviridae* und zur Gattung der *Lymphocryptoviridae* gehört. Lymphokryptoviren findet man nur in Primaten, wobei EBV als einziger Vertreter dieser Gattung Menschen infiziert. Das doppelsträngige DNA-Genom liegt im Viruspartikel linear vor und ist  $\sim 172$  kb groß. Es ist umgeben von einem ikosaedrischen Nucleokapsid aus 162 Kapsomeren, einem proteinreichen Tegument, sowie einer äußeren Hülle mit Glykoproteinen (Kutok and Wang, 2006; Thompson and Kurzrock, 2004).

### 3.1.1. Die Epstein-Barr-Virus Infektion

EBV ist ein sehr erfolgreiches humanes Pathogen, da über 95 % der erwachsenen Weltbevölkerung mit dem Virus infiziert sind und das Virus lebenslang in Gedächtnis-B-Zellen persistiert (Thorley-Lawson, 2005). Die Primärinfektion mit EBV im Kindesalter verläuft asymptomatisch, wohingegen eine spätere Infektion im Jugend- oder Erwachsenen-Alter häufig mit dem Auftreten der infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber) verbunden ist, die auf eine unkontrollierte T-Zell Antwort gegen EBV-infizierte Zellen zurückzuführen ist (Henle et al., 1968). Die Übertragung des Virus erfolgt über Speichel von infizierten Individuen, weshalb die infektiöse Mononukleose (IM) auch „kissing disease“ genannt wird. Zunächst infiziert das Virus Epithelzellen des Nasen-Rachenraums und repliziert dort. Anschließend infiziert und immortalisiert es Zellen des B-Zell-Kompartiments um schließlich lebenslang in diesen zu persistieren (Babcock et al., 1998). Zurzeit gibt es jedoch kein einheitliches Modell wie EBV in Gedächtnis-B-Zellen gelangt um dort lebenslang zu persistieren (Thorley-Lawson, 2001).

Die Infektion der Lymphozyten erfolgt durch Binden des viralen Glykoproteins gp 350/220 an den Oberflächenrezeptor CD21 (CR2) und anschließender Endozytose. Das Virusgenom wird durch Verschmelzen der Virushülle mit der Endosomenmembran ins Cytoplasma freigegeben und zum Zellkern transportiert (Nemerow et al., 1985; Tanner et al., 1987). Terminale Wiederholungssequenzen in der DNA ermöglichen eine Zirkularisierung des viralen Genoms in der infizierten Zelle, so dass das EBV-Genom dann als Episom vorliegt.

Trotz einer EBV-spezifischen Immunantwort, die zwar die mit dem lytischen Zyklus verbundene Primärinfektion durch Beseitigen vieler EBV-infizierter Zellen beheben kann, schafft es das Immunsystem nicht den Körper völlig von dem Virus zu befreien. Das Virus versteckt sich in langlebigen Gedächtnis-B-Zellen, wo die virale Genexpression inhibiert und nur durch Expression von EBNA 1 sichergestellt wird, dass das episomale, virale Genom bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben wird (Yates et al., 1985). Es kommt aber immer wieder zur Reaktivierung des lytischen Zyklus, wodurch sich das Virus vermehren und über den Speichel weiter verbreiten kann (Kutok and Wang, 2006).

Während der latenten EBV-Infektion werden unterschiedlich viele der 11 latenten Gene exprimiert. In allen Latenztypen werden die EBER-RNAs exprimiert. Während Latenztyp I durch die Expression von EBNA1 (Epstein-Barr Virus nuclear antigen 1)



charakterisiert ist, werden im Latenztyp II zusätzlich die latenten Membranproteine (LMPs) exprimiert. Nur Zellen des Latenztyp III exprimieren alle latenten Gene: EBERs, EBNAs (1, 2, 3A, 3B, 3C, LP) und LMPs (1, 2A, 2B). EBV-assoziierte Tumoren zeigen auch unterschiedliche Expressionsmuster der Latenzgene. Nachfolgende Tabelle zeigt die verschiedenen Latenztypen, sowie die assoziierten Tumorerkrankungen.

**Tabelle 1: Expressionsprofile der verschiedenen EBV-Latenztypen**

Latenztyp	Expressions-Profil	Vorkommen
Typ I	EBER1+2 EBNA1	BL, (NK/T-Zell Lymphome)
Typ II	EBER1+2 EBNA1 LMPs (1, 2A, 2B)	NPC, HD, (NK/T-Zell Lymphome)
Typ III	EBER1+2 EBNAs (1, 2, 3A, 3B, 3C, LP) LMPs (1, 2A, 2B)	Akute IM, PTLD, AIDS- assoziierte Lymphome

### 3.1.2. EBV assoziierte Tumorerkrankungen

Wie bereits erwähnt ist EBV als erstes beschriebenes Tumovirus mit der Entstehung von verschiedenen Tumorerkrankungen und mit insgesamt 1 % aller Tumoren weltweit assoziiert (Delecluse et al., 2007). Auch wenn EBV *in vitro* in der Lage ist B-Zellen sehr effektiv zu immortalisieren, so sind doch mehr als 95 % der Weltbevölkerung latent und ohne klinische Symptome mit dem Virus infiziert. Unter physiologischen Bedingungen scheint EBV also ein schwaches transformierendes Agens zu sein und es ist auch nicht klar, warum manche Individuen für EBV-vermittelte Transformation empfänglich sind, auch wenn man weiß, dass Immunsuppression einer der Hauptrisikofaktoren darstellt (Delecluse et al., 2007). Nachfolgend soll ein Überblick über EBV-assoziierte Tumoren gegeben und näher auf die Entstehung von nasalen NK/T-Zell Lymphomen eingegangen werden.

#### Lymphome von Immunsupprimierten

Immunsupprimierte Menschen haben ein erhöhtes Risiko lymphoproliferative Erkrankungen zu entwickeln. Man geht im allgemeinen davon aus, dass es bei organtransplantierten oder an AIDS-erkrankten Menschen aufgrund der Suppression der cytotoxischen T-Zell Antwort zu einer unkontrollierten Vermehrung EBV-infizierter Zellen kommt. Bei PTLD's (Post-Transplant-Lymphoproliferative Disease) handelt es

sich hauptsächlich um B-Zell Lymphome, wobei diese meist im ersten Jahr nach der Transplantation zum Ausbruch kommen, solange die Immunsuppression am stärksten ist. PTLDs zeigen Latenztyp III und während fast alle frühen Lymphome EBV-positiv sind, zeigen die späteren PTLDs eine 60-80%ige Assoziation mit EBV (Carbone et al., 2008; Kutok and Wang, 2006; Young and Rickinson, 2004). Die Lymphome, die bei AIDS-Patienten aufgrund der Immunsuppression entstehen, sind eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen, wobei die Patienten am häufigsten Burkitt-Lymphome entwickeln, die Latenztyp I zeigen und in 30-40 % aller Fälle mit EBV-assoziert sind (Carbone et al., 2008; Delecluse et al., 2007).

### **Burkitt-Lymphom**

Während in fast allen endemischen Burkitt-Lymphomen (BL) EBV detektiert werden kann, zeigen sporadische BLs eine 15-20%ige Assoziation (Carbone et al., 2008; Young and Rickinson, 2004). Der Schlüsselfaktor bei der Entstehung von Burkitt-Lymphomen ist sicherlich die konstitutive Expression von c-myc durch eine von drei bekannten Translokationen des Gens unter die Kontrolle eines der Immunglobulingen-Loci (Young and Rickinson, 2004). Obwohl EBV zum ersten Mal vor über 40 Jahren in Burkitt-Lymphomen detektiert werden konnte und endemische BLs nahezu 100 % EBV-positiv sind, ist bis heute nicht sicher, wie EBV zur Entstehung dieser Lymphome beiträgt. Die EBV-assozierten Lymphome exprimieren meist nur die Gene des Latenztyp I (Carbone et al., 2008; Young and Rickinson, 2004).

### **Hodgkin-Lymphome**

Hodgkin-Lymphome sind eine seltene Lymphomart, die durch maligne, mehrkernige Reed-Steinberg (RS) Zellen gekennzeichnet sind. Charakteristisch für diese Lymphome ist, dass die malignen RS-Zellen nur einen sehr geringen Anteil im Vergleich zum hohen Anteil an eingewanderten Immunzellen darstellen. Je nach zellulärem Subtyp zeigen die Lymphome eine Assoziation mit EBV zwischen 40-80 %, wobei in den EBV-positiven Tumoren aber in jeder RS-Zelle das virale Genom nachweisbar ist. Die EBV-infizierten Zellen exprimieren Gene des Latenztyp II (Kutok and Wang, 2006). Anscheinend gibt es einen Zusammenhang zwischen infektiöser Mononukleose und der späteren Erkrankung an Hodgkin-Lymphomen (HL) unabhängig, ob EBV-positiv oder EBV-negativ. Auch die für HL typischen Reed-

Steinberg Zellen können außerhalb des Hodgkin-Lymphoms nur während der infektiösen Mononukleose beobachtet werden (Kutok and Wang, 2006; Thompson and Kurzrock, 2004).

### **Nasopharynxkarzinome**

Nasopharynxkarzinome (NPCs) sind weltweit eine sehr seltene Tumorart, wohingegen sie in China und Taiwan für 20 % aller Tumorerkrankungen verantwortlich sind und eine der häufigsten Tumore im asiatischen Raum darstellen (Kutok and Wang, 2006). Neben der genetischen Prädisposition wird vermutet, dass auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung dieser Karzinome spielen und in diesem Zusammenhang werden Nitrosamine aus gesalzenem Fisch diskutiert (Poirier et al., 1987; Young and Rickinson, 2004). In undifferenzierten NPCs gibt es eine 100%ige Assoziation mit EBV. Die Tumorzellen exprimieren den Latenztyp II, wobei die Expression von LMP1 nur in etwa 20–35 % aller Fälle und LMP2A in etwa der Hälfte aller Fälle nachweisbar ist (Kutok and Wang, 2006; Thorley-Lawson, 2005; Young and Rickinson, 2004). Die Karzinome entstehen wahrscheinlich nach latenter Infektion von epithelialen Zellen (Thorley-Lawson, 2005).

### **Magenkarzinome**

EBV ist in bis zu 10 % aller Magen-Adenokarzinome nachweisbar. EBV-assoziierte Magenkarzinome sind nicht endemisch und ihr Vorkommen ist gleichermaßen über die ganze Welt verteilt. Ähnlich wie in den NPCs werden auch hier die Gene des Latenztyp II exprimiert, wobei ebenfalls selten LMP1 nachweisbar ist (Young and Rickinson, 2004).

#### **3.1.3. NK/T-Zell Lymphome**

Eine der am stärksten mit EBV-assoziierten Tumorentitäten sind nasale NK/T-Zell Lymphome, hier kann in nahezu allen Lymphomen EBV detektiert werden. Die Assoziation dieser Lymphome mit EBV wurde erstmals 1990 beschrieben (Harabuchi et al., 1990). Es handelt sich um eine sehr seltene, aggressive Erkrankung, die hauptsächlich in asiatischen sowie mittel- und südamerikanischen Ländern auftritt (Aozasa et al., 2008; Coppo et al., 2009; Oshimi, 2007; Rudiger et al., 2007) und in Asien ca. 3-9 % aller malignen Lymphomen ausmacht (Oshimi, 2007). Männer sind

häufiger betroffen als Frauen und die Erkrankung tritt meist im Alter von 50-60 Jahren auf (Oshimi, 2007; Rudiger et al., 2007). Die NK/T-Zell Lymphome des nasalen Typs sind häufig in der nasalen Region zu finden, treten aber auch in verschiedenen extranodalen Bereichen wie im Gastrointestinaltrakt, Haut, Hoden, Leber und Milz auf (Aozasa et al., 2008). Die Patienten leiden häufig an großflächigen Wunden oder zerstörten Bereichen des Gaumens oder des Nasen-Rachenraums, wie deutlich in Abbildung 2 zu erkennen ist (Meneses-Garcia et al., 2008).



**Abbildung 2: Patient mit nasalem NK/T-Zell Lymphom**

Nasales NK/T-Zell Lymphom, welches destruktive, eitrig-eitrige Läsionen des Gaumens mit großflächigen, nekrotischen Flächen zeigt (Meneses-Garcia et al., 2008).

Die Zelllinienzugehörigkeit der nasalen NK/T-Zell Lymphome ist weitgehend unklar. Die meisten Forscher favorisieren einen NK-Zell Ursprung, es gibt aber auch Hinweise, dass es sich um cytotoxische T-Zellen handeln könnte (Suzumiya et al., 1994). Wie es zur EBV-Infektion von NK- oder T-Zellen kommt, ist ebenfalls nicht endgültig geklärt. EBV infiziert B-Lymphozyten durch Wechselwirkung des viralen Kapsids mit dem zellulären Oberflächenrezeptor CD21. Es gibt Veröffentlichungen, die zeigen, dass T-Zellen geringe Mengen CD21 exprimieren und *in vitro* mit EBV infiziert werden können (Kanegane et al., 1996; Tsoukas and Lambris, 1993). NK-Zellen lassen sich hingegen in Abwesenheit des CD21-Rezeptors mit EBV infizieren, wobei der Mechanismus noch unbekannt ist (Isobe et al., 2004). Es könnte sich aber auch um Zellen handeln, die bei der Beseitigung EBV-infizierter Zellen zufällig mit EBV infiziert worden sind (Meijer et al., 1996). Der Nachweis monoklonaler EBV-Episome in nasalen NK/T-Zell Lymphomen spricht auf jeden Fall für eine EBV-

Infektion in den frühen Stadien der Tumorentstehung und deutet stark auf eine ätiologische Rolle von EBV bei diesen Lymphomen hin. Es besteht ein Latenztyp I oder II, wobei sich diese nur in der LMP1-Expression unterscheiden (Chiang et al., 1996; Xu et al., 2001).

Aufgrund der Tatsache, dass es sich dabei um eine seltene Erkrankung handelt und die Lymphome häufig durch fortschreitende, nekrotische Läsionen gekennzeichnet sind, ist meist wenig Tumormaterial vorhanden. Dies erschwert die Forschung erheblich und führt dazu, dass die Onkogenese der Lymphome weitgehend unbekannt ist. Bisher sind deshalb auch nur wenige chromosomale Aberrationen bekannt: Zugewinn auf Chr.2q, Deletionen auf Chr.6q, Chr.1p und Chr.13q (Huang et al., 2010; Jaffe et al., 2003). Außerdem sind oft Mutationen von Rb, p53, p16INK, c-kit und Fas mit den Lymphomen assoziiert (Aozasa et al., 2008; Sugimoto et al., 2002) und verschiedene onkogene Signalwege wie AKT, STAT3 und NFκB aktiviert. Die Expression von cytotoxischen Molekülen wie Granzym B oder Perforin sind mit für die charakteristische Gewebsschädigung (Abbildung 2) verantwortlich (Aozasa et al., 2008; Jaffe et al., 2003).

### 3.2. RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein sequenzspezifischer Mechanismus zur Stilllegung von Genen, welcher durch doppelsträngige RNA vermittelt wird. In den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts stießen Wissenschaftler auf ein zunächst nicht erklärbares Phänomen, als man die Blütenfarbe von Petunien biotechnologisch intensivieren wollte. Das Einführen einer zusätzlichen Genkopie für ein Schlüsselenzym der Farbstoffproduktion resultierte nicht wie erwartet in einer stärkeren Blütenfärbung, sondern in einer schwächeren Färbung bzw. weißen Blüten (Napoli et al., 1990). Dieses Phänomen, bei dem ein endogenes Gen durch eine zusätzlich eingebrachte Kopie gehemmt wird, wurde als Cosuppression bezeichnet.

Bei der Charakterisierung von *C.elegans*-Entwicklungsmutanten entdeckten Biologen 1993 schließlich ein kurzes Transkript namens *lin-4*, welches später als microRNA identifiziert wurde und welches in der Lage war, die Expression von *lin-14* zu inhibieren um so den Zeitpunkt der Entwicklung zu steuern. Es wurde postuliert, dass das Transkript seine Wirkung durch seine teilweise Komplementarität zur 3'UTR von *lin-14* ausübt (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Craig Mello und Andrew Fire konnten 1998 zeigen, dass die Expression von Genen in *C.elegans* durch Einbringen

von doppelsträngiger RNA still gelegt werden kann (Fire et al., 1998). Für diese Entdeckung erhielten sie 2006 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. Ein Jahr nach dieser Entdeckung konnten Andrew Hamilton und David Baulcombe zeigen, dass dieser Effekt durch 21-23 nt lange RNA-Spaltprodukte vermittelt wird (Hamilton and Baulcombe, 1999). Die ursprünglich in Nematoden entdeckten kleinen RNA-Moleküle hatten strukturelle Ähnlichkeiten mit den Spaltprodukten. Man konnte nun zeigen, dass diese RNAs, obwohl sie eine geringere Komplementarität zu ihren Zielstrukturen hatten, auch Gene stilllegen können (Fleisch et al., 2005; Lee et al., 1993; Olsen and Ambros, 1999; Pasquinelli et al., 2000; Reinhart et al., 2000; Wightman et al., 1993). Auch wenn man zu Anfang glaubte, die RNA-Interferenz sei nur auf exogene doppelsträngige beschränkt, weiß man heute, dass Pflanzen und Tiere die verschiedensten endogenen RNAs exprimieren. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Prozessierung werden sie unterteilt in: siRNA (small interfering RNA), miRNA (microRNA) und piRNA (PIWI-interacting RNA). Nach Entdecken der RNAi als Mechanismus zur Regulation der Genexpressionskontrolle, ist das Ziel weiterer Forschung, die durch regulatorische RNAs kontrollierten Genprodukte zu bestimmen, um so die komplexe Regulation von physiologischen Prozessen zu verstehen. Im Folgenden soll auf die Entstehung und Funktion von miRNAs eingegangen werden.

### 3.2.1. microRNAs

Im Jahr 2001 stießen mehrere Arbeitsgruppen auf der Suche nach endogenen RNA-Molekülen, die für den dsRNA induzierten mRNA Abbau verantwortlich sind, auf microRNAs (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). Sie definierten microRNAs als endogene, nicht kodierende RNAs von etwa 22 Nukleotiden Länge, die an der sequenzspezifischen, posttranskriptionellen Genregulation beteiligt sind. Zuvor ging man davon aus, dass diese kleinen RNAs (*lin-4*, *let-7*) in *C.elegans* eine Eigenheit von Nematoden darstellten. Durch Sequenzieren von cDNA Banken verschiedener Organismen konnte jedoch gezeigt werden, dass microRNAs in vielen Organismen vorkommen und hoch konserviert sind.

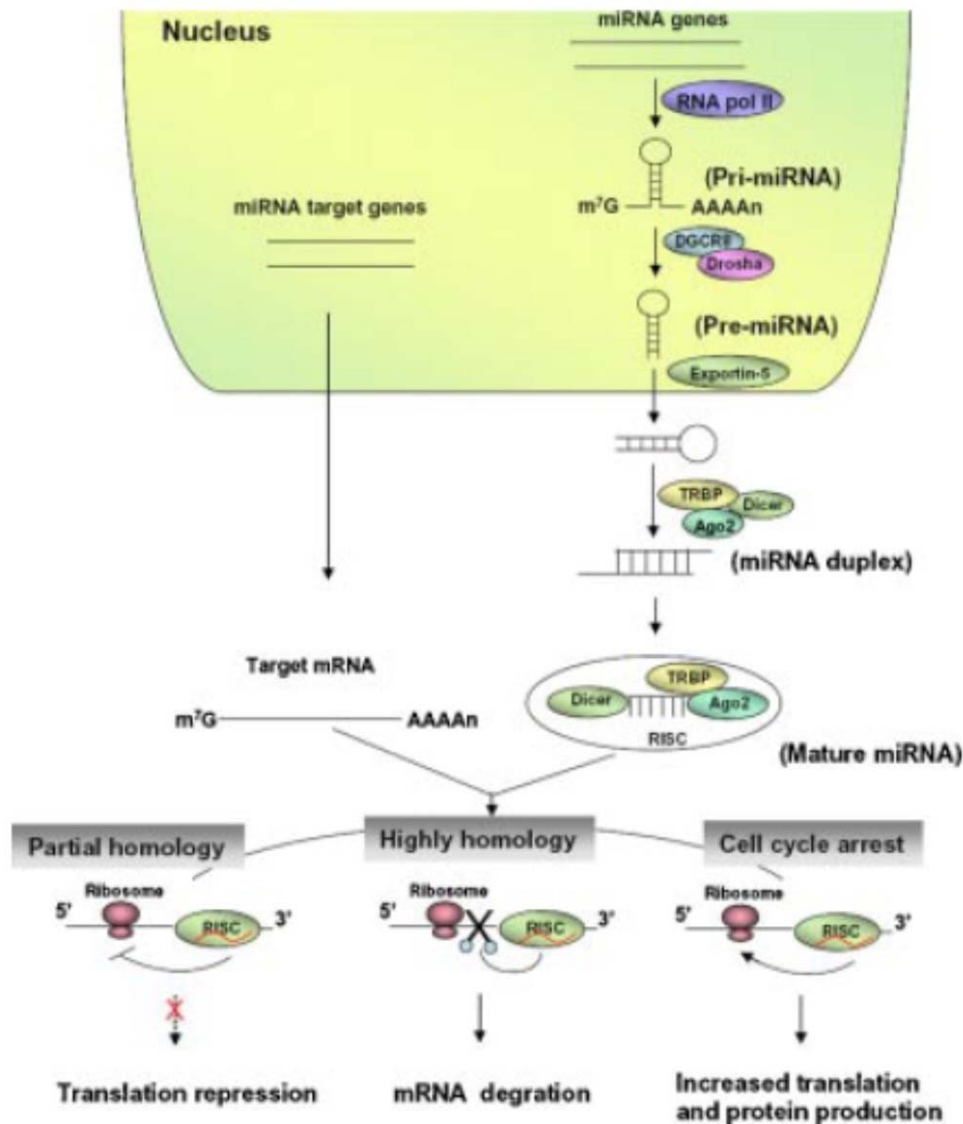
Zurzeit sind 940 verschiedene humane miRNA-Vorläufer bekannt und man geht davon aus, dass rund 3 % aller Gene für miRNAs kodieren (Sen et al., 2009). Viele miRNA-Gene von Säugern haben mehrere Isotypen, die wahrscheinlich auf Gen-

Duplikationen zurückzuführen sind. Oft kodieren miRNAs clusterweise im Genom. Diese werden meist von einem einzigen Transkriptionsstartpunkt aus transkribiert. Manche microRNA-Gene liegen in intergenischen Regionen, die meisten befinden sich jedoch innerhalb von Introns oder Exons Protein-kodierender oder nicht-kodierender Gene (Rodriguez et al., 2004) und werden gemeinsam mit diesen exprimiert.

Abbildung 3 gibt eine Übersicht über die Biogenese von miRNAs. Die Transkription der primären Transkripte (pri-miRNA) erfolgt in den meisten Fällen mit Hilfe der RNA-Polymerase II, während wenige mittels RNA-Polymerase III transkribiert werden. Die Transkripte von RNA-Polymerase II sind bis zu mehreren Kilobasen lang, tragen am 5'-Ende eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe und haben ein polyadenyliertes 3'-Ende (Borchert et al., 2006; Cai et al., 2004; Lee et al., 2004). Die pri-miRNAs haben eine Haarnadelschleifen-Struktur, die von einem ca. 650 kDa großen Mikroprozessorkomplex erkannt und noch im Zellkern zu einem ~ 60-100 nt langen miRNA-Vorläufer (pre-miRNA) mit einem zwei Nukleotid langen Überhang am 3' Ende prozessiert wird. Der nukleäre Mikroprozessorkomplex besteht aus dem RNaseIII-ähnlichen Enzym Drosha sowie dem dsRNA bindenden Protein DGCR8 (Di-George syndrome critical region gene 8) als Kofaktor (Gregory et al., 2004; Han et al., 2004). Die Prozessierung durch Drosha verläuft kotranskriptional und für intronische miRNAs unmittelbar vor dem Spleißen. Der Transport der pre-miRNA aus dem Zellkern ins Cytoplasma erfolgt mit Hilfe von Exportin 5 abhängig von Ran-GTP (Lund et al., 2004; Yi et al.). Im Cytoplasma werden die pre-miRNAs in der Nähe der terminalen Schleife geschnitten und es entsteht ein ~22 nt langer, imperfekter microRNA-Doppelstrang. Diese Prozessierung erfolgt durch einen Komplex aus der RNaseIII Dicer und dem dsRNA bindenden Protein TRBP (immunodeficiency virus transactivating response RNA binding protein) (Grishok et al., 2001; Hutvagner and Zamore, 2002; Ketting et al., 2001).

Der Duplex-Strang mit der schwächeren Basenpaar-Bindung am 5'-Ende stellt die reife microRNA dar und wird durch Rekrutierung von Ago2 in einen Multiproteinkomplex namens RISC (RNA induced silencing complex) inkorporiert, während der andere Strang abgebaut wird (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Der genaue Ablauf der Zusammenlagerung des RISC-Komplexes ist noch nicht genau verstanden, die Argonaut-Proteine stellen jedoch eine essentielle Komponente dar. Der microRNA enthaltende RISC-Komplex wird zur Ziel-mRNA

geleitet, diese wird bei perfekter Komplementarität zwischen microRNA und 3'UTR der mRNA abgebaut und bei imperfekter Komplementarität translational reprimiert (Bartel, 2004; Engels and Hutvagner, 2006). Es gibt aber auch Beispiele von imperfekter Komplementarität zwischen miRNA und mRNA, die ebenfalls in einem mRNA-Abbau resultieren (Bagga et al., 2005). Mittlerweile weiß man, dass es in Zellen, die sich im Zellzyklusarrest befinden, durch miRNAs auch zur verstärkten Translation und Proteinproduktion kommen kann (Vasudevan et al., 2007).



**Abbildung 3: Übersicht über die Biogenese und Funktion von miRNAs (Bi et al., 2009)**

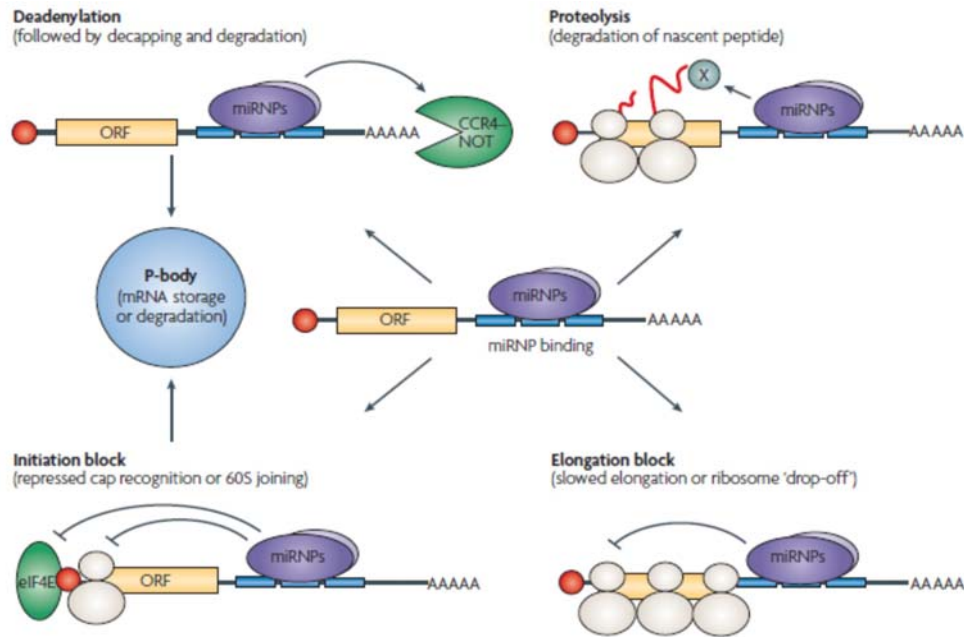
Im Zellkern erfolgt zunächst die Transkription der pri-miRNAs hauptsächlich durch RNA-Polymerase II. Nach der anschließenden Prozessierung des primären Transkriptes zur pre-miRNA durch Drosha, wird diese mittels Exportin 5 ins Cytoplasma transportiert. Die Dicer-vermittelte Prozessierung der pre-miRNAs resultiert in einem ~ 22 nt langen miRNA-Duplex mit je zwei nt-Überhängen an beiden Enden. Die miRNA, mit der schwächsten Basenpaarung am 5'-Ende wird in den RISC-Komplex inkorporiert und die Bindung an die Target-mRNA wird vermittelt, während der andere miRNA-Strang abgebaut wird.



Während zunächst angenommen wurde, dass miRNAs ihre mRNA-Targets durch Binden an ihre 3'UTR regulieren, weiß man inzwischen, dass diese auch mit dem offenen Leserahmen und der 5'UTR interagieren können (Lytle et al., 2007; Tay et al., 2008). MicroRNAs sind meist nur teilweise komplementär zur Sequenz ihrer Ziel-mRNA, wobei die Nukleotide 2-8, die man als Seed-Sequenz bezeichnet, eine kritische Rolle spielen (Doench and Sharp, 2004).

Es sind noch nicht alle Mechanismen der miRNA-gerichteten Repression der mRNA-Translation aufgeklärt, eine Übersicht über tatsächliche und mögliche Mechanismen ist in Abbildung 4 dargestellt (Fabian et al., 2010). Die Proteinsynthese kann an mehreren Stellen blockiert werden. Einerseits kann der miRNA-RISC-Komplex die Translationsinitiation inhibieren, indem der Komplex entweder die Erkennung der 5'-Cap-Struktur des miRNA-Targets hemmt oder die Zusammenlagerung der ribosomalen Untereinheiten zum 80s Komplex stört. Die Repression der Translation kann aber auch in sogenannten Postinitiationsschritten gestört werden. Eine Möglichkeit ist hierbei die Elongationshemmung durch verlangsamte Elongation oder vorzeitige Termination mit anschließendem Ribosomen „Drop-off“. Der molekulare Mechanismus hierzu konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden. Die miRNA-vermittelte Inhibition der Translation kann auch durch Abbaumechanismen erfolgen. Zum einen kann die Deadenylierung von mRNAs und das anschließende Entfernen ihrer 5'-Cap-Struktur im Abbau der mRNAs führen. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass der miRNA-RISC-Komplex zur proteolytischen Spaltung der neu synthetisierten Peptide führt.

Untersuchungen zeigten, dass translational reprimierte mRNAs microRNA-abhängig in sogenannten Prozessierungs- oder P-Bodies der Zelle zur Speicherung oder zum Abbau gelagert werden (Liu et al., 2005). Obwohl bekannt ist, dass P-Bodies Enzyme zum Abbau von mRNAs enthalten, ist es auch möglich, dass die mRNAs aufgrund eines Stimulus wieder der Translationsmaschinerie zugeführt werden (Bhattacharyya et al., 2006).



**Abbildung 4: Mögliche Mechanismen der miRNA-vermittelten posttranskriptionellen Genrepression**

Die mRNA-Translation kann durch mehrere Mechanismen inhibiert werden. Zum einen kann die Translationsinitiation durch Hemmen der 5'-Cap-Erkennung oder der Bildung des 80s Ribosomenkomplex verhindert werden. Die Translationselongation kann ebenfalls durch verlangsamte Elongation oder Ribosomen „Drop-off“ gehemmt werden. Die Deadenylierung von mRNAs und die anschließende Entfernung ihrer 5'-Cap-Struktur kann im Abbau der mRNA resultieren. Auch wenn der Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist, kann der RISC-Komplex ebenfalls zum Abbau der entstehenden Peptide führen (Filipowicz et al., 2008).

Aufgrund der meist nur unvollständigen Komplementarität zwischen microRNA und Ziel-mRNA ist es schwierig, mit Hilfe von bioinformatischen Programmen die richtigen Ziele der jeweiligen microRNAs vorherzusagen. Es hat sich gezeigt, dass die sogenannte Seed-Sequenz (Nukleotide 2-8) eine kritische Rolle für die Funktion der microRNA hat (Lewis et al., 2005). Trotz der bioinformatischen Vorhersage vieler Ziele für eine microRNA können meist nur wenige *in vivo* verifiziert werden. Man geht aber davon aus, dass mehr als 30 % der humanen Gene durch miRNAs reguliert werden (Barbato et al., 2009; Bartel and Chen, 2004; Lewis et al., 2005). Es ist denkbar, dass miRNAs kontextabhängig fungieren, d.h. sie können ihre Funktion nur ausüben, wenn verschiedene microRNAs gleichzeitig an die 3'UTR binden oder wenn RNA-bindende Moleküle an die Sequenz binden können um als Erkennungsfaktoren für microRNAs zu dienen (Rajewsky, 2006).

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass miRNAs in viele biologische Abläufe involviert sind wie Entwicklung, Differenzierung, Zelltod und Wachstum (Chen et al., 2004; Lagos-Quintana et al., 2002; Subramanian and Steer, 2010; Wienholds and Plasterk, 2005). Deshalb ist es auch nicht verwunderlich, dass die

---

Expression von miRNAs in vielen Erkrankungen fehlreguliert ist. Im nachfolgenden Abschnitt soll auf die Rolle von miRNAs bei der Entstehung oder Progression von Krebs eingegangen werden.

### **3.2.2. Die Rolle von miRNAs bei der Entstehung von Krebs**

Calin und Kollegen konnten erstmalig zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen miRNAs und Krebs gibt. Die hemi- und/ oder homozygote chromosomale Deletion des Locus 13q14 stellt in chronisch lymphatischer B-Zell Leukämie die Ursache für die reprimierte Expression oder den Verlust von miR-15a und miR-16-1 dar (Calin et al., 2002). Die Tatsache, dass miRNAs in Zusammenhang mit Tumoren stehen, hat anschließend dazu geführt, dass neue Array- bzw. Sequenzieretechniken entwickelt wurden um die Expression von miRNAs zu untersuchen. Seitdem hatten etliche Studien die Bestimmung der miRNA-Expressionsprofile von Tumoren zum Ziel um den Zusammenhang zwischen der Deregulation von miRNA-Expression und der Tumorentstehung oder –progression zu verstehen.

Die Expression der miRNAs in Tumoren kann aus verschiedenen Gründen verändert sein. Calin und Kollegen konnten zeigen, dass miRNAs oft in genomischen Regionen kodiert sind, die fragil sind oder die ursächlich an der Entstehung von Krebs beteiligt sind (Calin et al., 2004b). Außerdem können natürlich auch epigenetische Mechanismen wie veränderte DNA-Methylierung oder Histonmodifikationen dazu beitragen, dass miRNAs eine veränderte Expression zeigen (Agirre et al., 2009; Saito and Jones, 2006; Ting et al., 2008). Dies ist besonders interessant im Hinblick auf die Tatsache, dass eine große Anzahl von miRNA-Genen mit CpG-Inseln assoziiert sind (Visone and Croce, 2009). Mutationen und Polymorphismen, welche sich in der Sequenz der reifen miRNA oder der pre-miRNA befinden, können ebenfalls eine Rolle spielen, sind aber aufgrund der geringen Größe von miRNAs sehr selten. Auch Defekte in der miRNA-Prozessierungsmaschinerie können Ursache für fehlexprimierte miRNA-Expression sein (Kumar et al., 2007; Newman and Hammond, 2010). So führt z.B. ein Fehler im Drosha-Prozessierungsschritt zur allgemeinen Repression von miRNA-Expression in Primärtumoren (Thomson et al., 2006).

Es hat sich herausgestellt, dass miRNAs sowohl als Onkogene wie auch als Tumorsuppressoren wirken können. Die onkogene Wirkung können amplifizierte oder überexprimierte miRNAs einerseits durch Hemmung von Tumorsuppressoren oder anderen Genen, die Wachstum, Angiogenese oder Invasion hemmen, entfalten. Die

ersten miRNAs, denen eine onkogene Funktion zugeschrieben werden konnte, war das Cluster miR-17-92 und miR-155 (Eis et al., 2005; He et al., 2005). Während miRNAs des Clusters miR-17-92 u.a. die Tumorsuppressoren Bim und p21 als Target haben (Inomata et al., 2009; Xiao et al., 2008), entwickeln Mäuse, die miR-155 spezifisch in B-Zellen überexprimieren, Lymphome (Costinean et al., 2006). Ebenso können Tumorsuppressor-miRNAs, die normalerweise Onkogene oder Gene inhibieren, die förderlich für Wachstum, Angiogenese oder Invasion sind, in Tumoren reprimiert oder sogar deletiert sein. Die ersten und einer der bekanntesten Tumorsuppressor-miRNAs sind miR-15 und miR-16, welche die Expression des Onkogens BCL2 hemmen und deren Expression in chronisch lymphatischer Leukämie reprimiert ist (Cimmino et al., 2005).

### 3.2.3. Virale und EBV-kodierte miRNAs

EBV war das erste Virus, bei dem virale miRNAs gefunden wurden (Pfeffer et al., 2004). Mittlerweile hat man für eine Reihe anderer Viren ebenfalls die Existenz von viruskodierten miRNAs nachweisen können. Herpesviren kodieren für die meisten viralen miRNAs, während andere nukleäre DNA-Viren wie JC- oder BK-Virus meist eine oder zwei miRNAs exprimieren (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Die viralen miRNAs von Säugetier-Viren (Skalsky and Cullen, 2010)**

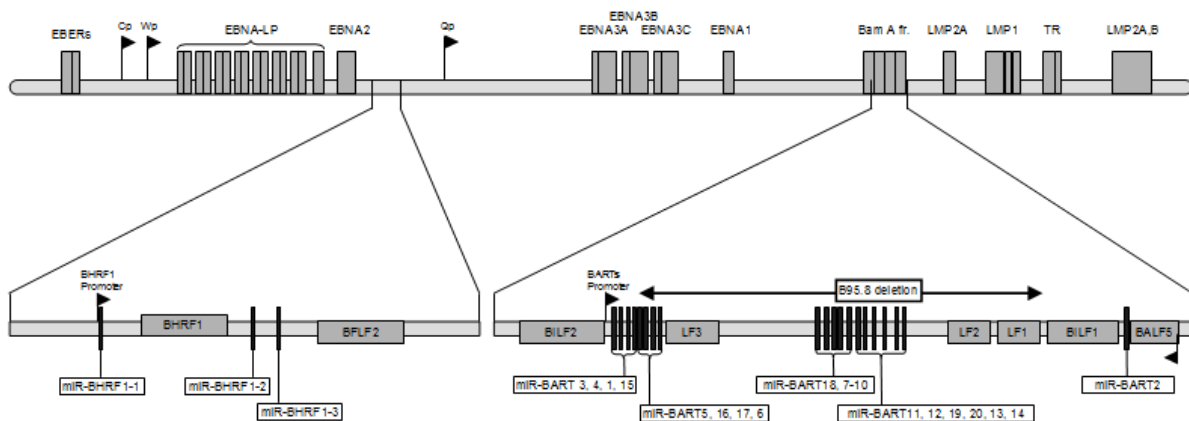
Virus Family	Virus Species	Host	Known miRNAs
$\alpha$ -herpesviruses	HSV-1	Human	8
	HSV-2	Human	6
$\beta$ -herpesviruses	hCMV	Human	11
	mCMV	Murine	18
$\gamma$ -herpesviruses	EBV	Human	25
	rLCV	Simian	33
	KSHV	Human	12
	RRV	Simian	15
Polyomaviruses	MHV68	Murine	9
	polyoma	Murine	1
	SV40	Simian	1
	JCV	Human	1
Adenovirus	BKV	Human	1
	hAV	Human	2

This table lists the number of currently known pre-miRNA stem-loops encoded by each virus listed. BKV, BK virus; hAV, human adenovirus; JCV, JC virus; mCMV, murine cytomegalovirus; MHV68, mouse  $\gamma$ -herpesvirus 68.  
doi:10.1371/journal.ppat.1000787.t001

Die Pockenviren, die zur Gruppe der DNA-Viren gehören und im Cytoplasma replizieren, kodieren anscheinend nicht für miRNAs und die Existenz viraler miRNAs von RNA-Viren ist umstritten (Lin and Cullen, 2007; Omoto et al., 2004). MiRNAs

stellen für Viren besonders interessante, potente, posttranskriptionelle Regulatoren für Wirts- oder Virusgene dar, da sie relativ wenig Platz auf dem viralen Genom benötigen und nicht immunogen sind (Sullivan, 2008; Umbach and Cullen, 2009).

In der ersten Untersuchung zur Identifikation von EBV-miRNAs wurden nur insgesamt fünf miRNAs gefunden, da die meisten der BART-miRNAs in dem verwendeten B95.8 Virusstamm aufgrund einer genomischen Deletion nicht vorhanden sind (Grundhoff et al., 2006). Wie Abbildung 5 zeigt, sind die 25 EBV-miRNAs in drei genomischen Clustern kodiert. Das BHRF1-Cluster kodiert im Bereich des BHRF1-Gens (Bam H1 rightward open reading frame 1), während die beiden BART-Cluster in der Region der BART-Transkripte (Bam HI-A region rightward transcript) kodieren.



**Abbildung 5: Schematische Übersicht über die Lokalisation von Latenzgenen und miRNAs im EBV-Genom**

Die EBV-kodierten miRNAs sind in drei genomischen Clustern kodiert. Im Bereich des BHRF1-Gens befinden sich die BHRF1-miRNAs, während die BART-miRNAs in zwei BART-Clustern von den BART-Promotoren aus transkribiert werden.

Die BART-miRNAs werden gemeinsam auf einem langen BART-Transkript transkribiert und anschließend aus den Introns herausgespleißt (Edwards et al., 2008). Die Expression der viralen miRNAs ist abhängig von Latenztyp und zellulärem Kontext sehr variabel. So exprimieren epitheliale NPC-Zelllinien wesentlich stärker virale miRNAs als B-Zelllinien (Cai et al., 2006; Pratt et al., 2009). Währenddessen findet man nur in Zellen des Latenztyps III eine starke Expression der BHRF1-miRNAs. Im lytischen Zyklus ist die Expression von einigen aber nicht allen EBV-miRNAs induziert (Cai et al., 2006; Xing and Kieff, 2007), was auf eine spezifische Rolle dieser miRNAs bei der Aufrechterhaltung der latenten Infektion bedeuten könnte.

Die Funktion viraler miRNAs ist noch weitgehend ungeklärt, da man bisher nur für manche der miRNAs Targets kennt. Die bisherigen Veröffentlichungen lassen vermuten, dass die viralen miRNAs grundsätzlich zwei Funktionen erfüllen. Zum einen regulieren die viralen miRNAs virale Proteine wie z.B. die virale DNA-Polymerase BALF5 (Barth et al., 2008). Zu den bisher bekannten viralen Targets von EBV-kodierten BART-miRNAs zählen außerdem LMP1 und LMP2A (Barth et al., 2008; Lo et al., 2007; Lung et al., 2009). Obwohl LMP1 das Onkoprotein von EBV darstellt, kann eine übersteigerte Expression auch zur Inhibierung von Wachstum und verstärkter Apoptose führen (Eliopoulos et al., 1996). Außerdem stellen LMP1 und LMP2A virale Antigene für cytotoxische T-Zellen dar. So scheint die Modulierung der Expression viraler Proteine durch virale miRNAs dazu zu dienen die Latenzphase aufrechtzuerhalten und die infizierte Zelle vor Apoptose sowie vor der Entdeckung durch das Immunsystem zu schützen.

Zum anderen hemmen die viralen miRNAs auch zelluläre mRNAs, die eine Rolle bei der Immunantwort spielen und helfen so mit das Immunsystem zum Vorteil des Virus zu modulieren. So hemmt die miRNA BHRF1-3 beispielsweise das T-Zell anlockende Chemokin CXCL11 (Xia et al., 2008) und BART-2 hemmt MICB, ein NK-Zell Ligand, dessen Expression an der Zelloberfläche durch zellulären Stress wie z.B. eine virale Infektion induziert wird (Nachmani et al., 2009). Kürzlich konnte auch IPO7, welches die Produktion des Zytokins IL-6 in Makrophagen der Maus induziert, als Target von BART3 identifiziert werden (Dolken et al., 2010). Die Regulierung von Targets wie PUMA durch BART5 könnte die EBV-infizierte Zelle vor der virus-induzierten Apoptose schützen (Choy et al., 2008). Bisher kann man vermuten, dass die viralen miRNAs der Aufrechterhaltung des Latenztyps und dem Überleben der infizierten Zelle durch Verhindern des Zelltods sowie durch Immunmodulation, die die virusinfizierte Zelle vor dem Immunsystem unentdeckt lässt.

Die Konservierung der Seed-Sequenzen viraler miRNAs fehlt meist (Ghosh et al., 2008; Umbach and Cullen, 2009) und ist wahrscheinlich auf die höhere Mutationsrate oder den evolutionären Druck der Viren sich an die Wirtsbedingungen anzupassen zurückzuführen. Zwischen viralen und zellulären miRNAs gibt es verhältnismäßig wenige Seed-Sequenz Homologien. Eine Ausnahme ist KSHV, welches für eine miRNA kodiert, deren Seed-Sequenz mit der von miR-155 übereinstimmt (Skalsky et al., 2007). Ebenfalls decken sich die Nukleotide 2-7 der EBV-kodierten BART5 mit denen der zellulären miR-18. Betrachtet man im Besonderen die EBV-miRNAs, so

lässt sich feststellen, dass insgesamt 22 der EBV-kodierten miRNAs im Rhesus-Lymphokryptovirus konserviert sind (Cai et al., 2006; Walz et al., 2010). Das deutet darauf hin, dass diese miRNAs wichtige oder einflussreiche mRNA-Targets haben.

Interessanterweise wird MICB von mehreren herpesviralen miRNAs reguliert, von der EBV-kodierten BART2 und der KHSV-kodierten miR-K12-7 (Nachmani et al., 2009). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es zwar kaum Konservierung hinsichtlich der herpesviralen miRNA-Sequenzen gibt, aber anscheinend eine funktionelle Konservierung der Zielstrukturen viraler Herpesvirus-miRNAs existiert (Nachmani et al., 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass EBV nicht nur für virale miRNAs kodiert sondern auch in der Lage ist, die Expression von zellulären miRNAs zu verändern (Cameron et al., 2008; Motsch et al., 2007; Mrazek et al., 2007). Während LMP1 über die Aktivierung von NF $\kappa$ B die Expression von miR-146a sowie miR-155 induziert, reprimiert EBNA1 die Expression von miR-200a sowie miR-200b durch einen bisher unbekanntem Mechanismus (Motsch et al., 2007; Shinozaki et al., 2010). Die Induktion von miR-155 trägt dazu bei, die anhaltende Aktivierung von NF $\kappa$ B durch LMP1 abzuschwächen und die viralen Genome in latent infizierten Zellen beizubehalten (Lu et al., 2008). Die beiden miRNAs miR-200a und miR-200b hemmen den transkriptionellen Repressor ZEB1 (Gregory et al., 2008; Hurteau et al., 2007; Korpál et al., 2008; Park et al., 2008), der wiederum einen negativen Einfluss auf das lytische Protein BZLF1 hat (Kraus et al., 2003). Somit dient die Repression von miR-200a und miR-200b durch EBNA1 wahrscheinlich der Inhibierung von BZLF1 und somit der Aufrechterhaltung der latenten Infektion.

### **3.3. Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit**

Das Epstein-Barr Virus ist als Tumorstoff wie bereits erwähnt mit einer Vielzahl von Tumorerkrankungen assoziiert. Bisher kennt man aber in den meisten Fällen den tatsächlichen Beitrag des Virus zur Entstehung der Tumore nicht. Neben den viruseigenen Proteinen wie LMP1, die eine Rolle in der Transformation spielen, kodiert das Virus für virale miRNAs und verändert die Expression zellulärer miRNAs. Da miRNAs in Zusammenhang mit Krebs stehen und als Onkogene bzw. Tumorsuppressoren an der Entstehung oder Progression von Tumoren beteiligt sind, ist es denkbar, dass virale, sowie durch EBV regulierte zelluläre miRNAs zur Tumorigenese beitragen. Es gibt bereits mehrere Veröffentlichungen, welche die

---

Expression von zellulären miRNAs und bzw. oder viralen miRNAs in EBV-assoziierten Tumoren, wie Nasopharynxkarzinomen untersucht haben (Cosmopoulos et al., 2009; Zhu et al., 2009b). Diese zeigten, dass sich die miRNA-Expression von EBV-assoziierten Tumoren und die von Normalgewebe bzw. EBV-negative Tumoren unterscheiden.

Da zu Beginn dieser Arbeit nichts über die Expression zellulärer oder viraler miRNAs in nasalen EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen bekannt war, sollte ein miRNA-Expressionsprofil dieser Lymphome erstellt werden. Um den Einfluss von EBV in diesen Lymphomen analysieren zu können, sollte ebenfalls die miRNA-Expression in Normalgewebe (Thymus) und EBV-negativen T-Zell Lymphomen untersucht werden. Der Vergleich sollte Aufschluss über die Fehlregulation von zellulären miRNAs durch EBV geben. Anschließend sollten für diese fehlregulierten miRNAs Targets identifiziert werden um herauszufinden, ob bzw. wie diese miRNAs möglicherweise zur Tumorentstehung oder –progression beitragen.

Außerdem sollten in einem Teilprojekt zelluläre Ziel-mRNAs für EBV-kodierte miRNAs identifiziert werden. Mit Hilfe von Immunpräzipitation der RISC-Komplexe aus EBV-infizierten und uninfizierten B-Zelllinien wurden zunächst mRNAs bestimmt, die in diesen Zelllinien unterschiedlich stark durch miRNAs reguliert wurden. Diese präzipitierten mRNAs sollten als mögliche zelluläre Ziel-mRNAs viraler miRNAs verifiziert werden.



## 4. Material

### 4.1. Geräte

Blotkammern	LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit (Stratagene; Semi-Dry Blot)
Durchflusszytometer	FACScan™ von Becton Dickinson BD
Luminometer	Lumat LB 9501, Berthold Technologies GmbH & Co.KG
Nucleofector	Nucleofector® Technology von Amaxa
PCR-Maschine	Peltier Thermal Cycler 200 der Firma MJ Research Light Cycler 1.5 (Roche)
Phosphoimager	Phosphoimager™-Typhoon von Molecular Dynamics (Amersham)
Photometer	Pharmacia Biotech Ultraspec 3000 NanoDrop™ 2000c der Firma PEQLAB
Platereader	Victor X™ (Perkin Elmer)
Ultraschallgerät	Bronson Sonifier 250
UV-Dokumentation	ChemiDoc™ XRS+ der Firma Biorad
Zellzähl-Gerät	CASY™-Counter, Schade Systems
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0 R (mit Kühlung) Heraeus Picofuge (Tischzentrifuge ohne Kühlung) Sigma 202 MK (Tischzentrifuge mit Kühlung)

### 4.2. Chemikalien, Membranen, Reagenzien

Acrylamid	Serva
Agarose	Invitrogen
Amidoschwarz	Sigma
APS	Serva
Ampicillin (Binotal™)	Bayer
Bactoagar	DIFCO
Bisacrylamid	Serva
Bromphenolblau	Serva
Bovines Serumalbumin	New England Biolabs
CASYton	Innovatis

---

Cell Line Nucleofector <sup>®</sup> Kit V	Lonza
DMSO	Sigma
Dual-Luciferase Reporter <sup>®</sup> Assay System	Promega
EDC	Sigma
EDTA	Serva
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH
Gamma- <sup>32</sup> P-ATP(3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytik
Glycin	Serva
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma
Hybond <sup>™</sup> -N+ Membran	Amersham
Hyperfilm ECL <sup>™</sup>	Amersham
IL1A Duo Kit	R&D Systems
Imidazol	Sigma
Interleukin 2	Novartis
IPTG	Novagen
Isopropanol	Roth
Kb plus Leiter	Invitrogen
LightCycler FastStart DNA Master PLUS SYBRGreen I-Kit	Roche
Luciferase Assay System	Promega
Lysing solution	BD Bioscience
Magermilchpulver	Töpfer
3-Mercapto-1,2-propandiol	Sigma
Metafectene	Biontex
Nanofectin	PAA Laboratories GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Nitrocellulosemembran (Protran <sup>™</sup> )	Schleicher&Schuell
NucleoBond	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract <sup>™</sup>	Macherey-Nagel
Nukleotide (dNTPs)	Sigma
Nukleotide (NTPs)	Invitrogen
Paraformaldehyd	Sigma

PeqGOLD TriFast™	PEQLAB
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories
pGEM®-T	Promega
Poly(A) tailing kit	Ambion
PonceauS™	Sigma
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
Röntgen-Fixier-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
Saponin	Sigma
SequaGel® Sequencing System	National Diagnostics
SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen
Taq DNA-Polymerase, dNTPack 5 U/μl	Roche
TEMED	Serva
Trifast™	PEQLAB
Tris	Serva
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH
X-Gal	Sigma
Zellulosefilter Whatman™ #1	Herolab (Maidstone, USA)

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

#### 4.3. 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	50 mM
Blockingpuffer	:	Magermilchpulver in PBS-Puffer	5 % (w/v)

---

50x Denhardt's Solution	:	Albumin fraction V	1 %
		Polyvinylpyrrolidon K30	1 %
		Ficoll 400	1 %
dNTPs	:	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 10 mM
ECL-Lösung A	:	Luminol in DMSO	250 mM
ECL-Lösung B	:	p-Coumarsäure in DMSO	90 mM
ECL-Lösung C	:	Tris HCL pH 8.5	1 M
ECL-Lösungs-Mix	:	Lösung A	2,5 ml
		Lösung B	1,13 ml
		Lösung C	2 ml
		ad 250 ml H <sub>2</sub> O	
ELISA-Reagenzverdünner	:	BSA in PBS-Puffer	1 %
ELISA-Substratlösung	:	TMB	0,1 mg/ml
		Zitronensäure	24 mM
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	51 mM
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,006 %
ELISA-Waschpuffer	:	Tween <sup>®</sup> 20 in PBS-Puffer	0,05 %
Entfärbelösung	:	Isopropanol	10 % (v/v)
		Essigsäure	10 % (v/v)

---

Ethidiumbromidlösung	:	Ethidiumbromid In H <sub>2</sub> O	10 mg/ml
FACS-Fix	:	Paraformaldehyd in PBS-Puffer, pH 7.5	2 %
Hybridisierungspuffer	:	20x SSC 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 % SDS 50x Denhardt's Solution Sonicated Salmon sperm DNA	7,5 ml 0,6 ml 21,0 ml 0,6 ml
MgCl <sub>2</sub>	:	(2 M) MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , sterilfiltrieren	20,33 g 24,65 g
PBS	:	NaCl KCl MgCl <sub>2</sub> CaCl <sub>2</sub> Na-K-Phosphat	140 mM 25 mM 0,5 mM 1 mM 10 mM
PBS (ohne Mg <sub>2+</sub> und Ca <sub>2+</sub> ) (Zellkultur)	:	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Ad pH 7.4	8,0 g/l 0,2 g/l 2,9 g/l 0,2 g/l
S1-Puffer	:	Tris-HCl EDTA RNase A ad pH 8.0	50 mM 10 mM 100 µg/ml
2x Sample-Buffer	:	Tris-HCL (pH 6.8)	130 mM

		SDS	6 % (w/v)
		3-Mercapto-1,2propandiol	10 % (v/v)
		Glycerol	10 % (w/v)
		Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
20x SSC-Puffer (Stammlösung)	:	NaCl	3 M
		tri-Natriumcitrat-2-hydrat	0,3 M
Sammelgelstock	:	Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
		SDS	0,4 % (w/v)
SDS-Laufpuffer	:	Tris-HCl	0,025 M
		SDS	0,1 % (w/v)
		Glycin	0,2 M
SOB-Medium	:	Trypton	20,0 g
		Hefe-Extrakt	5,0 g
		NaCl	0,6 g
		KCl	0,5 g
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , autoklaviert	
		Zugabe von 20 mM MgCl <sub>2</sub> direkt vor Gebrauch	
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)
		Zugabe von 0,5 mg/ml Lysozym direkt vor Gebrauch	
Stop Lösung	:	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 N
TAE-Puffer 50x	:	Tris	2 M
		Natriumacetat	25 mM

		EDTA	0,5 M
TBE-Puffer 10x	:	Tris	89 mM
		Borsäure	89 mM
		EDTA	2 mM
		ad pH 7.8 mit Essigsäure	
TE-Puffer	:	Tris-HCL	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)
Transformations-Lösung 1	:	RbCl	0,10 M
		MnCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	0,05 M
		CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,01 M
		CH <sub>3</sub> COOH (pH 7)	0,03 M
		Glycerol	15,0 % (v/v)
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , sterilfiltriert	
		ad pH 5.8 mit 0,2 M CH <sub>3</sub> COOH	
Transformations-Lösung 2	:	MOPS (pH 6.8)	0,500 M
		RbCl	0,010 M
		CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	0,075 M
		Glycerol	15% (v/v)
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , sterilfiltriert	
Trenngelstock	:	Tris-HCl pH 8.8	1,5 M
		SDS	0,4 % (w/v)

#### 4.4. Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche Applied Science
DNaseI (amplification grade)	Invitrogen
<i>Klenow</i> Fragment	Fermentas
Lysozym aus Hühnereiweiß	Boehringer
<i>Pfu</i> -Polymerase	Promega
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
T7-Polymerase	New England Biolabs
<i>Taq</i> -Polymerase	Sigma

#### 4.5. Größen- und Molekulargewichtsmarker

##### 4.5.1. DNA-Größenstandard

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte durch den 1 kb Plus Marker (Invitrogen) anhand DNA-Fragmente folgender Größen: 12000, 11000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1650, 1000, 850, 650, 500, 400, 300, 200, 100 bp.



Abbildung 6: 1 kb Plus DNA-Leiter (Quelle: Invitrogen)

##### 4.5.2. Protein-Molekulargewichtsmarker

Zur Bestimmung der Molekulargewichte von Proteinen bei der SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese) wurde ein „Low Molecular Weight Marker“ eingesetzt, welcher folgende Proteine (von Sigma bezogen) in angegebener Konzentration enthielt:



Phosphorylase b	94	kDa	0,5 mg/ml
Kälberserumalbumin	67	kDa	0,7 mg/ml
Ovalbumin	43	kDa	1 mg/ml
Carboanhydrase	30	kDa	0,5 mg/ml
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	20,1	kDa	1 mg/ml
Lactalbumin	14,4	kDa	0,5 mg/ml

#### 4.6. Antikörper

In dieser Arbeit wurden folgende Antikörper eingesetzt:

- anti-human-IL1A für Western Blot (R&D, Clone 4414, Maus) 1 µg/ml
- anti-human-β-Aktin (Sigma, Maus) 1:5000
- anti-human-BCL6 (Santa Cruz, Maus) 1 µg/ml
- anti-Ratte Meerrettichperoxidase-gekoppelt 1:5000
- anti-Maus Meerrettichperoxidase-gekoppelt 1:5000
- anti-human-IL1A-PE für FACS (Becton Dickinson Pharmingen, Maus) 10 µl
- anti-human-IgG1-PE für FACS (Beckman Coulter, Maus) 10 µl

#### 4.7. Patientenmaterial

Alle Gewebe wurden am Institut für klinische Pathologie am Universitätsspital Zürich nach den Richtlinien der ethischen Kommission des Kantons Zürich asserviert und für diese Studie zur Verfügung gestellt. Eine genauere Beschreibung der verschiedenen Fälle kann der Tabelle 3 entnommen werden.

**Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben**

	B-No	I-No	sex	date of birth	DG	special		EBV	latency type
T-CL EBV+	B 2005.22438	I2005.337	m	29.09.1931	NK/T nasal		nose	pos	I+II
T-CL EBV+	B1996.16772	I1996.293	f	11.03.1928	T-nasal NOS	ev review	nose	pos	I
T-CL EBV-	B2006.4930	I06.12	m	23.03.1981	T-LBL		mediastinum	neg	
T-CL EBV-	B2006.11047	I06.17							
T-CL EBV-	B2006.33199	I06.167	f	19.11.1986	ALK+ALCL		in cervical	neg	
T-CL EBV-	B2006.34318	I06.467	m	08.02.1959	ALK-ALCL	only cytologic	in axila	neg	
T-CL EBV-	B2006.34318	I06.478	m	25.06.1944	peripheral T-NHL NOS	kleinzellig	in groin	neg	

---

## 4.8. Zelllinien

### 4.8.1. Adhärente Zelllinien

293T: Leitet sich von einer humanen embryonalen Nierenzelllinie (HEK293) ab, die ursprünglich mit dem Adenovirus 5 transformiert wurde. Die zusätzliche Expression des SV40 Large T-Antigens in 293T-Zellen ermöglicht die Expression von episomalen Plasmiden mit dem „SV40 origin of replication“ (Shein and Enders, 1962; Zur Hausen, 1967)

HaCaT: Eine *in vitro* spontan immortalisierte, humane Keratinozyten-Zelllinie aus histologisch normaler Haut (Boukamp et al., 1988).

### 4.8.2. Suspensionszellen

NK-92: EBV-negative NK-Zelllinie, die sich von einem malignen Non-Hodgkin-Lymphom ableitet (Gong et al., 1994; Mazda and Kishida, 2009). (Zur Verfügung gestellt von Dr.Tonn, Frankfurt)

NK-YS: Eine NK-Zelllinie, die aus einem EBV-positiven, nasalen, angiozentrischen NK-Zell Lymphom (Tsuchiyama et al., 1998) etabliert wurde. (Zur Verfügung gestellt von Dr.Tsuchiyama, Okayama, Japan)

SUP-T1: Die EBV-negative T-Zelllinie stammt von einem humanen T-Zell-lymphoblastischen Lymphom ab (Smith et al., 1984). (Zur Verfügung gestellt von Dr.Buger, Kiel)

HANK-1: EBV-positive NK-Zelllinie, die aus einem NK-Zell-Lymphom des nasalen Typs etabliert wurde (Kagami et al., 1998). (Zur Verfügung gestellt von Dr.Kagami, Nagoya, Japan)

Jijoye: EBV-Typ 2 positive Burkitt-Lymphom-Zelllinie, die aus Tumormaterial eines afrikanischen Patienten stammt (Hinuma and Grace, 1967).

- BL41: EBV-negative B-Zelllinie, etabliert aus dem Tumorgewebe eines Patienten mit Burkitt-Lymphom (Lenoir et al., 1985).
- BL41-B95.8: Diese Zelllinie wurde durch Infektion der EBV-negativen Burkitt-Lymphom-Zelllinie BL41 mit dem EBV-Typ 1 Stamm B95-8 etabliert (Lenoir et al., 1985).

## 4.9. Nährmedien

### 4.9.1. Bakterien

Bakterien wurden in 2,5 % (w/v) zuvor autoklaviertem LB-Medium (Luria Broth Base (GIBCO)) kultiviert. Das Ausstreichen von Bakterien erfolgte auf Agarplatten. Dazu wurde 3,75 % (w/v) Luria's Agar (GIBCO) autoklaviert, in Petrischalen gegossen und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Selektion transformierter Bakterien erfolgte durch Zugabe von Ampicillin (0,1 % [w/v]) bzw. Kanamycin (30 µg/ml) je nach Resistenzgen des zu transformierenden Plasmids.

### 4.9.2. Kulturmedien für Säugerzellen

- DMEM: Die Kultivierung von 293T-Zellkulturen erfolgte in "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (PAA), welches mit 10 % fötalem Kälberserum und einem "4er Antibiotikum" aus 40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat versetzt wurde.
- Zur Kultivierung von HaCaT-Zellen wurde DMEM mit je 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA) und Natriumpyruvat (PAA) versetzt.
- RPMI 1640: RPMI 1640-Medium (PAA) wurde zur Kultivierung der Suspensionszelllinien Jijoye und SUP-T1 verwendet. Das Medium wurde ebenfalls durch die Zugabe von 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und einem aus 40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat bestehenden Antibiotika-Gemisch ergänzt.

- X-Vivo: NK-92 Zellen wurden in X-Vivo Medium (Lonza) gehalten. Dieses wurde durch 5 % humanes Frischplasma und 1 % Penicillin/Streptomycin ergänzt. Beim Passagieren der Zellen wurden zusätzlich 500 U/ml humanes, rekombinantes Interleukin-2 (Novartis) ins Medium gegeben.
- IMDM: NK-YS Zellen wurden in „Iscove's Modified Dulbecco's Medium“ (IMDM) kultiviert, welches mit 10 % FKS und 1 % Kanamycin (PAA) versetzt war. Dem Medium wurde während der Subkultivierung ebenfalls 100 U/ml humanes, rekombinantes Interleukin-2 (Novartis) zugesetzt.
- MEM+RPMI: HANK-1 Zellen werden normalerweise in COS-Medium (CosmoBio, Japan) kultiviert. Da dieses Medium aber für Deutschland nicht käuflich zu erwerben ist, wurde eine 1:1 Mischung aus „Minimal Essential Medium“ (Invitrogen) und RPMI 1640 (PAA) verwendet. Diesem Mediumgemisch wurde weiterhin 5 % humanes Frischplasma, 1x Insulin-Transferrin-Selen-X-Supplement (GIBCO), 40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat sowie 50 µg/ml Streptomycinsulfat zugesetzt.

#### 4.10. Bakterienstämme

- E.coli*pMOSBlue: Diese Bakterien stammen aus dem „pMOSBlueT-Vektor“ Kit der Firma Amersham. Sie wurden zur Vermehrung rekombinanter DNA bei der Klonierung eingesetzt.

#### 4.11. Vektoren

##### 4.11.1. pGEM-T

Der pGEM-T<sup>®</sup> Vektor entstand durch einen *EcoR* V-Restriktionsverdau des Vektors pGEM<sup>®</sup>-5Zf (+) (Promega, Madison/Wsc.; USA) und anschließender Ligation von je einem 3'-terminalen Thymidin. Dieses Thymidin verhindert zum einen die Rezirkularisierung des Vektors und stellt zum anderen einen kompatiblen Überhang

zur Klonierung von PCR-Produkten mit Adenin-Überhang dar. Der high-copy-number pGEM<sup>®</sup>-T Vektor kodiert für den Selektionsmarker Ampicillin und verfügt über T7- und SP6-RNA-Polymerase-Promotoren, die eine multiple Klonierungsstelle innerhalb der für das Peptid  $\beta$ -Galaktosidase kodierenden Region flankieren (Abbildung 7). Da das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen durch Ligation von Inserts zerstört wird, ist es möglich, inserthaltige Klone über Blau-Weiß-Selektion von insertlosen zu unterscheiden.

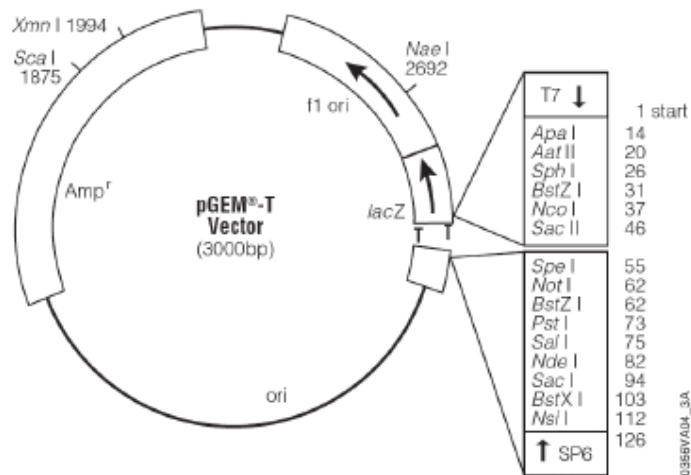


Abbildung 7: pGEM-T Vektor der Firma Promega zur Zwischenklonierung von PCR-Produkten (Quelle:Promega)

#### 4.11.2. pSG5

Der eukaryotische Expressionsvektor pSG5 (Stratagene) kann zur *in vitro* und *in vivo* Expression eingesetzt werden und zählt zu den high-copy-number Plasmiden. Der SV40-Replikationsursprung, das  $\beta$ -globin-Intron und das SV40-Polyadenylierungssignal sorgen für eine effiziente Expression in eukaryotischen Zellen. Weiterhin weist der Vektor einen bakteriellen Replikationsursprung zur autonomen Replikation im prokaryotischen System sowie einen Replikationsursprung aus dem filamentösen Phagen f1 auf, welcher die Erzeugung von Einzelstrang-DNA ermöglicht. Die Selektion in Bakterien wird durch ein Ampicillinresistenzgen gewährleistet und zur Klonierung können die Schnittstellen *EcoR* I, *BamH* I bzw. *Bgl* II der „multiple cloning site“ verwendet werden.

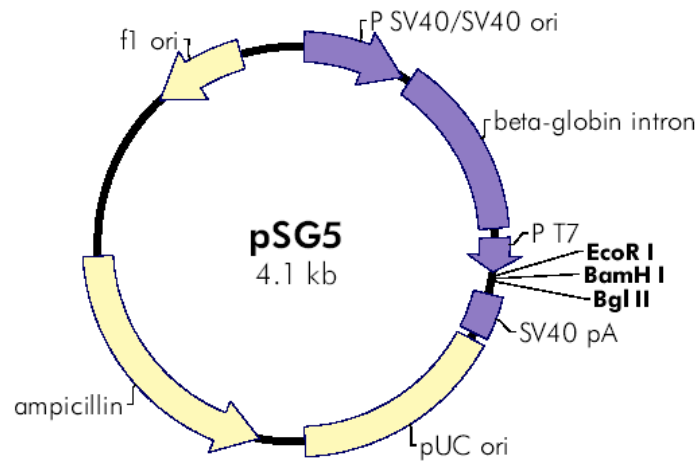


Abbildung 8: Vektorkarte von pSG5 (Quelle: Stratagen)

#### 4.11.3. pEGFP-C1

Durch Transfektion des Vektors pEGFP-C1 (Clontech) wird EGFP transient oder stabil durch Kanamycin-/ Neomycin-Selektion in Zellen exprimiert. Der Vektor ermöglicht die Herstellung von GFP-Fusionsproteinen durch Klonieren einer spezifischen Sequenz in die MCS. Er kodiert für eine Variante des *wt*-GFP mit verbesserten Fluoreszenz- und Expressionseigenschaften. Durch Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm kann die maximale Emission des EGFP-Chromophors bei 507 nm fluoreszenzmikroskopisch oder durchflußcytometrisch gemessen und somit z.B. die Transfektionsrate bestimmt werden.

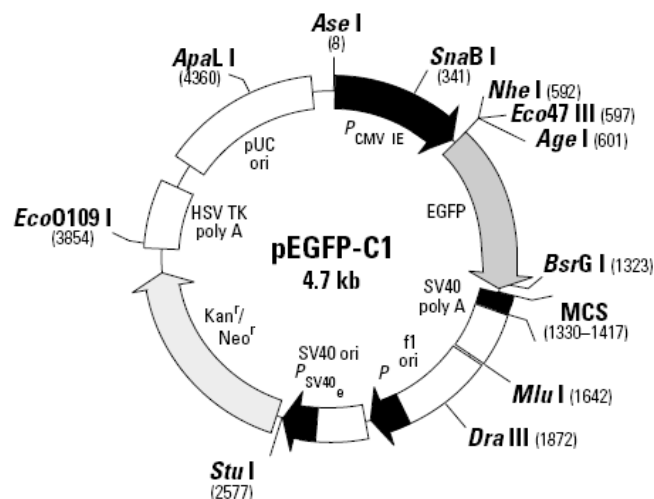


Abbildung 9: Vektorkarte von pEGFP-C1 (Quelle: Clontech)

#### 4.11.4. pMIR-REPORT™

Der eukaryotische Reportervektor pMIR-REPORT™ (Ambion) ermöglicht die Analyse von miRNA-Effekten auf ihre Ziel-mRNAs. Dies wird durch das Klonieren einer spezifischen 3'UTR-Sequenz hinter das Firefly-Luciferase-Gen ermöglicht.

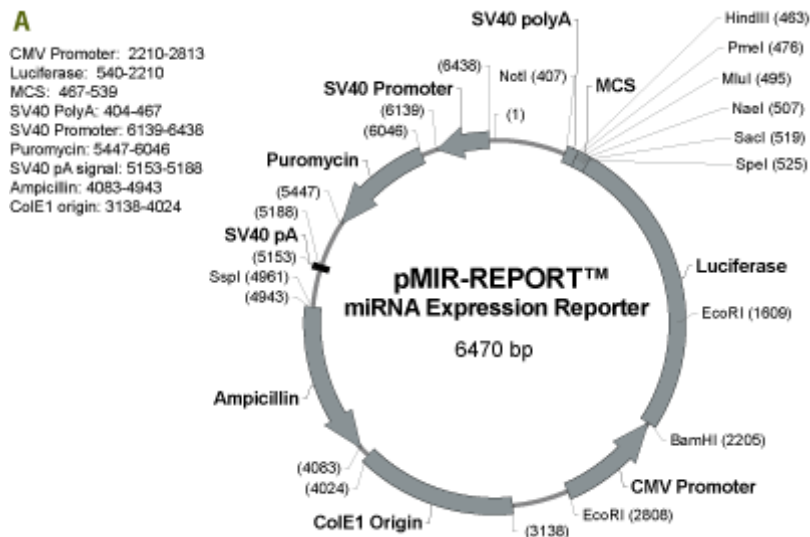


Abbildung 10: Schematische Darstellung des pMIR-REPORT™ (Ambion)

Der in dieser Arbeit häufig eingesetzte Reportervektor pMIR-RNL-TK entspricht nicht dem Originalvektor pMIR-REPORT™. Dieser wurde von der Arbeitsgruppe Meister (Max-Planck-Institut, Martinsried) modifiziert, indem zusätzlich das Gen für die Renilla-Luciferase unter der Kontrolle eines TK-Promoters in den Vektor kloniert wurde. Diese Veränderung ermöglicht neben der Untersuchung von miRNA-Effekten zusätzlich eine interne Normalisierung um Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen verschiedenen Ansätzen auszugleichen.

#### 4.11.5. Vollängen-cDNA-Klone

IL1A-cDNA: Vollängen-cDNA von IL1A inklusive 5'UTR und 3'UTR im eukaryotischen Expressionsvektor pCMVSPORT6 (imaGenes, IRATp970A129D).

IL1R1-cDNA: Vollängen-cDNA-Klon der sowohl die kodierende als auch die nicht-kodierende Sequenz von IL1R1 im Vektor pCMV6-XL4 aufweist (OriGene).

---

BCL6-cDNA: Der Vektor pBluescriptR enthält die Vollängen-cDNA von BCL6 (imaGenes, IRATp970E0865D).

#### 4.11.6. miRNA-Expressionsplasmide

Alle humanen miRNA-Expressionsplasmide wurden aus humaner, genomischer DNA aus Blut, die EBV-miRNAs aus genomischer MABA-DNA amplifiziert. Um eine Expression bzw. Prozessierung der miRNAs zu gewährleisten mussten neben der miRNA-Vorläufer-Sequenz zusätzlich rechts und links mindestens 100 bp kloniert werden. In dieser Arbeit wurden folgende von Dr. Stephanie Barth hergestellten EBV-miRNA-Expressionskonstrukte verwendet:

BART2: Die genomische Vorläufersequenz, sowie 82 bp upstream und 96 bp downstream wurden amplifiziert und in den eukaryotischen Expressionsvektor pSG5 kloniert (Barth et al., 2008).

BART8-11: Insgesamt 1007 bp der genomischen EBV-Region, welche die miRNA Vorläufer von BART8, BART9, BART22, BART10 und BART11 enthält, wurden amplifiziert und in den Expressionsvektor pSG5 kloniert.

BART6-16: Dieses pSG5-Expressionskonstrukt trägt ein 529 bp großes Insert, welches die genomische EBV-Sequenz der Vorläufermoleküle von BART16, BART17 und BART6 umfasst.

BART12-14: Das Expressionskonstrukt für BART12-14 wurde durch Klonierung der 994 bp großen, genomischen EBV-Region, die für BART12, BART19, BART20, BART13 und BART14 kodiert, hergestellt.

BART21+18: Das Amplifikat der genomischen Sequenz, die für BART21 und BART18 kodiert, war 711 bp groß und wurde ebenfalls in pSG5 kloniert.



In Tabelle 4 sind alle selbst hergestellten Expressionsplasmide für miRNAs dargestellt, einschließlich der verwendeten Schnittstellen, Primer und der daraus resultierenden Amplifikatgröße.

**Tabelle 4: Übersicht über die klonierten miRNA-Expressionskonstrukte einschließlich der zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide**

miRNA	Primername	Oligosequenz	Schnittstellen	Größe
miR-142	5'miR142_eco 3'miR142_bam	5'-GGAATTCGGGATCTTAGGAAGCCACA-3' 5'-CGGGATCCATGGAGGCCTTTCAGGCAT-3'	EcoR I BamH I	314 bp
miR-205	5'miR205_Eco 3'miR205_Bam	5'-GGAATTCGGGTAGGAGTATTCAGGTCC-3' 5'-CGGGATCCTCCCTCTGAAGAAGCACGCA-3'	EcoR I BamH I	416 bp
miR-125a	5'miR-125a_Eco 3'miR-125a_Bam	5'-CGGAATTCCTGGCTCTCAGAATGTCTC-3' 5'-CGGGATCCGCCATCGTGTGGGTCTCAA-3'	EcoR I BamH I	356 bp
miR-181b	5'miR-181b-1_Bam 3'miR-181b-1_BglII	5'-GCGGATCCCAACGCTGTCCGGTGTGATT-3' 5'-CAGATCTGCATGGGTGCTGAGGTCCT-3'	BamH I Bgl II	577 bp
miR-181a	5'miR-181a-1 Bam 3'miR-181a-1BglIII	5'-GCGGATCCTGTGATGTGGAGGTTTGCC-3' 5'-GCAGATCTAGTGAGCTTGTCCACACAG-3'	BamH I Bgl II	427 bp
miR-17 Cl	5'miR-17Cl EcoRI 3'miR-17Cl BamHI	5'-GGGAATTCCTGTCTAAATGGACCTC-3' 5'-GGGATCCACAGCATTGCAACCGATCCCAA-3'	EcoR I BamH I	926 bp
miR-106a Cl	5'miR-106aCl Eco 3'miR-106aCl Bam	5'-GCGAATTCGCTTAGACTCTGTAAGCC-3' 5'-GGGATCCTACGCTGAAATGCAAACCTGC-3'	EcoR I BamH I	1300 bp
miR-106b	5'miR-106b EcoRI 3'miR-106b BamHI	5'-GCGAATTCCTGGTAAGTGCCCAAATTGCTGG-3' 5'-GGATCCAGCACAGGATCTAGGACACATG-3'	EcoR I BamH I	408 bp
pot.miR- 27	5'potmir-27.Eco 3'potmir-27.BglIII	5'-GCGAATTCCTGGAGCTCATGAAGAGACCAAG-3' 5'-GGAAGATCTAGGACAGTCTGTGTCCTCAG-3'	EcoR I Bgl II	504 bp
pot.miR- 34	5'potmir-34.Eco 3'potmir-34.Bam	5'-GCGAATTCCTGCTGTGTGAGAAAGGCTTCAC-3' 5'-GCGGATCCTGGGCATTCTTTCATCCCATC-3'	EcoR I BamH I	577 bp
pot.miR- 42	5'potmir-42.Eco 3'potmir-42.Bam	5'-GCGAATTCCTGCTGTATTCTCTTCTGGC-3' 5'-GGATCCCTGCTTTGAGAGTTCCTGAGT-3'	EcoR I BamH I	417 bp
BART6	5'BART6 EcoRI 3'BART6 BamHI	5'-GCGAATTC CTTAGTGGGACGCAGGC-3' 5'-CGGGATCCGCCAGGCTTCTATGCCTG-3'	EcoR I BamH I	230 bp
BART16	5'BART16 EcoRI 3'BART16 BamHI	5'-CGGAATTC AAGTGACGCAAGGTCTGTGAG-3' 5'-GGGATCCTGCCTGCGTCTTCTAGGGTGC-3'	EcoR I BamH I	177 bp
BART17	5'BART17 EcoRI 3'BART17 BamHI	5'-GCGAATTC CAATTGATAAACCTCCGCATG-3' 5'-GCGGATCCCCTTAAAGTACCAACAAGGTC-3'	EcoR I BamH I	194 bp
BART7	5'BART7 Eco 3'BART7 Bgl	5'-CGTGAATTCGCTGATAAGTGCTGCGTCC-3' 5'-TGCAGATCTGGGAAAATACCCATGTAACC-3'	EcoR I Bgl II	400 bp
BART1-5	5'BART1-5 Bam 3'BART1-5 Bgl	5'-CGGGATCCTGGGAACTAGTGGGAGTGCTG-3' 5'-GGAAGATCTAGCCTGGTAAACGGACCCTG-3'	BamH I Bgl II	500 bp

#### 4.11.7. Reporterplasmide

- pMIR-IL1A 3'UTR:** Dieses Konstrukt enthält die komplette 3'UTR und die letzten 73 bp der kodierenden Sequenz von IL1A. Das 1186 bp lange Insert wurde mit Hilfe von spezifischen Primern und der IL1A-cDNA als Template amplifiziert und über *Spe I* und *Sac I* hinter das Firefly-Luciferase-Gen des Vektors pMIR-RNL-TK kloniert.
- pMIR-IL1A mut I:** Bei diesem Konstrukt wurden die zur Seed-Sequenz der miR-142-3p komplementären Basen 800 – 809 innerhalb der IL1A-3'UTR mit Hilfe von spezifischen Primern durch eine zielgerichtete Mutagenese ausgetauscht.
- pMIR-IL1A mut II:** Zielgerichtete Mutation der zur miR-142-3p-Seed-Sequenz komplementären Basen 157 – 163 der IL1A-3'UTR mit Hilfe von spezifischen Primern.
- pMIR-IL1R1 3'UTR:** Diese Plasmid enthält die IL1R1-3'UTR und die letzten 12 bp der kodierenden Region direkt im Anschluss an das Firefly-Luciferase-Gen im Vektor pMIR-RNL-TK. Die Amplifikation des 3061 bp großen Inserts erfolgte mit spezifischen Primern und cDNA von IL1R1 als Template. Anschließend wurde das Fragment mit Hilfe von *Sac I* und *Nae I* in die MCS des pMIR-RNL-TK kloniert.
- pMIR-TOMM22 3'UTR:** Klonierung der 3'UTR von TOMM22 sowie der letzten 80 bp der kodierenden Sequenz hinter das Firefly-Luciferase-Gen in pMIR-RNL-TK. Das 973 bp große PCR-Produkt wurde über *Spe I* und *Nae I* in die MCS des Vektors kloniert.
- pMIR-TOMM22 mut:** Mit Hilfe einer zielgerichteten Mutagenese und spezifischen Primern wurde die zur BART16 komplementäre Sequenz in der 3'UTR von TOMM22 (Basen 106-114) ausgetauscht.

- 
- pMIR-ELK3 3'UTR: Dieses Plasmid enthält die ELK3-3'UTR sowie die letzten 63 bp der kodierenden Region hinter der Firefly-Luciferase im Vektor pMIR-RNL-TK. Diese 516 bp wurden mit spezifischen Primern aus testis-cDNA amplifiziert und über *Spe I* und *Sac I* in die MCS des Vektors kloniert.
- pMIR-SOCS3 3'UTR: Klonierung der kompletten 3'UTR sowie der letzten 25 bp der kodierenden Sequenz von SOCS3 hinter das Firefly-Luciferase-Gen in den Vektor pMIR-RNL-TK. Die Amplifikation erfolgte mit spezifischen Primern aus einer testis-cDNA und das Insert wurde anschließend mit Hilfe von *Spe I* und *Sac I* in die MCS des Vektors kloniert.
- pMIR-BCL6 3'UTR: Die 3'UTR von BCL6 und die letzten 21 bp des kodierenden Bereiches wurden hinter die Firefly-Luciferase in den Vektor pMIR-RNL-TK kloniert. Dazu wurde das 1062 bp große Insert mit spezifischen Primern amplifiziert und anschließend über *SacI* Schnittstellen in die MCS des Vektors kloniert.
- pMIR-BCL6 mut: Durch zielgerichtete Mutation der Basen 451 – 456 innerhalb der BCL6-3'UTR wurden mit Hilfe von spezifischen Primern die zur Seed-Sequenz von miR-205 komplementären Basen ausgetauscht.
- pMIR-CD44 3'UTR: Der Vektor pMIR (Ambion) enthält die 3'UTR von CD44 hinter dem Firefly-Luciferase-Gen. (Zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gunter Meister, Martinsried)
- pMIR-FOS 3'UTR: Die FOS-3'UTR wurde hinter die Firefly-Luciferase von pMIR-RNL-TK kloniert. (Zur Verfügung gestellt von Dr. Stephanie Barth)

## 4.12. Oligonukleotide

Zur Herstellung der oben genannten Reporterplasmide wurden folgende Oligonukleotide von MWG Biotech eingesetzt.

5'IL1A3'UTR_Spe	5'-GACTAGTCTACTGGGTGTGCTTGGCA-3'
3'IL1A3'UTR_Sac	5'-CGAGCTCCATTATGGTCTGATCAC-3'
5'IL1A3'UTR_Mut I	5'-CCATA GCCAGGCTGTGCGACTATTCTAGTACTTG-3'
3'IL1A3'UTR_Mut I	5'-CAAGTACTAGAATAGTTCGACAGCCTGGCTATGG-3'
5'IL1A3'UTR_Mut II	5'-TAAGAGTGGAACCTGTGCGACACATATAATGTTGTT-3'
3'IL1A3'UTR_Mut II	5' ACAACATTATATGTGTCGACAGGTTCCACTCTTACA-3'
3'BCL6 3'UTR_Nhe	5'-CGGCTAGCGAATTCAGCCAAACCCTGTCTCCGG-3'
5'BCL6 3'UTR_Xba	5'-GCTCTAGATTCCGTCACAAAAGCCAGCT-3'
5'BCL6 3'UTR_Mut	5'-TTTAACCAAAGGGTCGACAATATATGGCAGAGTTG-3'
3'BCL6 3'UTR_Mut	5'-CAACTCTGCCATATATTGTGCGACCCTTTGGTTAAA-3'
5'IL1R1 3'UTR_Sac	5'-CGAGCTCTGCCTCTCGGGT AGCATG-3'
3'IL1R1 3'UTR_Nae	5'- GCCGGCCAGTCTATTGATCCGTGATGC-3'
5'ELK3 3'UTR_Spe	5'-GACTAGTCCCCAGTCTGGACAGAGCTGC-3'
3'ELK3 3'UTR_Sac	5'-CGAGCTCCATATTGCCCACTGGTGAA-3'
5'SOCS3_Spe	5'-GACTAGTCTGGACCAGTACGATGCCCC-3'
3' SOCS3_Sac	5'-CGAGCTC CTAATAGCCTCAAGGGCCTGA-3'
5'TOMM22_Spe	5'-GACTAGTGCAGATACTT CTAGGACC-3'
3'TOMM22_Nae	5'-CGGCCGGCCACAGTGTGATTATAGAC-3'
5'TOMM22_Mut	5'-CTTTGGCACA TTGAGAGTCGACTACCTGGT GGGGAGAA-3'
3'TOMM22_Mut	5'-TCTCCCCACCAGGTAGTCGACTCTCAATGTGCCAAAG-3'

Die Herstellung von spezifischen Sonden zur Verwendung im Northern Blot ging von folgenden Oligonukleotiden aus:

Sonde miR-181a	5'-AACATTCAACGCTGTCGGTGAGTCCTGTCTC-3'
Sonde miR-181b-1	5'-AACATTCATTGCTGTCGGTGGGTCCTGTCTC-3'
Sonde_miR-142 (5p)	5'-CATAAAGTAGAAAGCACTACTCCTGTCTC-3'
Sonde_miR-205	5'-TCCTTCATTCCACCGGAGTCTGCCTGTCTC-3'
Sonde miR-125a	5'-TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTGACCTGTCTC-3'
Sonde BART6	5'-TAAGGTTGGTCCAATCCATAGGCCTGTCTC-3'
Sonde BART16	5'-TTAGATAGAGTGGGTGTGTGCTCTCCTGTCTC-3'
Sonde miR-17	5'-CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGCCTGTCTC-3'

Sonde miR-106a	5'-AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGCCTGTCTC-3'
Sonde miR-106b	5'-TAAAGTGCTGACAGTGCAGATCCTGTCTC-3'
Sonde pot.miR27	5'-GCCTCTGCTGCTGGACCAGCCTGTCTC-3'
Sonde pot.miR34	5'-TCAGCTACTACCTCTATTAGGCCTGTCTC-3'
Sonde pot.miR42	5'-TTCAGCCAGGCTAGTGCAGTCTCCTGTCTC-3'
Sonde BART7	5'-CATCATAGTCCAGTGTCCAGGGCCTGTCTC3'
Sonde BART1	5'-TCTTAGTGGAAGTGACGTGCTGTGCCTGTCTC-3'

Zur Herstellung von cDNA und der Amplifikation von spezifischen cDNA-Sequenzen in der Real-Time PCR wurden folgende Primer eingesetzt:

5'IL1A_qRT	5'-GGTTGAGTTTAAGCCAATCCA -3'
3'IL1A_qRT	5'-TGCTGACCTAGGCTTGATGA-3'
5'GAPDH_qRT	5'-GGTTGAGTTTAAGCCAATCCA -3'
3'GAPDH_qRT	5'-GGTTGAGTTTAAGCCAATCCA -3'
rev	5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3'
5.8sRNA	5'-CTACGCCTGTCTGAGCGTCGCTT-3'
polyt VN	5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGG(T) <sub>12</sub> VN*-3'
qRTmiR-200c	5'-TAATACTGCCGGGTAATGATGGA-3'
qRTmiR-205	5'-TCCTTCATTCCACCGGAGTCTG-3'
qRTmiR-145	5'-GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCTAA-3'
qRTmiR-148a	5'-TCAGTGCACTACAGAACTTTGT-3'
qRTmiR-142-3p	5'-TGTAGTGTTTCCCTACTTTATGGA-3'
qRTmiR-181b	5'-AACATTCATTGCTGTCGGTGGGT-3'
qRT-miR-424	5'-CAGCAGCAATTCATGTTTTGAA-3'
qRT miR-20b	5'-CAAAGTGCTCATAGTGCAGGTAGAA-3'

#### 4.13. Software

Zur Textverarbeitung diente Microsoft Word 2003™ (Microsoft Corp.). Die Grafiken wurden mit Hilfe des Programms CorelDRAW 12.0™ (Corel Corp.) bearbeitet. Die Internetseiten des NCBI (National Center Of Biotechnology Information: [www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/)) sowie angeschlossene Dienste wurden dazu benutzt Nukleotid-Sequenzabgleiche durchzuführen. Die Abbildungen und die statistische Auswertung der Luciferase-Assays wurden mit dem Programm Sigma Plot 10.0 (Systat Software) erstellt. FACS-Analysen wurden mit Hilfe des Programms CellQuest 3.1 (BD Bioscience) durchgeführt. Während zur Bearbeitung und

---

Quantifizierung der Northern Blots die Software ImageQuant (Version 3.3) diente, wurde für die Analyse von Western Blots die Software Quantity One (Biorad) eingesetzt. Die Auswertung der ELISA-Assays erfolgte mit Hilfe des Programms WorkOut 2.5 (Perkin Elmer). Zur Vorhersage von miRNA Targets wurden die Programme TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>), microRNA.org (<http://www.microrna.org>) und RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) herangezogen. Mit Hilfe von SigTerms ([sigterms.sourceforge.net](http://sigterms.sourceforge.net)) war mit den genannten Programmen eine miRNA-Target-Vorhersage durch Verknüpfen von miRNA- und mRNA-Expressionsdaten möglich.

## 5. Methoden

### 5.1. Bakterielle Zellkultur

#### 5.1.1. Aufzucht und Lagerung von Bakterien

Die Vermehrung von Plasmiden erfolgte durch Transformation von Bakterien mit dem entsprechenden Plasmid, dem anschließenden Ausstreichen auf einer LB-Agarplatte und deren Bebrütung über Nacht bei 37 °C. Zu analytischen Zwecken wurden am nächsten Tag 2 ml LB-Medium mit einer Bakterien-Kolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Um größere Mengen Plasmid-DNA isolieren zu können, wurden 50 ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie der LB-Platte oder alternativ mit Bakterien aus einer DMSO-Stammhaltung angeimpft. Die Langzeitlagerung von Bakterien erfolgte nach Zugabe von 20 % (v/v) DMSO zur Bakteriensuspension bei -70 °C. Die Lagerung von LB-Agarplatten erfolgte nach Abdichtung mit Parafilm kurzfristig bei 4 °C.

#### 5.1.2. Herstellung kompetenter Bakterien (CaCl<sub>2</sub>/RbCl-Methode)

(Kushner, 1978)

*E.coli*-Bakterien zeigen natürlicherweise keine Kompetenz, d.h. sie können keine fremde DNA aufnehmen. Um effizient Plasmid-DNA in Bakterien vermehren zu können, muss diese deshalb auf künstlichem Wege in die Bakterien eingebracht werden. Die Herstellung kompetenter Bakterien kann mit Hilfe von Chemikalien erfolgen. Im Folgenden soll die Herstellung kompetenter Bakterien durch die Rubidium-Methode beschrieben werden.

Zunächst wurden 30 ml SOB-Medium (pur) 1:100 mit einer 2 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung versetzt, mit 50 µl einer auf Eis aufgetauten *E.coli*-pMOS-Suspension angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde eine Hauptkultur aus 200 ml SOB-Medium mit 8 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>550nm</sub> von ~0,3 kultiviert. Die Bakterien wurden für 15 min auf Eis abgekühlt und 10 min bei 3000 rpm und 4 °C pelletiert. Anschließend wurden die Pellets in je 16 ml Transformations-Lösung 1 resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und erneut für 10 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Resuspendieren der Pellets mit je 4 ml Transformations-Lösung 2 wurde die Bakteriensuspension in Eppendorfgefäße

aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei -70 °C.

### 5.1.3. Transformation kompetenter Bakterien

[Lederberg, 1974 #4885]

Kompetente Bakterien können mit Hilfe von Hitzeschock oder Elektroporation dazu gebracht werden, fremde DNA aufzunehmen. Dazu wurde die Plasmid-DNA oder 5 µl eines Ligationsansatzes zu 50 µl einer auf Eis aufgetauten, kompetenten Bakteriensuspension gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Der genaue Mechanismus des sich anschließenden Hitzeschocks für 90 sec bei 42 °C ist noch ungeklärt, aber durch die Hitze wird die Bakterienwand wohl kurzfristig permeabel, so dass die DNA in die Zelle gelangen kann. Nach Abkühlen der Suspension auf Eis erfolgte nach Zugabe von 100 µl antibiotikafreiem LB-Medium eine halbstündige Inkubation bei 37 °C. Durch die Vorkultur in antibiotikafreiem LB-Medium wurde den durch den Hitzeschock gestressten Bakterien das Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase erleichtert und somit eine höhere Bakterienausbeute gewährleistet. Die Bakterien wurden anschließend auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen oder zum Animpfen einer Hauptkultur verwendet und über Nacht bei 37 °C inkubiert bzw. geschüttelt. Die Selektion der plasmidtragenden Bakterien richtete sich nach dem Resistenzgen, für welches das jeweilige Plasmid kodierte. In dieser Arbeit wurden LB-Agarplatten oder LB-Medium mit 0,1 % [w/v] Ampicillin oder mit 30 µg/ml Kanamycin versetzt.

### 5.1.4. Blau-Weiß-Selektion

Das Prinzip dieser Selektion beruht auf der Umsetzung des künstlichen Substrats X-Gal zu Galactose und einem blauen Farbstoff nach Induktion mit IPTG. Mit Hilfe dieser Methode kann z.B. der Erfolg einer Ligation bestimmt werden. Dazu muss allerdings der verwendete Bakterienstamm  $\beta$ -Galaktosidase-defizient sein (z.B. pMOS) und das Plasmid eine MCS (multiple cloning site) innerhalb des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens (*lacZ*) tragen. Vor Ausstreichen der Bakterien wurde die LB-Agarplatte mit IPTG und X-Gal behandelt. War die Ligation eines Inserts in die MCS des Plasmids erfolgreich und das *lacZ*-Gen somit unterbrochen, konnten die Bakterien das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase nicht mehr produzieren und die betroffene



Kolonie blieb weiß. Dementsprechend färbten sich Bakterien, die das Plasmid ohne Insert trugen, blau.

## **5.2. Eukaryotische Zellkultur**

### **5.2.1. Kultur von adhärennten Monolayer-Zellkulturen**

Monolayer-Zellkulturen wachsen adhärennt auf einer Unterlage. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den Monolayer-Zellkulturen 293T und HaCaT gearbeitet. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. In der Regel wurden 293T-Zellen montags und freitags 1:15 und HaCaT-Zellen 1:5 in neue Flaschen passagiert. Dazu wurden die Zellen nach steriler Mediumabnahme zunächst mit 1 ml Trypsin gespült um Mediumreste zu entfernen. Um den Zellrasen anschließend abzulösen und die Zellen zu vereinzeln, inkubierte man 293T-Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA für ca. 5 min und HaCaT-Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA für ca. 10 min bei 37 °C. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion wurde FKS-haltiges Medium hinzugegeben, ein Teil dieser Suspension in eine neue Flasche überführt und mit supplementiertem Medium auf 20 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

### **5.2.2. Kultur von Suspensionszellen**

Bei B- und T-Zelllinien handelt es sich um Zellen, die in Suspension wachsen. Diese Zellen wurden ebenfalls in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte durch mehrfaches auf- und abpipettieren mit einer Plastikpipette. Anschließend wurde ein Teil der Zellsuspension in eine neue Flasche überführt und mit frischem Medium aufgefüllt. B-Zellen des Stammes Jijoye, sowie die T-Zelllinie SUP-T1 und die NK-Zelllinien HANK-1 bzw. NK-YS wurden montags und freitags wie folgt subkultiviert: Jijoye 1:4, SUP-T1 1:10, NK-YS 1:5, HANK-1 1:4. Die NK Zelllinie NK-92 wurde montags und mittwochs 1:5, freitags 1:10 gesplittet.

### **5.2.3. Zellzahlbestimmung mittels CASY**

Die Zellzahl von Monolayer- und Suspensions-Zellkulturen wurde vor der Transfektion/Elektroporation bestimmt. Dazu wurden 7 µl Zellsuspension mit 7 ml

einer Elektrolyt-Lösung (CASYTon™) verdünnt und im CASY™-Counter (Schade) gemessen. Das Messprinzip beruht auf der Änderung des Widerstandes der Elektrolytlösung beim Durchtritt der Zellen durch eine im Gerät befindliche Kapillare abhängig von Zellgröße und Integrität der Zellmembran. Anhand des ausgegebenen Histogramms wurde die Analyse dokumentiert.

#### **5.2.4. Transfektion eukaryotischer Zellen mit Nanofectin**

Nanofectin ist ein DNA-Transfektionsreagenz (PAA), welches durch die Anwesenheit von Serum während der Transfektion nicht beeinflusst wird und sich durch effektive Transfektion bei niedriger Toxizität für die Zellen auszeichnet. Die DNA wird an ein positiv geladenes Polymer, eingebettet in ein poröses Nanopartikel, gebunden. Dieser DNA-Komplex kann von der Zelle aufgenommen werden, während die DNA selbst durch den Nanopartikel-Komplex vor Abbau geschützt ist. Die Zellen wurden laut Vorschrift ausgesät, 24 h später transfiziert und 48 h danach geerntet.

#### **5.2.5. Transfektion eukaryotischer Zellen mit Metafectene**

Metafectene™ ist ein Transfektionsreagenz von Biontex zur Transfektion von eukaryotischen Zellen mit DNA/RNA/siRNA. Die DNA/RNA/siRNA wird durch das polykationische Reagenz zunächst in sehr kompakte Strukturen komplexiert, welche den Eintritt in die Zelle ermöglichen. Die Freisetzung in der Zelle wird durch sogenanntes „Endosome Buffering“ gewährleistet. In 6-Lochplatten wurden  $3 \times 10^5$  HaCaT-Zellen ausgesät, 24 h später mit 2 µg DNA bzw. 12 µl Metafectene™ transfiziert und 48 h danach geerntet.

#### **5.2.6. Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Nucleofector**

Die Nucleofector® Technology von Lonza ist eine Transfektionsmethode zur Transfektion von schwierig zu transfizierenden Zellen, bestehend aus einer Kombination aus elektrischen Parametern und zelltypspezifischen Lösungen. Sie unterscheidet sich von anderen Methoden dadurch, dass sie den direkten Eintritt der DNA in den Zellkern erlaubt und somit unabhängig von der Zellteilung ist. In dieser Arbeit wurden SUP-T1 Zellen effizient mit dieser Methode transfiziert.

Es wurden je  $2 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz mit je 2 µg DNA oder 0,5 nmol 2'-O-Methyl-antisense RNA transfiziert. Die Transfektion erfolgte nach Vorschrift des Herstellers

---

unter Verwendung der Nucleofector-Lösung V und des Programms O-017. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet.

### **5.3. DNA-Techniken**

#### **5.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA**

##### **5.3.1.1. Analytische Isolierung von Plasmid-DNA (Boiling Präparation)**

(modifiziert nach (Birnboim and Doly, 1979))

In kleinem Maßstab erfolgte die Isolation von Plasmid-DNA über sogenannte „Boiling-Präparationen“. Dazu wurden 2 ml einer Ampicillin-haltigen LB-Flüssigkultur mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Das Bakterienpellet wurde nach Zentrifugation (10 min, 5.000 rpm, 4 °C) der Suspension in 200 µl STET-Puffer resuspendiert und die Bakterien durch Zugabe von 1 µl Lysozym (0,5 mg/ml) und 10 minütiger Inkubation auf Eis lysiert. Anschließend kochte man die Probe für 45 s bei 98,5 °C, kühlte sie auf Eis ab und zentrifugierte sie (15 min, 13.000 rpm, 4 °C) erneut, um das entstandene Pellet aus Zelltrümmern anschließend mit einem Zahnstocher entfernen zu können. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 200 µl Isopropanol, Mischen und Abzentrifugieren der Lösung (30 min, 13.000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 20 µl S1-Puffer aufgenommen. Die RNA wurde für 10 min bei 37 °C abgebaut und die DNA anschließend für 5 min bei 50 °C gelöst.

##### **5.3.1.2. Plasmid-DNA-Präparation mittels NucleoBond™**

Bei Bedarf größerer Mengen an hochreiner Plasmid-DNA wurde die Aufbereitung mit Hilfe alkalischer Lyse und Anionenaustauschersäulen (NucleoBond®PC100) gemäß dem Protokoll der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Mit Hilfe der NucleoBond™-AX 100-Säulen (Midi) können bis zu 100 ml Bakterienkultur aufgearbeitet werden. Eine 50 ml Übernachtskultur plasmidtragender Bakterien wurde zunächst abzentrifugiert und anschließend mit verschiedenen Puffern behandelt. Ein SDS-haltiger Puffer löst zunächst die bakterielle Zellwand auf und führt zur Lyse der Zellen. Unter den alkalischen Bedingungen kommt es dann zur Denaturierung der chromosomalen DNA, der Plasmid-DNA und der Proteine. Durch die Zugabe eines Neutralisationspuffers können die beiden Stränge der Plasmid-DNA wieder

hybridisieren und bleiben in Lösung, während die weitaus größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und mit den ebenfalls denaturierten Proteinen ausfällt. Die eigentliche Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt im Anschluss durch Anionen-Austauscher-Säulen. Aufgrund der Salz- und pH-Bedingungen im Lysat können die stark negativ geladenen Nukleinsäuren an die Säule binden, während die weit weniger stark negativ geladenen Proteine durchlaufen. Ebenfalls an die Säule bindende, störende RNA wird mit Waschpuffern gewegewaschen und die DNA anschließend eluiert. Nach Fällung der DNA mit Isopropanol und Waschen mit 70%igem Ethanol kann die Plasmid-DNA in TE-Puffer gelöst und der DNA-Gehalt photometrisch bestimmt werden.

### 5.3.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung

(Maniatis, 1989)

Mit Hilfe eines Ultrospec 3000 Photometer (Pharmacia) bzw. eines Nanodrop2000c (PEQLAB) wurde die Konzentration bzw. Reinheit von DNA und RNA durch Messen der Extinktion bei 260 nm bzw. 280 nm bestimmt. Da Nukleinsäuren Licht der Wellenlänge 260 nm absorbieren, ist die Absorption ein Maß für den DNA-Gehalt einer Lösung. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei  $\lambda = 260$  nm entspricht bei:

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

Die Ursache für die höhere Absorption von einzelsträngiger DNA im Vergleich zu doppelsträngiger DNA ist im Hyperchromizitätseffekt begründet. Da Proteine bei  $OD_{280nm}$  absorbieren, beschreibt der Quotient  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  die Reinheit der DNA-Probe und sollte bei reiner DNA/RNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Tiefere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten.

### 5.3.3. PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht *in vitro* eine selektive Vermehrung von Nukleinsäuresequenzen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Dabei wird die Eigenschaft von DNA-Polymerasen

---

ausgenutzt, ausgehend von einem freien 3'-Hydroxy-Ende einen zur Matrize komplementären DNA-Einzelstrang zu synthetisieren. Zu Beginn der Reaktion wird die doppelsträngige DNA-Matrize (Template) bei 94 °C in Einzelstränge aufgetrennt. Im nachfolgenden Schritt wird die Reaktion abgekühlt, so dass synthetische Oligonukleotide (Primer), die zu jeweils einem der beiden Matrizeneinzelstränge komplementär sind, mit diesen hybridisieren (Annealing). Die Annealing-Temperatur ist abhängig von Länge und Sequenz (GC-Gehalt) der Primer, liegt jedoch meist zwischen 51 °C und 65 °C. Anschließend wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, um es der DNA-Polymerase zu ermöglichen, ausgehend von den freien 3'-Hydroxy-Enden der Primer einen zur Matrize komplementären Tochterstrang in Gegenwart von dNTP's (Desoxyribonukleosidtriphosphate) zu erzeugen (Elongation). Die neusynthetisierten DNA-Stränge sind zunächst oft länger als der zu amplifizierende Sequenzbereich, besitzen jedoch durch die Primer definierte Ausgangspunkte, die so den zu amplifizierenden Sequenzbereich genau festlegen. Im zweiten Reaktionszyklus werden die neusynthetisierten DNA-Doppelstränge ebenfalls zu Matrizen, die mit den Primern hybridisieren und verlängert werden können. Ab den nächsten Reaktionszyklen entstehen daher nur noch Doppelstränge, die von den Primern flankiert sind. Die Wiederholung der Zyklen (Denaturierung, Annealing und Elongation) ermöglicht eine fast exponentielle Amplifikation der gewünschten Zielsequenz. Die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammende DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) besitzt ein Temperaturoptimum von 72 °C und bleibt bei den Denaturierungsschritten von 94 °C stabil. Bei der Synthese der Primer wurde beachtet, dass beide Primer eine möglichst ähnliche Schmelztemperatur aufwiesen und keine Sekundärstrukturen ausbilden konnten. Die Primer wurden in lyophilisierter Form von der Firma MWG Biotech bezogen. In der nachfolgenden Tabelle ist ein typischer PCR-Ansatz dargestellt.

**Tabelle 5: Pipettierschema eines 50 µl Standard-PCR-Ansatzes**

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
dNTP's	2 µl	je 100 mM
10× Reaktionspuffer	5 µl	1×
5'-Primer	1 µl	50 µM
3'-Primer	1 µl	50 µM
Matrizen-DNA	1-5 µl	0,1-0,5 µg
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl	5 U
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50 µl	

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Peltier Thermal Cycler 200 der Firma MJ Research durchgeführt. Das PCR-Programm (Tabelle 6) variierte in der Annealing-Temperatur je nach Schmelztemperatur der Primer und je nach Sequenzlänge des Amplifikats in der Elongationsdauer (0,5-1 min pro kb Sequenzlänge). Zur Überprüfung auf eventuelle Kontaminationen wurde bei jeder PCR eine Wasserkontrolle, die alle Komponenten bis auf die Template-DNA enthielt, mitgeführt.

**Tabelle 6: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94 °C	2 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	abhängig von Primern	1 min
Extension	72 °C	0,5 -1 min
Letzte Extension	72 °C	10 min

} x 34

Die Extension bei 72 °C für 10 min zum Abschluss diente dem Auffüllen noch einzelsträngiger DNA. Um den Erfolg der PCR zu überprüfen wurden 15 µl des Ansatzes in einem Agarosegel aufgetrennt.

#### 5.3.4. Zielgerichtete Mutagenese

Um gezielt Mutationen in die 3'UTR von Target-Sequenzen einzufügen, bediente man sich der Methode der zielgerichtete Mutagenese (site-directed mutagenesis). Im ersten Schritt erfolgte eine PCR mit einem Plasmid, welches die Matrizen-DNA trug und zwei zueinander komplementären Primern, die die gewünschte Mutation

aufwiesen. Mit Hilfe einer Proofreading-Polymerase erfolgte die Amplifikation der mutierten Plasmidsequenz in wenigen Zyklen (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Standardreaktionsansatz zur Durchführung der zielgerichteten Mutagenese**

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
dNTP's	2 µl	je 100 mM
10×Reaktionspuffer	5 µl	1×
5'-Mutagenese-Primer	1 µl	50 µM
3'-Mutagenese-Primer	1 µl	50 µM
Matrizen DNA	0,5-1 µl	50 ng
Pfu Polymerase	2 µl	5 U
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50 µl	

Tabelle 8 zeigt das für die Mutagenese verwendete PCR-Programm.

**Tabelle 8: PCR-Programm zur Durchführung der zielgerichteten Mutagenese**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	1 min
Denaturierung	95 °C	1 min
Annealing	48 °C–56 °C (abh.von Primern)	50 s
Extension	72 °C (2 min pro kb)	0,5 -1 min
Letzte Extension	72 °C	10 min

Im Anschluss an die Reisolierung der amplifizierten DNA, sorgte das methylierungsspezifische Restriktionsenzym *Dpn I* für den Abbau der methylierten bzw. hemimethylierten parentalen DNA, während die neu synthetisierte, mutierte DNA intakt blieb. Nach Transfektion der mutierten DNA in Bakterien, ligierten diese die DNA wieder zu einem zirkularisierten Plasmid und vermehrten dieses. Durch Einfügen einer spezifischen Restriktionsschnittstelle in die Mutagenese-Primer konnten anschließend leicht Klone identifiziert werden, welche die Mutation trugen.

### 5.3.5. Agarosegelelektrophorese

(Maniatis, 1989)

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern DNA-Moleküle im Agarosegel aufgrund ihrer negativen Ladung zum Plus-

Pol. Dabei wirken die Agarosegele wie Molekularsiebe, kleine Moleküle wandern schneller durch die Poren des Gels als größere. Die Agarosekonzentration bestimmt die Porengröße des Gels, weshalb sich die Konzentration des Gels nach der Größe der aufzutrennenden DNA richtet. Mit Hilfe eines bekannten DNA-Molekulargewichtstandards kann die Größe von DNA-Fragmenten bestimmt werden.

**Tabelle 9: Eingesetzte Agarosegele je nach aufzutrennender Fragmentgröße**

DNA-Trennbereich (kb)	Agarosemenge (%)
1-30	0,5
0,8-12	0,7
0,5-7	1,0
0,4-6	1,2
0,2-3	1,5
0,1-2	2

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 450 ml 1x TAE-Puffer unter Kochen aufgelöst und nach Abkühlen auf etwa 60 °C mit 22,5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml in H<sub>2</sub>O) versetzt. Anschließend wurde die Agaroselösung auf eine zuvor mit einer Kunststoffeinfassung abgegrenzten, abgedichteten Glasplatte (24,5 × 24,5 × 1 cm) gegossen und das auspolymerisierte Gel später bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Durch Versetzen der DNA-Proben mit 1/5 Volumen glycerolhaltigem Bromphenolblaupuffer wurde das Absinken der DNA-Lösung in die Agarosegeltaschen gewährleistet und die Lauffront im Gel sichtbar gemacht. Zur Auftrennung wurde das Gel in eine mit 1x TAE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und ein elektrisches Feld angelegt (140 V für ca. 1 h). Eine Größenbestimmung dieser Fragmente war durch einen mitgeführten Molekulargewichtstandard möglich (10 µl der 1 kb-Plus Leiter). Die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert, ermöglichte es, die DNA-Fragmente nach der Auftrennung unter UV-Licht bei 254 nm als fluoreszierende Banden zu dokumentieren (ChemiDoc™ XRS+ der Firma Biorad). Dieses kurzwellige UV-Licht schädigt die DNA stark, was sie somit unbrauchbar für weitere gentechnische Arbeiten macht. Deshalb wurden DNA-Stücke, die zur Klonierung weiterverwendet werden sollten, zuvor mit Hilfe einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 365 nm sichtbar gemacht und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten.



### 5.3.6. NucleoSpin-Extraktion von DNA

Um DNA aus einem Agarosegel zu extrahieren oder eine DNA-Lösung von Enzymen bzw. Puffern zu befreien, wurde das NucleoSpin-Extraktion Kit von Macherey-Nagel unter Beachtung des Hersteller-Protokolls verwendet. Diese Methode basiert auf einer Ionenaustauschchromatographie, bei der die DNA an silicahaltige Säulen gebunden wird. Anschließend werden unspezifisch gebundene Moleküle durch Waschen von der Säule entfernt und die DNA mit Hilfe eines Elutionspuffers von der Säule gelöst. Die rückgewonnene DNA konnte nun mit Hilfe von Restriktionsenzymen gespalten oder zur direkten Klonierung in Vektoren eingesetzt werden.

### 5.3.7. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

(Maniatis, 1989)

Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) dienen Mikroorganismen dazu, eigene DNA aufgrund von Methylierungsmuster von fremder DNA zu unterscheiden und diese abzubauen. Man unterscheidet drei Typen von Restriktionsendonukleasen, wobei in der Molekularbiologie allerdings nur Restriktionsenzyme der Klasse II zum Einsatz kommen. Diese Enzyme erkennen eine Sequenz von vier, sechs oder acht, in seltenen Fällen auch fünf Basen. Erkennungsstellen sind meist Palindrome, d.h. sie sind symmetrisch aufgebaut und daher in beiden Strängen gleich. Restriktionsenzyme können unterschiedliche Arten von Schnitten erzeugen. Sie können die DNA-Doppelstränge leicht versetzt schneiden, so dass überhängende Enden („sticky ends“) am 5'- bzw. am 3'-Ende entstehen oder es wird direkt zwischen zwei Basenpaaren geschnitten, was zur Entstehung stumpfer Enden („blunt ends“) führt.

Die Wirksamkeit der Enzyme ist in Units definiert, wobei eine Unit (u) in der Lage ist, 1 µg DNA in optimalem Milieu und bei optimaler Temperatur (meist 37 °C) innerhalb von 60 min vollständig zu schneiden. In den Verdauansätzen wurden für analytische Zwecke 0,5-1 µg DNA und für präparative Zwecke bis zu 2 µg DNA verwendet. Die Anzahl der eingesetzten Units betragen je nach Enzym zwischen 2-10 U/µg DNA. Der Verdau wurde jeweils unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen (Temperatur und Inkubationsdauer) durchgeführt. Im Folgenden ist ein Standardverdauansatz dargestellt:

---

<b>Restriktionsansatz:</b>	Restriktionsenzym	1 U
	2x Restriktionspuffer	2 µl
	DNA	1-2 µg
	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 20 µl

Die Ansätze wurden vor Zugabe der Enzyme durchmischt, kurz abzentrifugiert, für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und danach mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

### 5.3.8. Dephosphorylierung von Vektor-DNA

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

Mit Hilfe von alkalischer Phosphatase (CIP, calf intestinal phosphatase) wurde nach der Restriktion die reaktive Phosphatgruppe am 5'-Ende abgespalten, um eine Rezirkularisierung bzw. Konkaterisierung von linearisierter Vektor-DNA bei der nachfolgenden Ligation zu vermeiden. Bei Vektoren, die mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten wurden, ist eine Rezirkularisierung unwahrscheinlich, eine Verbindung mehrerer Vektoren miteinander jedoch möglich. Die Dephosphorylierung wurde nicht in einem separaten Schritt durchgeführt, stattdessen wurde der Restriktionsansatz zusätzlich mit 1 µl CIP versetzt und für 2 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Restriktion bzw. Dephosphorylierung wurde der Vektor im Agarosegel aufgetrennt, aufgereinigt und zur Klonierung von DNA-Fragmenten eingesetzt.

### 5.3.9. Ligation von DNA-Fragmenten

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

Während einer Ligation erfolgt die Verknüpfung von zueinander passenden DNA-Molekülen mit Hilfe eines Enzyms (Ligase). In dieser Arbeit wurde die T4-DNA-Ligase verwendet, welche zu den DNA-Reparaturenzymen gehört und sich aus *E.coli*-Bakterien isolieren lässt, die mit dem Bakteriophagen T4 infiziert sind. Mit Hilfe der T4-Ligase wird *in vitro* unter dem Verbrauch von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden in doppelsträngiger DNA ermöglicht. Die Enden der beiden zu ligierenden Nukleinsäuremoleküle können dabei überhängend oder stumpf sein. Die

Konzentration der eingesetzten Vektor- und Insert-DNA wurde so gewählt, dass beide im Reaktionsansatz äquimolar vorlagen. Ein typischer Ligationsansatz von 10 µl Menge ist dargestellt:

<b>Ligationsansatz:</b> Insert	4-7 µl
dephosphorylierter Vektor	1-4 µl
10x T4-Ligase-Puffer	1 µl
T4-Ligase (1 U/µl)	1 µl

Der Ansatz wurde für mindestens 3 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend 5 µl davon in *E.coli* transformiert. Bei jeder Ligation diente ein Ligationsansatz des Vektors ohne Insert zur Überprüfung der erfolgreichen Dephosphorylierung des Vektors.

### 5.3.10. Ligation von PCR-Fragmenten in pGEM<sup>®</sup>-T

Mit Hilfe des TA-Klonierungsvektors pGEM<sup>®</sup>-T (Promega) können PCR-Produkte ohne vorherige Restriktion kloniert werden. Durch die *Taq*-Polymerase wird an das 3'-Ende des PCR-Produktes ein Adenin gehängt, welches die direkte Ligation des Produktes in einen Vektor mit 3'-T-Überhang ermöglicht. Manche PCR-Produkte können je nach Restriktionsschnittstelle und flankierender Sequenz nur schlecht geschnitten werden, wodurch eine nachfolgende Ligation erschwert sein kann. In solchen Fällen empfiehlt es sich, den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor zur Zwischenklonierung zu verwenden. Ein Ligationsansatz enthielt die folgenden Komponenten:

<b>Ligationsansatz pGEM<sup>®</sup>-T:</b>	pGEM-T <sup>®</sup> Vektor	1 µl
	2x Ligationspuffer	5 µl
	T4-Ligase (1U/µl)	1 µl
	Insert	3 µl

Der Ansatz wurde vor der Transformation für mindestens 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

---

## **5.4. RNA-Techniken**

### **5.4.1. RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe von peqGOLD TriFast™ der Firma PEQLAB. Es handelt sich um eine optimierte Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode für die gleichzeitige Extraktion von RNA, DNA und Proteinen. Durch Zugabe von Chloroform erfolgt eine Auftrennung in drei Phasen, wobei die RNA ausschließlich in der oberen Phase vertreten ist, während DNA und Protein in der unteren und Interphase vorhanden sind. Die Isolation von RNA aus Geweben erfolgte laut Herstellerprotokoll unter Zuhilfenahme eines Plastik-Pistills. Die Extraktion von RNA aus Zellkulturen erfolgte nach Protokoll, lediglich die Zentrifugationsschritte bei 12000 rpm wurden abgeändert: Phasentrennung für 30 min und RNA-Präzipitation für 45 min bei 6000 rpm. Auf den Waschschrift mit Ethanol wurde verzichtet, da die kleinen miRNA-Moleküle ebenfalls mit dem Ethanol gewaschen werden.

### **5.4.2. Northern Blot**

Ziel des Northern Blots ist es, in einer Gelelektrophorese nach der Größe aufgetrennte RNA-Fragmente auf einer Membran zu fixieren, um später durch Hybridisierung mit einer markierten Sonde spezifisch einzelsträngige RNA-Fragmente nachweisen zu können. Die Sonde ist ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül, welches komplementär zur spezifischen Sequenz ist und die immobilisierte RNA aufgrund homologer Basenpaarung bindet. Zum Nachweis kann die Sonde radioaktiv (z.B. radioaktives Phosphor) oder nicht-radioaktiv (z.B. Digoxigenin) markiert sein.

#### **5.4.2.1. Herstellung des Polyacrylamidgels und Gelelektrophorese**

Zur Herstellung von 12%igen Polyacrylamidgelen wurde das SequaGel® Kit (National Diagnostics) benutzt. Die Lösungen enthalten neben Acrylamid und Bisacrylamid noch Harnstoff, um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandert die RNA aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im Gel in Richtung Anode, wobei größere Moleküle aufgrund der Vernetzung des Gels langsamer durch das Gel wandern als kleinere. Die Zusammensetzung eines 12%igen Gels ist nachfolgend dargestellt:

---

<b><i>Polyacrylamidgel für RNA:</i></b>	24 ml SequaGel® konzentriert
	21 ml SequaGel® verdünnt
	5 ml SequaGel® Puffer
	400 µl APS (10 %)
	20 µl TEMED

Nach Zusammenpipettieren der verschiedenen Komponenten wurde der Ansatz zwischen zwei durch Abstandhalter voneinander getrennte Glasplatten (24 cm x 16,5 cm), die zuvor mit 1%iger Agarose abgedichtet wurden, gegossen und ein Kamm für 16 Taschen eingefügt. Um die Taschen des Gels beladen zu können, wurden die RNA-Proben vorher mit 5 µl 2x Bromphenolblau-Ladepuffer versetzt. Nach der Elektrophorese für ~3 h bei 15 Watt wurde die RNA für ca. 1 min in einer Ethidiumbromidlösung (10 µl Ethidiumbromid-Stammlösung [10 mg/ml] in 1x TBE) angefärbt und mit einem Geldokumentationssystem bei einer Wellenlänge von 254 nm dokumentiert.

#### **5.4.2.2. RNA Transfer**

Der RNA-Transfer auf eine neutrale Nylonmembran (Hybond™-N+, Amersham) erfolgte mit Hilfe einer Semi-dry-blotting-Apparatur (Star Lab GmbH). Hierzu wurden fünf Lagen in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> getränktes Filterpapier auf die Anode gelegt, gefolgt von der Hybond™-N+ Membran, dem Gel und fünf weiteren Lagen getränktes Filterpapier. Nach Befestigen der Kathode erfolgte das Blotting der RNA auf die Membran für 30 min bei 15 V. Eine Möglichkeit, besonders kleine RNA-Moleküle wie miRNAs auf Nylonmembranen zu fixieren, ist sie chemisch zu behandeln (Pall and Hamilton, 2008). Dazu wurde eine 0,16 M EDC Lösung in 0,13 M 1-Methylimidazol durch Lösen von 245 µl Imidazol in H<sub>2</sub>O, dem anschließenden Mischen mit 0,75 g EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimide) und durch Auffüllen auf 24 ml mit H<sub>2</sub>O hergestellt. Drei Lagen Whatman-Papier wurden damit getränkt, die Membran aufgelegt, mit Frischhaltefolie luftdicht verpackt und für 1-2 h bei 55 °C inkubiert.

#### **5.4.2.3. Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde**

Zum Nachweis der RNA im Northern Blot wurde in dieser Arbeit eine radioaktiv markierte, einzelsträngige RNA-Sonde verwendet. Diese wurde mit Hilfe des

mirVana™ miRNA Probe Construction-Kit (Ambion) generiert. Zunächst bestimmte man ein DNA-Oligo, welches der Sequenz der nachzuweisenden microRNA entsprach und am 3'-Ende zusätzlich eine 8 nt lange Sequenz (5'-CCTGTCTC-3') enthielt, die mit dem T7-Promotor hybridisieren kann. Somit konnte nach Hybridisierung des Templates mit dem T7-Promotor mit Hilfe des Exo-Klenow Enzyms ein doppelsträngiges DNA-Template hergestellt werden.

**Hybridisierung:**

- 2 µl T7-Promotor-Primer (100 µM)
- 2 µl Oligo-Template (100 µM)
- 6 µl Hybridisierungspuffer

Die Hybridisierung von Template und Primer erfolgte durch Erhitzen auf 70 °C für 5 min und anschließender Inkubation bei RT für ebenfalls 5 min. Zu den hybridisierten Oligonukleotiden wurde der folgende Reaktionsmix gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert:

**Klenow-Reaktionsansatz:**

- 2 µl 10x Klenow Reaction Buffer
- 2 µl 10x dNTP Mix
- 4 µl Nuclease-free Water
- 2 µl Exo-Klenow

Zur Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde wurde in der folgenden *in vitro* Transkription mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase radioaktiv markiertes UTP eingesetzt. Die Transkription wurde nach folgendem Schema bei RT pipettiert, gemischt, abzentrifugiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert.

***In vitro* Transkription:**

- 1 µl dsDNA Template
- 2 µl 10x Transkriptions Puffer
- 1 µl 10 mM ATP
- 1 µl 10 mM CTP
- 1 µl 10 mM GTP
- 5 µl gelabeltes UTP (<sup>32</sup>P)
- 2 µl T7-RNA-Polymerase
- ad 20 µl mit Nuklease-freiem Wasser

Anschließend wurde die nicht transkribierte Template-DNA im Ansatz durch Zugabe von 1 µl DNaseI für 10 min bei 37 °C verdaut. Diese radioaktiv markierte Sonde wurde direkt im Northern Blot eingesetzt.

#### 5.4.2.4. Spezifischer Nachweis von RNA

Im ersten Schritt erfolgte die Prähybridisierung der Membran mit ~30 ml Hybridisierungspuffer für 30 min in einem Glaszylinder auf einem Drehrad in einem Wärmeschrank bei 50 °C. Um alle Bestandteile der Hybridisierungslösung in Lösung zu bringen, muss sie zunächst bei 50 °C aufgewärmt werden. Nach der Prähybridisierung wurde die radioaktiv markierte Sonde, die spezifisch gegen eine RNA-Sequenz gerichtet war, in den Hybridisierungspuffer gegeben und über Nacht auf dem Drehrad bei 50 °C mit der Membran inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung mit der Sonde entfernt und der Blot zunächst zweimal für je 15 min mit 30 ml eines Hochsalzpuffers (5x SSC/ 0,1 % SDS) und anschließend mit einem Puffer niedrigeren Salzgehalts (1x SSC/ 0,1 % SDS) bei 50 °C gewaschen. Zur Analyse wurde der Blot über Nacht auf einer Phosphorscreenplatte exponiert und diese anschließend mit einem Phosphoimager™-Typhoon (Molecular Dynamics) gescannt. Eine Quantifizierung der Bandenschwärzung erfolgte mit der Software Image-Quant (Version 3.3).

#### 5.4.3. cDNA-Synthese

Um die Expression von Genen in einer späteren Real-Time PCR analysieren zu können, musste aus der RNA zunächst cDNA hergestellt werden.

Mögliche Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA wurden durch einen DNaseI Verdau beseitigt.

**DNaseI-Verdau:**

- 2 µg RNA
- 2 µl DNaseI (amplification grade)
- 2 µl 10x DNaseIReaction-Buffer
- ad 20 µl RNase freies Wasser

Nach einer 15minütigen Inkubation bei RT wurde die Reaktion mit 2 µl 25 mM EDTA für 10 min bei 65 °C abgestoppt.

Um miRNAs in revers transkribieren zu können, mussten diese zunächst mit Hilfe des Poly(A)-tailing-Kit (Ambion) mit einem Poly(A)-Schwanz versehen werden. Die Reaktion erfolgte für 1h bei 37 °C.

**Poly(A)-tailing:**

- 22 µl RNA
- 6 µl Nuklease-freies Wasser
- 10 µl 5x E-Pap-Puffer
- 5 µl MnCl<sub>2</sub>
- 5 µl ATP
- 2 µl E-PAP

Um störende Enzyme für die sich anschließende reverse Transkription zu entfernen, wurde die polyadenylierte RNA über TriFast™ aufgereinigt. Die eigentliche reverse Transkription erfolgte schließlich mit Hilfe des cDNA-Synthesis-Kit von Invitrogen unter der Verwendung eines spezifischen PolyT-VN-Adapter-Primers (Shi and Chiang, 2005).

**Reverse Transkription:**

- 8,5 µl polyadenylierte RNA
- 0,5 µl PolyT-VN-Adapter-Primer
- 1 µl 10 mM dNTP mix
- 5 min bei 65 °C, 1 min auf Eis abkühlen

- 2 µl 10x RT-Puffer
- 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 2 µl 0,1 M DTT
- 1 µl RNaseOUT™
- 1 µl SuperScript™ III RT

Nach einer 50minütigen Inkubation bei 50 °C wurde die Reaktion für 5 min bei 85 °C beendet und auf Eis abgekühlt. Durch Zugabe von 1 µl RNaseH und einer Inkubation für 20 min bei 37 °C wurde die restliche RNA abgebaut. Die cDNA wurde in der nachfolgenden Real-Time PCR 1:10 eingesetzt oder dauerhaft bei -20 °C gelagert.



## 5.5. Quantitative Real-Time PCR

Um eine quantitative Aussage über die Expression von miRNAs bzw. mRNAs zu machen, bediente man sich der quantitativen Real-Time PCR. Diese basiert auf der herkömmlichen PCR, ermöglicht jedoch eine Quantifizierung der amplifizierten cDNA.

### 5.5.1. qRT-PCRs für miRNAs mit SYBRGreen

Die quantitative Real-Time PCR zum Nachweis von miRNAs wurde mit dem LightCycler-Karussell-System<sup>TM</sup> unter Verwendung des „LightCycler FastStart DNA Master PLUS SYBRGreen I“-Kit von Roche durchgeführt. Der LightCycler ermöglicht durch Verwendung von Glaskapillaren als Reaktionsgefäße ein wesentlich effizienteres Heizen und Abkühlen mittels Luft, wodurch die PCR von ~3,5 h auf ~45 min abgekürzt werden kann. Die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBRGreen, der an doppelsträngige DNA bindet und im gebundenen Zustand fluoresziert, ermöglicht nach jedem Amplifikationsschritt die Bestimmung der Fluoreszenz und damit der Menge an amplifizierter DNA in „Echtzeit“. Nach dem letzten Extensionsschritt können mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse die PCR-Produkte analysiert werden. Durch schrittweise Erhöhung der Temperatur von 55 °C auf 95 °C wird der amplifizierte DNA-Doppelstrang denaturiert, so dass wieder Einzelstränge vorliegen und die Fluoreszenzintensität nach und nach abnimmt. Da jedes Produkt einen spezifischen Schmelzpunkt aufweist, können so unspezifische Nebenprodukte identifiziert werden. In Tabelle 10 ist ein typischer Real-Time PCR Ansatz für eine LightCycler-Kapillare dargestellt. Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe eines spezifischen 5'-miRNA-Primers und eines 3'-Primers, der an die Adaptersequenz des in der cDNA-Synthese eingesetzten PolyT-VN-Adapters bindet.

**Tabelle 10: Pipettierschema zum quantitativen Nachweis von miRNAs mittels SYBRGreen I**

Komponente	Volumen	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	9 µl	
5'-Primer	1 µl	0,5 µM
3'-Primer	1 µl	0,5 µM
5x Master Mix	4 µl	1x
cDNA 1:10 verd.	5 µl	

Das zur Amplifizierung eingesetzte Programm ist in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11: Programm zur Amplifizierung von miRNAs mittels LightCycler**

Acquisitionsmodus	Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Slope
nein	1	Preinkubation	95 °C	10 min	20 °C/s
nein nein einmal	55	Amplifikation Denaturierung Annealing Extension	95 °C 68 °C 72 °C	10 s 5 s 6 s	20 °C/s 20 °C/s 5 °C/s
kontinuierlich		Schmelzkurve	95 °C 55 °C 95 °C	15 s	20 °C/s 20 °C/s 0,1 °C/s
nein	1	Abkühlen	40 °C	30 s	20 °C/s

### 5.5.2. qRT-PCRs für mRNAs mit Hilfe der Universal ProbeLibrary

Die quantitative Analyse von mRNAs wurde ebenfalls mit dem LightCycler-Karussell-System™ durchgeführt. Hierbei wurde jedoch nicht SYBRGreen als fluoreszierender Farbstoff zur Detektion verwendet, sondern Sonden der Universal ProbeLibrary von Roche. Diese basiert auf 165 verschiedenen, kurzen Hydrolyse-Sonden, die am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (TAMRA) gelabelt sind. Solange die Sonde intakt ist, absorbiert der Quencher das Fluoreszenzsignal des Farstoffes. Bindet die gelabelte Sonde während der PCR spezifisch an eine Sequenz, führt die 5'-Nuklease-Aktivität der Polymerase zum Abbau der Sonde. Aufgrund der dadurch entstehenden räumlichen Trennung von Fluoreszenzfarbstoff und „Quencher“ kommt es zur Emission von Fluoreszenzlicht, welches im LightCycler detektiert werden kann. Nachfolgende Tabelle zeigt das Pipettierschema eines typischen PCR-Ansatzes.

Tabelle 12: PCR-Ansatz für die Amplifikation von cDNA mittels Universal ProbeLibrary

Komponente	Volumen	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	4,4 µl	
MgCl <sub>2</sub> 25mM	3,2 µl	4 mM
10x Taq-Puffer	2 µl	1x
TE-SS 40 ng/µl	1 µl	2 ng/µl
DMSO konz.	1 µl	5 %
Tween 20 10%	1 µl	0,5 %
BSA 20 ng/µl	0,5 µl	0,5 ng
dNTPs 10 mM	0,4 µl	200 nmol
Sonde 1 µM	0,5 µl	20 nmol
5'-Primer 10 µM	0,5 µl	250 nmol
3'-Primer 10 µM	0,5 µl	250 nmol
Taq-Polymerase	0,1 µl	0,5 U
cDNA 1:10 verd.	5 µl	

Für alle Primerpaare wurde folgendes Programm zur Amplifikation der cDNA verwendet:

Tabelle 13: PCR-Programm zur Amplifizierung von cDNA mit Hilfe der Universal ProbeLibrary

Acquisitionsmodus	Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Slope
nein	1	Preinkubation	95 °C	10 min	20 °C/s
nein	1	Touch-Down			
		Denaturierung	95 °C	5 s	20 °C/s
		Annealing	65 °C	5 s	20 °C/s
		Extension	62 °C	10 s	5 °C/s
nein nein einmal	55	Amplifikation			
		Denaturierung	95 °C	15 s	20 °C/s
		Annealing	55 °C	30 s	20 °C/s
		Extension	62 °C	30 s	20 °C/s
nein	1	Abkühlen	40 °C	30 s	20 °C/s

### 5.5.3. Relative Quantifizierung

Um die Menge exprimierter miRNAs bzw. mRNAs zwischen zwei Geweben miteinander zu vergleichen, bediente man sich der relativen Quantifizierung. Diese kann mit Hilfe eines internen Standards, 5.8sRNA für miRNAs und GAPDH für mRNAs, und der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode bestimmt werden.

$$\frac{E_{(\text{Test})}^{\Delta\text{Ct}(\text{Test})}}{E_{(\text{Kontrolle})}^{\Delta\text{Ct}(\text{Kontrolle})}} = \text{Expressionsänderung}$$

Dazu musste allerdings zunächst die Effizienz der verwendeten Primer errechnet werden. Dies erfolgte durch das Messen einer vierstufigen cDNA-Verdünnung. Die Effizienz ist der reziproke Wert zur Steigung der aus den Ct-Werten der Verdünnungsreihe resultierenden Regressionsgerade:

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

## 5.6. Luciferase-Assays

Luciferase-Assays sind Reporterassays, die es ermöglichen Genexpression und zelluläre Abläufe zu untersuchen. Man macht sich dabei die Eigenschaft der Firefly- bzw. Renilla-Luciferase zu nutze, Luciferin in Anwesenheit von O<sub>2</sub>, ATP und Mg<sup>2+</sup> bzw. Coelenterazine durch die Anwesenheit von O<sub>2</sub> in Licht umzuwandeln.

### 5.6.1. Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assays

Mit Hilfe des dualen Assays kann in einem einzigen Assay die Aktivität der Firefly- und der Renilla-Luciferase bestimmt werden. Man misst zunächst die Aktivität der Firefly-Luciferase durch die Zugabe des Firefly-spezifischen Substrats. Nach Messen der Lichtemission mit Hilfe eines Luminometers wird die Reaktion abgestoppt, gleichzeitig ein Substrat für die Renilla-Luciferase zur Verfügung gestellt und erneut die Lichtemission bestimmt. In dieser Arbeit wurde der Vektor pMIR-RNL-TK eingesetzt, der es ermöglicht, eine spezifische Sequenz direkt hinter das für die Firefly-Luciferase kodierende Gen zu klonieren und somit einen Einfluss auf diese Sequenz mit Hilfe der Luciferase-Aktivität zu bestimmen. Der Vektor kodiert zusätzlich für die Renilla-Luciferase, deren Expression allerdings unabhängig von der klonierten Sequenz ist und der Normalisation innerhalb eines Experimentes dient. Zunächst wurden 1x10<sup>5</sup> 293T-Zellen in 24-Lochplatten ausgesät. Nach einem Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit Hilfe von Nanofectin laut dem Herstellerprotokoll. Transfiziert wurden je 0,8 µg pSG5-basiertes Effektorplasmid und 0,2 µg Reporterplasmid. 48 h nach Transfektion wurden die Lysate laut Protokoll des Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assays hergestellt. Zur Messung wurden diese

anschließend noch 1:100 mit 1x PLB verdünnt. Nach Vorlage von 50 µl LARII wurden 10 µl Zelllysate hinzugegeben und die Lumineszenz mit Hilfe eines Luminometers (Berthold Technologies GmbH & Co.KG) für 10 s bestimmt. Durch Zugabe von 50 µl Stop+Glo wurde die Firefly-Aktivität gestoppt. Da Stop+Glo gleichzeitig das Substrat für die Renilla-Luciferase enthält, konnte im nächsten Schritt durch Lumineszenz die Renilla-Luciferase-Aktivität bestimmt werden. Zur Auswertung der Luciferase-Assays wurde zunächst die Aktivität der Firefly mit der Renilla-Aktivität normalisiert. Anschließend wurden zu vergleichende Werte zueinander in Bezug gesetzt. Als statistisches Hilfsmittel zum Überprüfen der Signifikanz der Abweichungen wurde der in der Software Sigma Plot 10.0 integrierte t-Test benutzt und p-Werte <0,05 als statistisch signifikant angesehen.

### 5.6.2. Luciferase-Assay System

Die Analyse von miRNA-Effekten auf die 3'UTR von CD44 erfolgte in dem Originalvektor pMIR (Ambion). Dieser Vektor ermöglicht ebenfalls die Klonierung von spezifischen Sequenzen hinter die kodierende Region der Firefly-Luciferase, kodiert aber nicht zusätzlich für die Renilla-Luciferase. Es wurden wieder  $1 \times 10^5$  293T-Zellen in 24-Lochplatten ausgesät. Um eine Normalisierung der Firefly-Aktivität zu ermöglichen, wurden die Zellen 24 h später neben 0,8 µg Effektorplasmid und 0,2 µg Reporterplasmid zusätzlich mit je 0,2 µg pEGFP-c1 transfiziert. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften von EGFP konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Transfektionseffizienz in jedem Ansatz bestimmt und zur Normalisierung eingesetzt werden. Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion das Luciferase-Assay System von Promega verwendet. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen zunächst mit 100 µl Trypsin/EDTA gespült und anschließend bei 37 °C mit 100 µl Trypsin/EDTA vom Boden gelöst und vereinzelt. Die Reaktion wurde nach ~5 min mit 900 µl serumhaltigem Medium abgestoppt und die Zellen für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 500 µl PBS aufgenommen. 100 µl der Zellsuspension wurden zur späteren Messung im FACS mit 100 µl FACS-Puffer versetzt. Die restlichen Zellen wurden erneut pelletiert, anschließend in 100 µl 1x CCLR-Puffer gelöst und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zur Messung der Firefly-Luciferase-Aktivität wurden 10 µl des Überstandes mit 20 µl Luciferin gemischt und für 10 s im Luminometer (Berthold Technologies GmbH & Co.KG) gemessen.

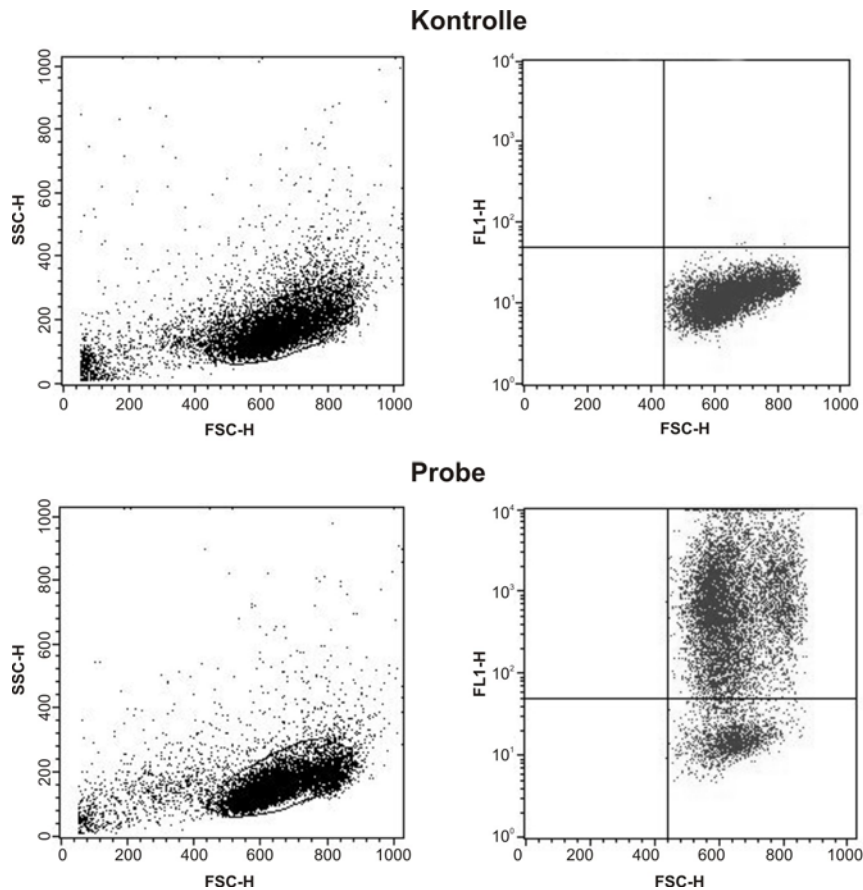
Die Auswertung erfolgte nach Bestimmung der Transfektionseffizienz in jedem Ansatz. Dabei wurde die Luciferase-Aktivität mit der jeweiligen Transfektionseffizienz normalisiert und zu vergleichende Werte anschließend zueinander in Bezug gesetzt. Als statistisches Hilfsmittel zum Überprüfen der Signifikanz der Abweichungen wurde der in der Software Sigma Plot 10.0 integrierte t-Test benutzt und p-Werte  $<0,05$  als statistisch signifikant angesehen.

## **5.7. Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen oder die Analyse von Streulicht- und/oder Fluoreszenzeigenschaften von Einzelzellen innerhalb einer Suspension. Die Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt, so dass sie beim Eintritt in die Messkammer einzeln einen Laser passieren. Durch Messen von Vorwärts- und 90°-Seitwärtsstreulicht können relative Größe und Granularität der Zellen bestimmt werden. Weiterhin kann die Fluoreszenz von Zellen im Anschluss an eine Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern durch einen Argon-Laser, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm erzeugt, angeregt werden. Das emittierte Licht wird über ein optisches System gemessen und kann in Form von Punktwolke-Diagrammen, Intensitätskurven oder Histogrammen dargestellt werden.

### **5.7.1. Bestimmung der Transfektionseffizienz**

Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit unter anderem zur Bestimmung der Transfektionseffizienz von Zellen eingesetzt. Dazu wurden 100  $\mu\text{l}$  der Zellen 48 h nach EGFP-Transfektion mit 100  $\mu\text{l}$  2%iger FACS-Fixierlösung versetzt und im FACScan™ (Becton Dickinson) analysiert. Die Messung eines jeweiligen Kontroll-Ansatzes (Heringssperma-DNA ohne EGFP) diente dazu, die lebende Population transfizierter Zellen im Punktwolkediagramm (Vorwärts-/90°-Seitwärts-Streulicht) von apoptotischen, nekrotischen Zellen oder Zelldebris zu unterscheiden und um einen Fluoreszenz-Nullwert zu bestimmen. Die EGFP-abhängige Fluoreszenz aller Proben wurde im Kanal FL1 gemessen (FSC-H/FL1-H) und anschließend die Zahl der EGFP transfizierten Zellen bzw. die relative Transfektionseffizienz ermittelt.



**Abbildung 11: Beispiel zur Transfektionsbestimmung mittels FACS**

Oben: Messung des Kontrollansatzes zur Definierung der lebenden Zellpopulation (links) und des EGFP-Hintergrundes (rechts). Unten: Messung eines EGFP-C1 transfizierten Ansatzes mit 80,94% Transfektionseffizienz (rechts)

### 5.7.2. Intrazelluläre Färbung von Proteinen zum durchflusszytometrischen Nachweis

Die Proteinexpression von IL1A wurde mittels intrazellulärer Färbung durch einen fluoreszenzgekoppelten Antikörper und Durchflusszytometrie bestimmt. Um intrazellulär Proteine färben zu können, muss zunächst die Zellmembran permeabilisiert werden, damit die Antikörper in die Zelle gelangen können. Zunächst wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro Farbe-Ansatz für 10 min abzentrifugiert (6 min bei 1200 rpm) und das Pellet mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation in 4 ml Lysing Solution (BD) pro Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen der Zellen mit 2 ml PBS+2%FKS gewaschen (6 min bei 1600 rpm) wurde das Zellpellet in 2 ml FACS-Puffer +0,1 % Saponin aufgenommen und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Saponin ist ein Protein aus der Rinde des Baumes *Quillaja saponaria*, das in der Lage ist die Zellmembran zu permeabilisieren ohne ihre Morphologie zu verändern (Jacob et al.,

1991) und so im Anschluss den Eintritt von Antikörpern in die Zellen ermöglicht. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 6 min bei 1600 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 10 µl Antikörper und dem restlichen Überstand gemischt und für 30-45 min bei RT im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml PBS+2 %FKS gewaschen und in 150 µl FACS-Fix aufgenommen. Bis zur Analyse der Zellen im Durchflusszytometer wurden die Zellen im Dunklen bei 4 °C aufbewahrt. Unmarkierte Zellen und Zellen, welche mit einem Isotypspezifischen Antikörper angefärbt wurden dienten dazu unspezifische Signale ausschließen zu können. Die Detektion der PE-gelabelten Antikörper erfolgte im Kanal FL-2 des Durchflusszytometers.

## 5.8. Proteintechniken

### 5.8.1. Herstellen von Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen

(Maniatis, 1989)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gesamtzellextrakte aus adhärennten Zellen und Suspensionszellen mit Hilfe eines 2x Sample-Buffers hergestellt. Dieser enthält zum einen 3-Mercapto-1,2-Propanediol, welches Disulfidbrücken reduziert und somit die Tertiärstrukturen von Proteinen auflöst. Das im Puffer ebenfalls enthaltene SDS löst Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine und sorgt bei allen Proteinen für ein gleiches Masse-/Ladungsverhältnis. Somit ist das Laufverhalten der Proteine im SDS-Gel während der Elektrophorese nicht mehr abhängig von der eigenen Ladung, sondern nur noch von ihrer Größe.

Zunächst wurden die Zellen für 10 min bei 1200 rpm und 4 °C pelletiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Das erhaltene Zellpellet wurde zunächst auf Eis in 2x Sample-Buffer resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung für ~5 s aufgeschlossen und die Proteine für 5-10 min bei 98,5 °C denaturiert. Abschließend wurde die Proteinlösung für 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert, um nicht lösliche Zellbestandteile zu sedimentieren. Die Konzentration der Proteine im Überstand wurde durch Messen der OD 280 nm einer 1:100 Verdünnung in 0,1 N NaOH mit einem Photometer bestimmt. Um die Proteinmenge zu berechnen, die in der Gelelektrophorese eingesetzt werden sollte, wurde folgende Formel verwendet:



---

$$\frac{6,4}{OD_{280}} = 30 \mu\text{g Protein}$$

Das Ergebnis der Formel ist gleich der Menge des Extraktes in  $\mu\text{l}$ , die 30  $\mu\text{g}$  Protein entspricht. Die proteinhaltige Lösung wurde bis zur Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 5.8.2. SDS-PAGE

(Laemmli, 1970; Maniatis, 1989)

In einer SDS-Gelelektrophorese lassen sich Proteine aufgrund der denaturierenden Bedingungen innerhalb eines Polyacrylamidgels hauptsächlich aufgrund ihrer Masse auftrennen. Das Detergens SDS, welches sich im Puffer, im Polyacrylamidgel und im Probenpuffer im Überschuss befindet, lagert sich an die Proteine an und löst dadurch beinahe alle nichtkovalenten Wechselwirkungen innerhalb der nativen Proteine. Zur Reduktion von Disulfidbrücken dient Mercaptoisopropanol im Probenpuffer. Jedes SDS-Anion bindet zwei Aminosäurereste, wodurch das Protein in etwa proportional zu seiner Masse negativ geladen wird und die Eigenladung des Proteins somit vernachlässigbar ist. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes ist dadurch die Wanderung der Proteine zur Anode gewährleistet. Polyacrylamidgele entstehen durch Polymerisation von Acrylamid, welches über Methylenbisacrylamid quervernetzt wird. Diese Reaktion wird durch APS gestartet und durch TEMED katalysiert. Die Laufstrecke der Proteine in einem Gel geeigneter Porengröße ist zum Logarithmus ihres Molekulargewichts proportional. Die Porengröße der Gelmatrix ist abhängig vom eingesetzten Mischungsverhältnis aus Acrylamid und Bisacrylamid. Eine diskontinuierliche Gelelektrophorese, bestehend aus zwei aufeinander folgenden Gelsystemen mit unterschiedlichen Porengrößen, ermöglicht eine hohe Auflösung der Trennung. In einem grobporigen Sammelgel (Uppergel) konzentrieren sich die Proteine zunächst in einer einheitlichen Lauffront, während die eigentliche Auftrennung erst im nachfolgenden feinporigen Trenngel (Bottomgel) erfolgt.

### 5.8.3. Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels und Gelelektrophorese

Um ein SDS-Polyacrylamidgel herzustellen, wurde zunächst das Trenngel zwischen zwei abgedichtete Glasplatten (14,5x16,5 cm), die durch einen Teflon-Abstandhalter voneinander getrennt waren, gegossen und mit Wasser<sub>bidest</sub> überschichtet. Nach

Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und einen Teflonkamm zur Aussparung der Taschen eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war, wurden Teflonkamm sowie unterer Abstandhalter entfernt und das Gel senkrecht in eine Elektrophoresekammer gespannt. Die Proteinproben und 15 µl eines „Low Molecular Weight“-Markers, der zur Größenbestimmung der Proteine in den zu untersuchenden Proben diente, aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte im Sammelgel bei 25 mA und im Trenngel bei 35 mA für insgesamt ca. 2 h.

**Tabelle 14: Komponenten für ein 10%iges Polyacrylamidgel**

Komponente	Sammelgel	Trenngel	
		10 %	12,5 %
Sammel-/Trenngelstock	1,25 ml	4,0 ml	4,0 ml
Acrylamid (30%)	750 µl	5,3 ml	6,7 ml
Bisacrylamid (2%)	300 µl	2,12 ml	2,68 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	2,7 ml	4,58 ml	2,62 ml
APS (10%)	50 µl	140 µl	140 µl
TEMED	20 µl	14 µl	14 µl

#### 5.8.4. Western Blot

Beim Western Blotting werden zuvor in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine auf eine Membran übertragen und bei niedriger Ionenstärke über hydrophobe Wechselwirkungen auf dieser immobilisiert. Die Immunreaktivität der Proteine bleibt dabei weitgehend erhalten und die Proteine sind leichter zugänglich für den Nachweis durch spezifische Primär- und gekoppelte Sekundärantikörper durch chemische Lumineszenz. Der Aufbau des Western Blots erfolgte luftblasenfrei in einem PVC-Gitter in folgender Reihenfolge: ein Wattetuch, zwei Whatman-Papiere, das Polyacrylamidgel, die Protran™-Nitrocellulose-Membran (Schleicher&Schuell), zwei Whatman-Papiere und wieder ein Wattetuch. Der Transfer wurde in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer (LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit) für 1,5 h bei 330 mA durchgeführt. Nach der unspezifischen Anfärbung der Proteine mit PonceauS™ (Sigma-Aldrich), wurde die Markerspur abgetrennt und separat für 15 min in einer Amidoschwarz-Lösung angefärbt und anschließend mit Entfärberlösung entfärbt. Die Membran wurde zunächst 30 min in 5%iger PBS-Milch geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran mit den entsprechenden Antikörpern in 2-5 ml

Milch (5 % in PBS) luftblasenfrei in einer Klarsichthülle eingeschweißt und ü.N. bei 4 °C auf einem Taumler inkubiert. Am nächsten Tag wurden nicht gebundene Antikörper durch Waschen der Membran mit PBS für 3x 15 min entfernt. Um die gebundenen Erstantikörper nachzuweisen, erfolgte anschließend die Inkubation mit einem gegen den Erstantikörper gerichteten Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (1:5000 in 5 % PBS-Milch) für 1 h bei 4 °C auf einem Schüttler. Nach drei weiteren Waschschrritten von 15 min in PBS-Puffer wurden die Antikörpermarkierten Proteine mit Hilfe einer enzymkatalysierten ECL-Lichtreaktion (Enhanced Chemoluminescence) detektiert. Durch die Zugabe von 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu 10 ml ECL-Lösung wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziert und Luminol gleichzeitig oxidiert. Dies hat eine Lichtemission der Wellenlänge  $\lambda=428$  nm zur Folge, welche durch Auflegen eines blaulichtempfindlichen ECL-Films (Hyperfilm ECL™, Amersham) dokumentiert wurde. Anschließend erfolgten Entwicklung, Fixierung und Trocknen des Filmes.

#### **5.8.5. ELISA**

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA) ist ein immunologischer Assay, der zum Nachweis von Proteinen dient und auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Dabei macht man sich die Eigenschaft von Antikörpern zu Nutze, spezifisch Antigene zu binden. In dieser Arbeit kam der sogenannte Sandwich-ELISA zum Einsatz, der eine Quantifizierung von spezifischen Antigenen erlaubt. Nach Inkubation der Probe, die das nachzuweisende Antigen enthält, in einer zuvor mit spezifischen Antikörpern gekoppelten Mikrotiterplatte, erfolgte die Zugabe bzw. Bindung eines ebenfalls gegen das Antigen gerichteten Antikörpers. Dieser ist an ein Enzym gekoppelt, welches die anschließende Detektion nach Zugabe eines Substrats ermöglicht. Zum Nachweis von IL1A in Zellkultur-Überständen wurde das Human IL-1 $\alpha$ /ILF1 Duo Kit (R&D Systems) eingesetzt. Der Überstand von miR-142 bzw. Kontrollvektor-transfizierten HaCaT-Zellen wurde für 8 min bei 3000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand wurde bis zur Verwendung bei -80 °C weggefroren. Der Assay wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Vom Überstand wurden je 100 µl unverdünnt zur Messung eingesetzt. Der Standard wurde in einer Verdünnungsreihe ausgehend von 1000 pg/ml bis zu 3,9 pg/ml eingesetzt. Die Messung des ELISA erfolgte mit einem Multiplate Reader Victor X™ (Perkin Elmer) bei 450 nm und einer

---

Wellenlängenkorrektur bei 550 nm. Die Auswertung erfolgte mit der Software WorkOut 2.5, wobei die Standardkurve mit der 4-Parameter Methode erstellt wurde.

## **5.9. Herstellung der cDNA-Banken**

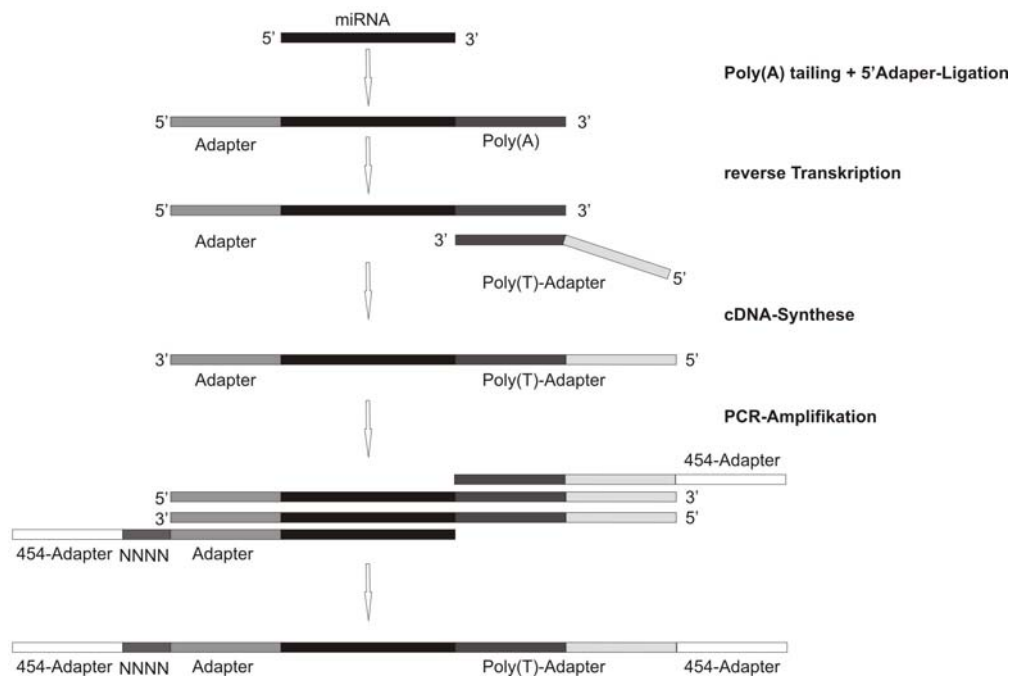
Die Herstellung der cDNA-Banken aus Gewebe erfolgte durch die Firma vertis Biotechnologie AG (Freising), soll aber im Folgenden kurz dargestellt werden. Die eigentliche Sequenzierung wurde von der Firma 454 Life Sciences (Branford) durchgeführt.

### **5.9.1. Isolierung der kleinen RNA-Fraktion aus Gewebe**

Die kleine RNA-Fraktion wurde mit dem mirVana miRNA isolation kit (Ambion) isoliert, in einem denaturierenden 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit SYBRgreenII angefärbt. Die RNAs mit einer Länge von 15-40 Basen wurden passiv aus dem Gel eluiert, mit Ethanol präzipitiert und in Wasser gelöst.

### **5.9.2. cDNA-Synthese**

Die Abfolge der Reaktionen ist schematisch in Abbildung 12 dargestellt und soll nachfolgend erläutert werden. Zunächst wurden die RNA-Moleküle mittels Poly(A)-Polymerase mit einem 3'-Poly(A)-Schwanz versehen und anschließend am 5'-Ende mit einem RNA-Adapter ligiert. In der darauffolgenden Reaktion erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Poly(T)-Adapter-Primer und der M-MLV-RNaseH<sup>-</sup> die Erststrang-Synthese. Mit Hilfe von spezifischen 454-Adaptoren schloss sich daran eine PCR-Amplifikation der resultierenden cDNA zu einer Konzentration von rund 30 ng/µl an.



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Reaktionsabläufe von der RNA bis hin zur Sequenzierung**

Folgende Adaptersequenzen mit einer Länge von insgesamt 104 Basen flankierten die cDNA-Inserts (siehe Tabelle 15), was einer Gesamtlänge von 120-145 bp entspricht.

**Tabelle 15: Übersicht über die während der Vorbereitung zur 4-5-4-Sequenzierung addierten Adaptersequenzen**

Adapter	Sequenz
5'-Adapter	GACCTTGGCTGTCACTCA
5'-454-Adapter	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCT
Poly(T)-Adapter	ACGAGACATCGCCCCGC(T) <sub>25</sub>
3'-454-Adapter	GCCTTGCCAGCCCGCTCAG

Der 5'-Adapter beinhaltet außerdem noch eine sogenannte „Barcode-Sequenz“, die es ermöglichte bei der Sequenzierung die Zugehörigkeit der Sequenz zu den verschiedenen cDNA-Bank zu bestimmen (siehe Tabelle 16).

**Tabelle 16: Eingesetzte Barcodesequenzen zur Identifizierung der entsprechenden cDNA-Banken**

cDNA-Bank	Barcode
Thymus	CTG
EBV-	GTGA
EBV+	CAGC

### 5.10. Auswertung der Sequenzdaten

Die Auswertung der nach der 454-Sequenzierung erhaltenen Sequenzen erfolgte mit Hilfe einer etwas abgeänderten Version von Makros, die von Jiayun Zhu entwickelt wurden.

#### 5.10.1. Generierung einer miRNA-Datenbank

Zunächst musste eine miRNA-Datenbank geschaffen werden, mit der die Sequenzdaten später verglichen werden sollten. Dazu wurden die Dateien `mature.fa.gz` bzw. `maturestar.fa.gz` von der Internet-Seite <http://mirbase.org/sequences/ftp.shtml> heruntergeladen und in eine Excel-Tabelle kopiert. Mit Hilfe des Makros „Database reconstruction“ wurden miRNA-Name und Sequenz in zwei Spalten aufgeteilt, so dass im Anschluss eine neue Tabelle, die nur die humanen miRNA Sequenzen erhielt, geschaffen werden konnte. Die Namen der miRNAs wurden vereinfacht („Rename“) und eine neue Spalte mit der DNA-Sequenz der microRNAs hinzugefügt. Um eine spätere Annotierung der miRNAs in den Banken zu ermöglichen, wurden alle A's in der Sequenz gelöscht.

#### 5.10.2. Entfernen von Adaptersequenzen und Poly(A)-Schwanz

Die Sequenzdaten wurden in einem Rich-Text-Format ausgegeben und zunächst in Excel-Tabellen kopiert. Die verschiedenen Sequenzen enthielten noch die Barcodesequenz, sowie die 5'-Adaptersequenz und den 3'-Poly(A)-Schwanz. Um die 5'-Adaptersequenz bzw. den Barcode mit einer Gesamtlänge von 23 Basen für Thymus und 24 Basen für die Tumore zu entfernen, wurde die jeweilige Länge der Sequenz bestimmt und mit Hilfe des Makros „DE\_TAG“ die ersten 23 bzw. 24 Basen gelöscht. Alle in der Sequenzierung nicht lesbaren Basen „N's“ wurden ebenfalls

entfernt. Um die restlichen, oft unterschiedlichen langen Poly(A)-Sequenzen zu löschen, wurde an das 3'-Sequenzende ein „Z“ angehängt und alle „AZ“ entfernt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis alle am 3'-Ende freistehenden „A's“ gelöscht waren.

### **5.10.3. Vereinfachen der Sequenz-Banken**

Um die Sequenz-Banken später mit der miRNA-Datenbank vergleichen zu können, wurde diese zunächst vereinfacht. Die Durchführung des Makros „SAME\_READ“ im Anschluss an das alphabetische Sortieren der Sequenzen ermöglichte die Aufsummierung aller „gleichen“ Sequenzen.

Es ist bekannt, dass die mittels 454-Sequenzierung erhaltenen Sequenzen oft zusätzliche „A's“ aufweisen, die die Identifizierung der Sequenzen stören. Deshalb wurden im nächsten Schritt alle in der Sequenz vorkommenden „A's“ gelöscht. Dies vereinfacht zwar die Sequenzannotierung, generiert aber viele falsch-positive Annotierungen, die später überprüft werden müssen. Mit Hilfe des Makros „MERGE\_deA“ wurde eine Tabelle erschaffen, die für jede Sequenz ihre vorkommende Anzahl sowie ihre Abfolge mit und ohne „A's“ angab.

### **5.10.4. Sequenz Vergleich**

Die eigentliche Identifizierung der Sequenzen erfolgte durch das Makro „ANNOTATION“, welches die unbekannt Sequenzen (ohne „A“) mit der miRNA-Datenbank (Sequenzen ohne „A“) Base für Base vergleicht und Übereinstimmungen erkennt. Da miRNA Sequenzen oft dazu tendieren, am 5'- bzw 3'-Ende degradiert oder modifiziert zu sein, wurden die Bedingungen der Annotierung so gewählt, dass beim Abgleich die ersten beiden bzw. beiden letzten Basen der miRNA aus der Datenbank vernachlässigt wurden. Aufgrund der wenig stringenten Bedingungen, kam es wieder zu vielen falsch positiven, die später von Hand erkannt und eliminiert werden mussten.

### **5.10.5. Manuelle Überprüfung der Annotationen**

Wie bereits erwähnt kam es aufgrund der niedrig stringenten Bedingungen der Makros zu verhältnismäßig wenigen falsch negativen, jedoch vielen falsch positivten Annotierungen. Deshalb wurde eine Tabelle geschaffen, die alle Sequenzen, ihre

jeweilige Anzahl, ihre Sequenz mit und ohne „A“, sowie die jeweilige Annotierung enthält. Dazu wurden die identifizierten miRNA-Namen, die durch Vergleich der Sequenzen „ohne A“ erhalten wurden, auf die jeweiligen Sequenzen mit „A“ übertragen. Bei der manuellen Überprüfung der Annotierungen ohne „A“ galt es zu überprüfen, ob die jeweilige Sequenz mit „A“ ebenfalls der miRNA entsprach. Dies erfolgte unter Zuhilfenahme der miRNA-Datenbank und der Such-Funktion der miRNA-Sanger-Datenbank (<http://www.mirbase.org/search.shtml>).

Die nicht annotierten Sequenzen wurden zunächst ebenfalls manuell nach möglicherweise nicht erkannten miRNAs durchsucht, da Sequenzierfehler, z.B. häufig bei Basenwiederholungen, ebenfalls zu falsch negativen Ergebnissen führen können.

#### **5.10.6. Identifizierung von ncRNAs und neuen miRNAs**

In den übriggebliebenen, Nicht-miRNA-Sequenzen wurde zunächst nach ncRNAs gesucht. Dies erfolgte ähnlich der miRNA-Annotation, nur mit einer anderen ncRNA-Datenbank (Makro „ncRNA\_annotation“). Diese wurde mit Hilfe von fRNAdb:Blast (<http://www.ncrna.org/frnadb/blast>, <http://gene.fudan.sh.cn/>) und sno/scaRNAbase (snoRNAbase.nsf) erstellt. Viele Sequenzen konnten jedoch auch unter Zuhilfenahme dieser Datenbank nicht identifiziert werden. Bei mehrfachem Vorkommen einer Sequenz wurde deshalb noch ein Abgleich mit humanen Transkripten bzw. EBV-kodierten Transkripten mit Blast durchgeführt (NCBI Nucleotide Blast). Neue potentielle miRNA-Vorläufer wurden mittels des Programms mfold (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi>) identifiziert.

#### **5.10.7. Auswertung der analysierten Sequenzbanken**

Um am Ende eine Aussage über das Vorkommen der verschiedenen miRNAs bzw. ncRNAs in den verschiedenen Banken machen zu können, mussten alle identifizierten Sequenzen aufsummiert werden. Das Makro „AUSWERTUNG“ zählte dabei die jeweilige Anzahl aller vorkommenden miRNAs, ncRNAs oder humanen/EBV-kodierten Transkripte zusammen. Die relative Expression einer miRNA wurde mit Hilfe der Gesamt-miRNA-Zahl berechnet.



## 6. Ergebnisse

### 6.1. Fragestellung

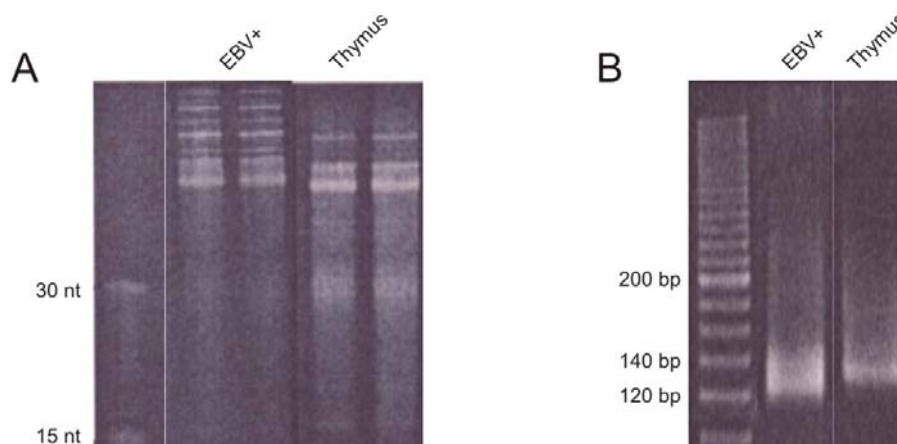
Das Epstein-Barr-Virus kodiert für virale miRNAs, hat aber auch einen Einfluss auf die Expression zellulärer miRNAs. Bisher ist jedoch weitgehend unklar, welche Funktion die viralen bzw. deregulierten, zellulären miRNAs haben. Das lässt sich nicht zuletzt darauf zurückführen, dass bisher nur wenige oder gar keine Ziel-mRNAs dieser viralen miRNAs bekannt sind. In den letzten zwei Jahren gab es bereits Studien zu miRNA-Expression in folgenden EBV-assoziierten Tumoren: AIDS-assoziiertes DLBCL (Xia et al., 2008), klassisches Hodgkin-Lymphom (Navarro et al., 2008), NPC (Cosmopoulos et al., 2009; Zhu et al., 2009b) und DLBCL (Imig, unveröffentlicht). Zu Beginn dieser Arbeit gab es jedoch keine Veröffentlichung über die Expression von zellulären oder viralen miRNAs in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen. Deshalb war es ein Ziel dieser Arbeit miRNA-Expressionsprofile von EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen durch „deep sequencing“ zu generieren. Gleichzeitig sollten EBV-negative T-Zell Lymphome, sowie Thymus als Normalgewebe sequenziert werden. Durch Vergleichen der verschiedenen miRNA-Expressionsprofile sollten zunächst virusregulierte zelluläre miRNAs identifiziert werden. Die anschließende funktionelle Analyse von Ziel-mRNAs sollte mithelfen, den Beitrag der virusregulierten zellulären miRNAs an der Tumorigenese von NK/T-Zell Lymphomen aufzuklären.

Um die Rolle der EBV-kodierten miRNAs bei der Entstehung von Tumoren oder der latenten Infektion durch EBV im Allgemeinen zu verstehen, sollten außerdem Targets von EBV-miRNAs identifiziert werden. Dazu wurden mögliche Target-Kandidaten verschiedener EBV-miRNAs untersucht, die man zuvor mittels Immunpräzipitation von RISC-Komplexen identifiziert hatte. Durch Präzipitation der RISC-Komplexe in EBV-negativen bzw. -positiven B-Zelllinien und dem anschließenden Vergleich, wurden mRNAs gefunden, die unterschiedlich stark in den verschiedenen RISC-Komplexen vorlagen. Diese mRNAs stellten mögliche Targets von EBV-kodierten oder EBV-regulierten miRNAs dar.

## 6.2. Herstellung von cDNA-Banken aus Tumor- bzw. Normalgewebe

Die verschiedenen Tumor- und das Normalgewebe (siehe Tabelle 3) wurden vom Institut für Pathologie des Universitätsspitals Zürich zur Verfügung gestellt und mit deren Hilfe ausgewählt. Es wurden jeweils fünf verschiedene EBV-negative T-Zell Lymphome, zwei EBV-positive NK/T-Zell Lymphome und vier Thymusgewebe gepoolt. Die Herstellung der cDNA-Banken aus den unterschiedlichen Gewebe-Pools erfolgte durch die Firma vertis Biotechnologie AG und ist in Abbildung 12 dargestellt, die Sequenzierung der Banken übernahm die Firma 454 Life Sciences.

Im ersten Schritt erfolgte die Aufreinigung der kleinen RNA-Fraktion aus Geweben, die Kontrolle der RNA-Qualität (Abbildung 13A) und die anschließende Reisolierung aus dem Gel. Es ergaben sich distinkte Banden für die aufgereinigte RNA, was für eine gute RNA-Qualität ohne besondere Degradation spricht. Nach 3'-Poly(A)-Tailing und Ligation der Adaptersequenzen wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Abbildung 13B zeigt die erwartete Fragmentlänge der PCR-amplifizierten cDNA von 120–145 bp. Es konnten hier lediglich die Gele der EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen und der Thymusgewebe dargestellt werden, da die Abbildungen zu den EBV-negativen T-Zell Lymphomen nicht von der Firma weitergeleitet wurden.



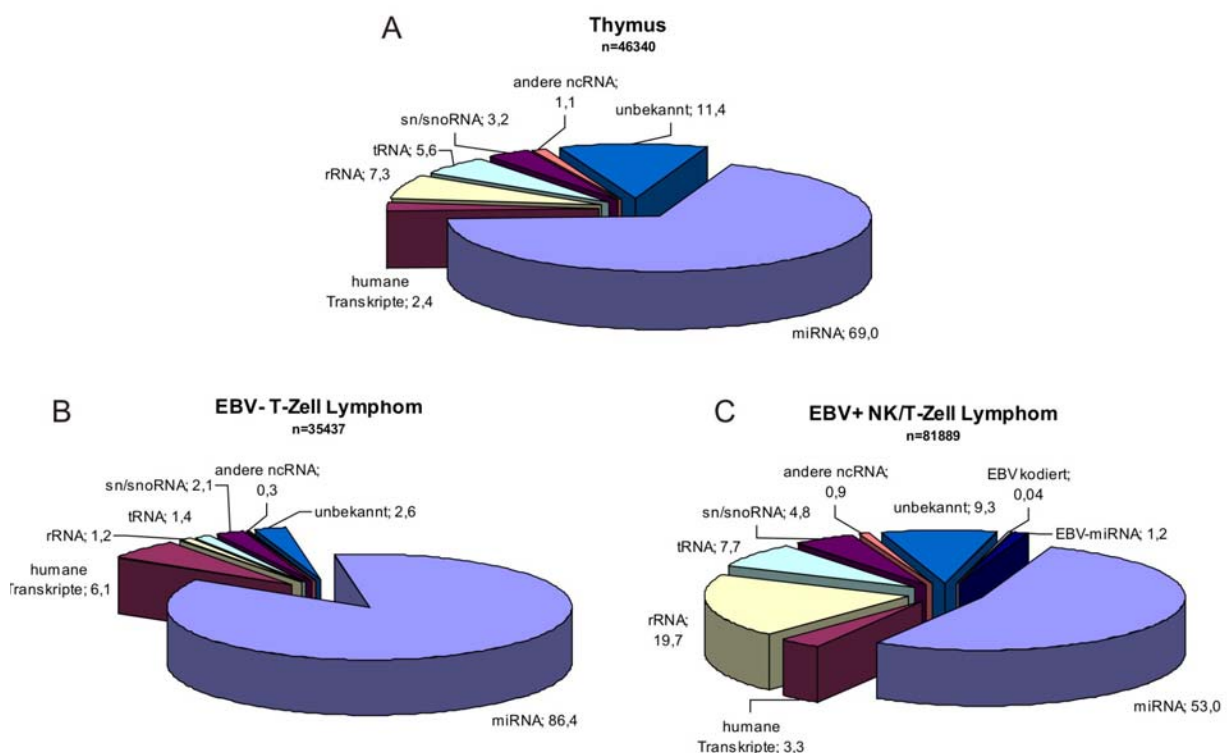
**Abbildung 13: Qualitätskontrolle der aus den Geweben isolierten RNA und der PCR-amplifizierten cDNA (Quelle: vertis Biotechnologie AG)**

A: Die kleine RNA-Fraktion wurde mit dem mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion) aus EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen und Thymusgewebe isoliert, in einem denaturierenden 12,5%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit SYBRgreenII angefärbt. B: Analyse der PCR-amplifizierten cDNAs in einem 6%igen Polyacrylamid-Gel. Die cDNAs zeigten die nach der Ligation der verschiedenen Adapter bzw. dem Poly(A)-Schwanz erwartete Größe von 120 – 145 bp.

### 6.3. Sequenz-Analyse der hergestellten cDNA-Banken

#### 6.3.1. Klassifikation kleiner nicht-kodierender RNAs in den untersuchten cDNA-Banken

Die mit der 454-Sequenziermethode erhaltenen Sequenzen wurden zunächst semi-manuell mit Hilfe der in Abschnitt 5.10 beschriebenen Methode analysiert. Nach der Auswertung ergaben sich für die verschiedenen Lymphome bzw. das Normalgewebe folgende Expressionsmuster für kleine nicht-kodierende RNAs und Abbauprodukte größerer nicht-kodierender RNAs.



**Abbildung 14: Verteilung verschiedener kleiner, nicht-kodierender RNAs bzw. Transkripte in den cDNA-Banken der untersuchten Gewebe**

Dargestellt ist die Verteilung verschiedener kleiner, nicht-kodierender RNAs und Transkripte in A) Thymus, B) EBV-negativen T-Zell Lymphomen und C) EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen. Die Zahl der nach der Sequenzierung erhaltenen Sequenzen wird durch „n“ wiedergegeben und das in % angegebene, relative Vorkommen errechnet sich aus der absoluten Sequenzanzahl der jeweiligen RNA im Verhältnis zur Gesamtzahl aller Sequenzen. miRNA=microRNA; nc=non-coding RNA; snRNA=small nuclear RNA; snoRNA=small nucleolar RNA; tRNA=transfer RNA; rRNA=ribosomal RNA

Für die Thymusgewebe konnten von insgesamt 46340 analysierten Sequenzen 69 % als miRNAs identifiziert werden. Weiterhin stellten 7,3 % der Sequenzen rRNA, 5,6 % tRNA, 3,2 % sn/snoRNA, 2,4 % humane Transkripte, 1,1 % andere ncRNAs dar, während 11,4 % der Sequenzen nicht zugeordnet werden konnten.

Die Anzahl der Sequenzen in der cDNA-Bank von EBV-negativen T-Zell Lymphome war mit 35437 der Thymus-Sequenzzahl ähnlich. Hier konnten allerdings 86,4 % der Sequenzen bekannten miRNAs zugeordnet werden, während 6,1 % als humane Transkripte, 2,1 % als sn/snoRNA, 1,4 % als tRNA, 1,2 % als rRNA und 0,3 % als sonstige ncRNAs bestimmt wurden. Nur 2,6 % der Sequenzen dieser cDNA-Bank waren nicht zu identifizieren.

Die Anzahl der für die EBV-positiven NK/T-Zell Lymphome erhaltenen Sequenzen war mit 81889 wesentlich höher als für die beiden anderen cDNA-Banken. Hier entsprachen nur 53 % aller Sequenzen bereits bekannten zellulären miRNAs, 1,2 % EBV-kodierten miRNAs, 0,04 % EBV-kodierten Sequenzen, 19,7 % rRNAs, 7,7 % tRNAs, 4,8 % sn/snoRNAs, 3,3 % humanen Transkripten und 0,9 % anderen ncRNAs. Insgesamt 9,3 % der Sequenzen konnten auch nach der manuellen Analyse nicht zugeordnet werden.

Abschließend kann man sagen, dass für alle Banken der größte Teil der Sequenzen als miRNAs identifiziert werden konnte. Die Proportionen der einzelnen, nicht-kodierenden RNAs schwankten jedoch zwischen den verschiedenen Banken.

### **6.3.2. Expressionsanalyse zellulärer miRNAs**

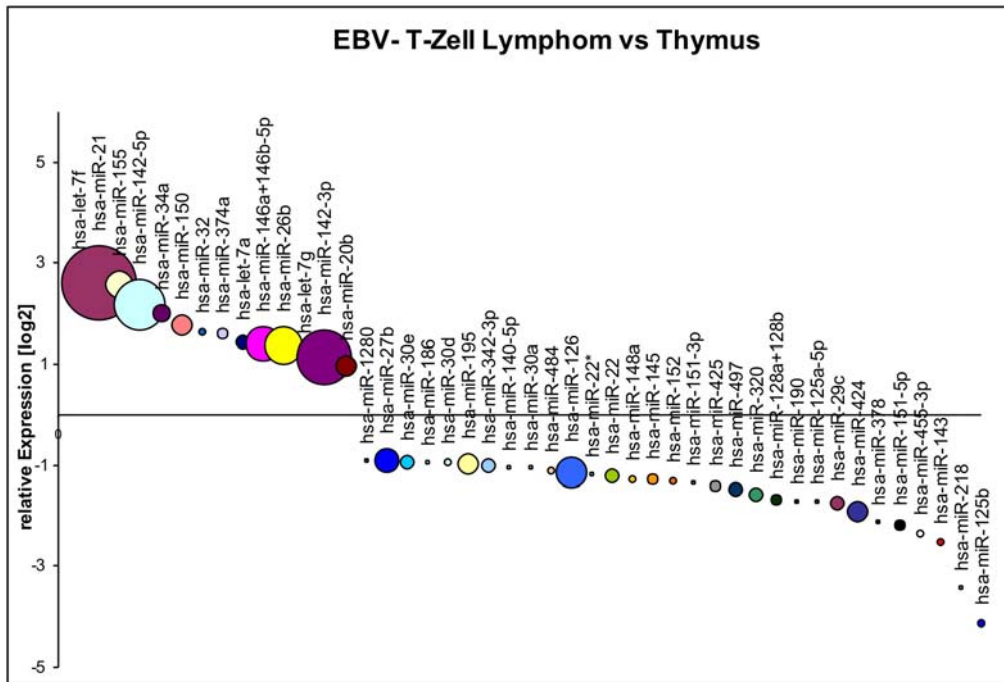
In den verschiedenen cDNA-Banken wurde eine unterschiedliche Anzahl von miRNAs gefunden. Thymus als Normalgewebe exprimierte mit 348 die höchste Zahl unterschiedlicher miRNAs. Die EBV-positiven NK/T-Zell Lymphome enthielten dagegen nur 325 zelluläre, sowie 36 virale miRNAs, während die EBV-negativen T-Zell Lymphome lediglich 275 verschiedene miRNAs exprimierten. Es ergaben sich verschiedene Möglichkeiten die Expression einzelner miRNAs in den untersuchten Geweben miteinander zu vergleichen. Es konnten beide Lymphome mit dem Normalgewebe verglichen werden um den Zusammenhang zwischen der Expression von miRNAs und der Tumorigenese zu untersuchen. Weiterhin war es möglich, den Einfluss der EBV-Infektion auf die Expression zellulärer miRNAs durch Vergleich der EBV-positiven mit den EBV-negativen Lymphomen zu analysieren. Verglichen wurde dabei die relative miRNA-Expression, welche der Anzahl einer bestimmten miRNA im Verhältnis zur Gesamt-miRNA-Zahl des untersuchten Gewebes entspricht. Um die Anzahl der differentiell exprimierten miRNAs einzugrenzen, wurde vorausgesetzt, dass eine miRNA in beiden Banken eine relative Expression von mindestens 0,1 % hat und eine mindestens zweifache Expressionsänderung innerhalb beider cDNA-

---

Banken zeigen muss. Die Darstellung erfolgte mit sogenannten Blasendiagrammen, wobei jede Blase einer miRNA und die Blasengröße ihrer relativen Expression entspricht. Die Änderung der miRNA-Expression wurde als log<sub>2</sub> abgebildet, so dass hochregulierte miRNAs oberhalb und herunterregulierte miRNAs unterhalb der x-Achse dargestellt sind. Manche miRNAs sind sehr homolog und waren aufgrund der häufigen Modifikationen, die auf die Sequenzierung zurückzuführen sind, nicht voneinander zu unterscheiden. Wenn ein Großteil der Sequenzen nicht klar als eine von zwei miRNAs identifiziert werden konnte, wurden die beiden miRNAs für die Analyse aller Banken zusammengefasst (Bsp: miR-128a+b).

#### **6.3.2.1. Vergleich der miRNA-Expression zwischen EBV-negativen T-Zell Lymphomen und Thymus**

Vergleicht man die miRNA-Expression in EBV-negativen T-Zell Lymphomen mit der im Normalgewebe (Abbildung 15) erkennt man, dass die meisten der insgesamt 45 differentiell exprimierten miRNAs in den Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe reprimiert waren. Während 69 % (31 von 45) der miRNAs in den EBV-negativen T-Zell Lymphomen herunterreguliert waren, wurden 31 % (14 von 45) der miRNAs dort stärker als im Thymus exprimiert. Die drei am stärksten induzierten miRNAs waren: let-7f mit einer siebenfachen Änderung, sowie miR-21 und miR-155 mit je einer sechsfachen Änderung. Zu den am stärksten reprimierten miRNAs zählten miR-125b (17-fach), miR-218 (11-fach) und miR-143 (6-fach).



**Abbildung 15: Vergleich der relativen miRNA-Expression zwischen EBV-negativen T-Zell Lymphomen und Thymus**

Dargestellt ist die Änderung der relativen Expression von miRNAs, welche in beiden Banken eine Expression von mindestens 0,1 % und eine mindestens zweifache Expressionsänderung im Vergleich EBV-negativer T-Zell Lymphome zum Thymus zeigten. Jede Blase stellt eine einzelne miRNA dar, während die Blasengröße ihrer relativen Expression innerhalb der EBV-negativen Lymphome entspricht. Die relative Expression ist als log2 dargestellt, so dass miRNAs oberhalb der x-Achse in EBV-negativen Lymphomen hochreguliert, miRNAs unterhalb der x-Achse reprimiert sind. Von insgesamt 45 deregulierten miRNAs wurden 31 (69 %) reprimiert und 14 (31 %) induziert.

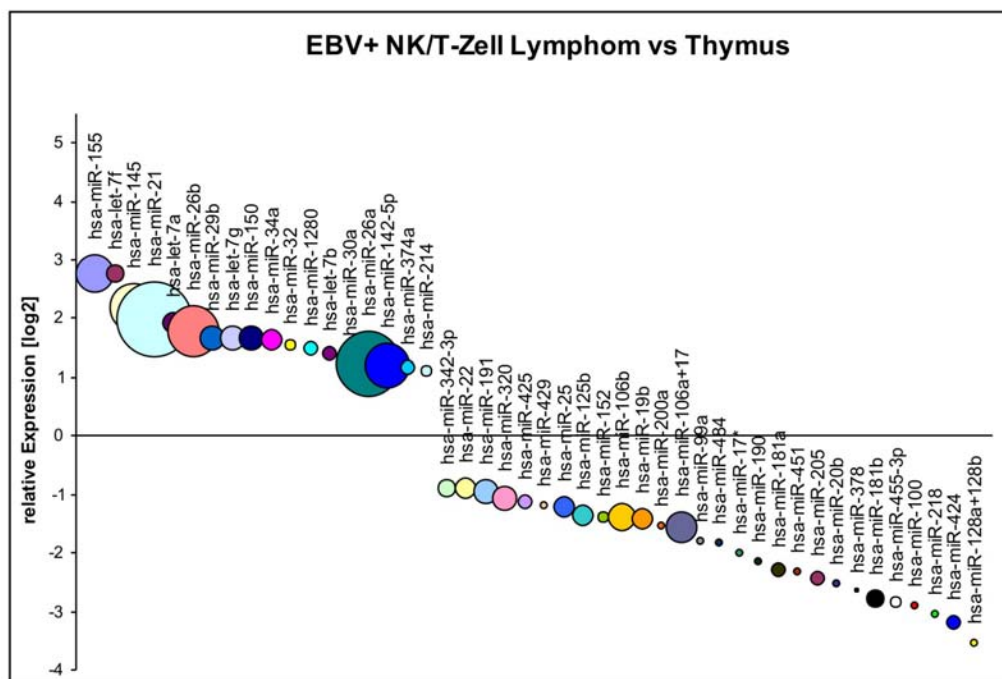
Eigentlich sollten nur miRNAs angeschaut werden, die in jeder Bank eine relative Expression von mind. 0,1 % aufwiesen. Es gab jedoch miRNAs, die in den EBV-negativen Lymphomen überhaupt nicht oder kaum exprimiert waren (Tabelle 17). Dazu zählten miR-205 sowie die Vertreter der miR-200 Familie miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-204, miR-141 sowie miR-449a+b, miR-429 und miR-199b-5p.

**Tabelle 17: miRNAs, die in EBV-negativen Lymphomen nicht oder kaum exprimiert werden**

miRNA	relative Expression [%]		
	Thymus	EBV-	EBV+
hsa-miR-200a	0,26	0,00	0,09
hsa-miR-200b	2,17	0,00	1,18
hsa-miR-203	0,11	0,00	0,10
hsa-miR-204	0,12	0,00	0,07
hsa-miR-205	1,49	0,00	0,28
hsa-miR-429	0,15	0,00	0,07
hsa-miR-449a+449b	0,00	0,00	0,21
hsa-miR-141	0,36	0,01	0,21
hsa-miR-199b-5p	0,26	0,02	0,22
hsa-miR-200c	0,88	0,03	1,03

### 6.3.2.2. Relative miRNA-Expression in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen im Vergleich zum Normalgewebe

In den EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen wurden im Vergleich zum Normalgewebe insgesamt 46 deregulierte miRNAs gefunden, von denen 18 (39 %) induziert und 28 (61 %) herunterreguliert waren (Abbildung 16). Zu den drei am stärksten induzierten miRNAs gehörten wie beim Vergleich EBV-negative Lymphome mit Normalgewebe ebenfalls miR-155 und let-7f. In EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen war miR-145 am drittstärksten exprimiert, während miR-21 an vierter Stelle stand. Die miRNAs miR-128a+b, miR-424 und miR-218 zählten mit je einer Herabregulierung auf das 0,1 fache zu den am stärksten reprimierten miRNAs. Es gab jedoch keine miRNAs, die im Thymus nicht aber in den EBV-positiven Lymphomen vorhanden waren. Ein Sonderfall sind miR449a+b, die gemeinsam eine relative Expression von 0,2 % in den EBV-positiven Lymphomen zeigten, während sie in den beiden anderen Banken gar nicht exprimiert waren (siehe Tabelle 17).

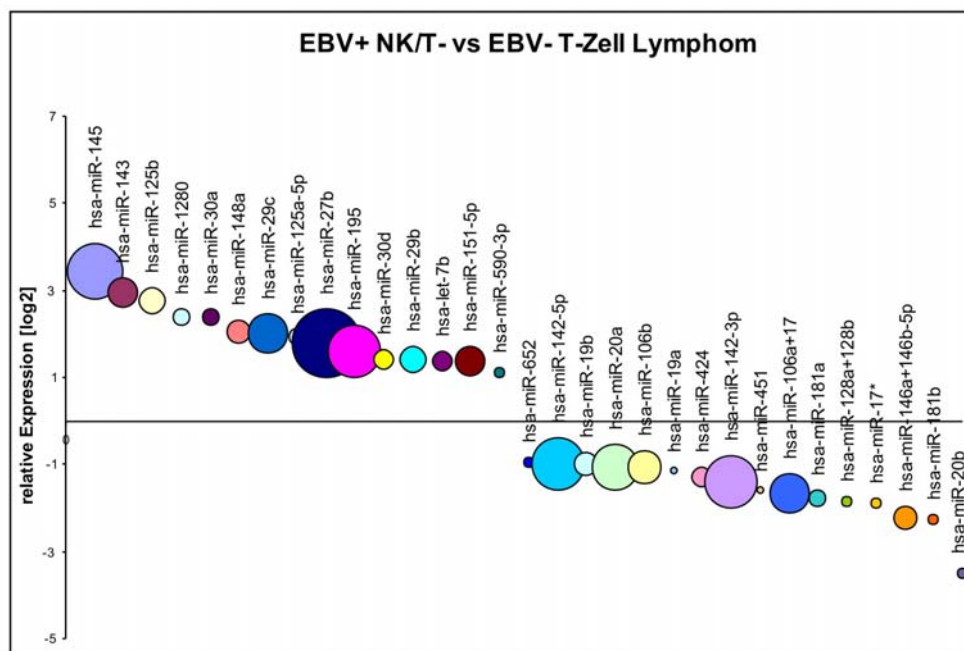


**Abbildung 16: Relative miRNA-Expression in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen verglichen zu Thymus**

Dargestellt ist die relative Expression von miRNAs im Vergleich EBV-positiver NK/T-Zell Lymphome zu Thymus, die eine Expression von mind. 0,1 % und eine mindestens zweifache Expressionsänderung zeigten. Jede Blase stellt eine einzelne miRNA dar, während die Blasengröße der relativen Expression dieser miRNA innerhalb der EBV-positiven Lymphome entspricht. Da die relative Expression als log2 dargestellt ist, sind miRNAs oberhalb der x-Achse in EBV-positiven Lymphomen hochreguliert, miRNAs unterhalb der x-Achse herunterreguliert. Von 46 differentiell exprimierten miRNAs sind 18 (39 %) hoch- und 28 (61 %) in den Lymphomen herunterreguliert.

### 6.3.2.3. miRNA-Expressionsvergleich zwischen EBV-positiven NK/T- und EBV-negativen T-Zell Lymphomen

Der wohl interessanteste Vergleich der Sequenzierdaten war der miRNA-Expressionsvergleich zwischen EBV-positiven NK/T- und EBV-negativen T-Zell Lymphomen. Dieser Unterschied sollte einen Hinweis auf die EBV-induzierte Veränderung von zellulären miRNAs geben. Betrachtet man Abbildung 17, erkennt man, dass 31 miRNAs differentiell exprimiert waren und der Anteil an hoch- bzw. herunterregulierten miRNAs etwa gleich hoch war. Am stärksten wurden miR-145 (11-fach), miR-143 (8-fach) und miR-125b (7-fach) induziert, während miR-20b (10-fach), miR-181b (5-fach), sowie miR-146a+b (5-fach) am stärksten reprimiert wurden.



**Abbildung 17: Differentielle Expression zellulärer miRNAs in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen im Vergleich zu EBV-negativen T-Zell Lymphomen**

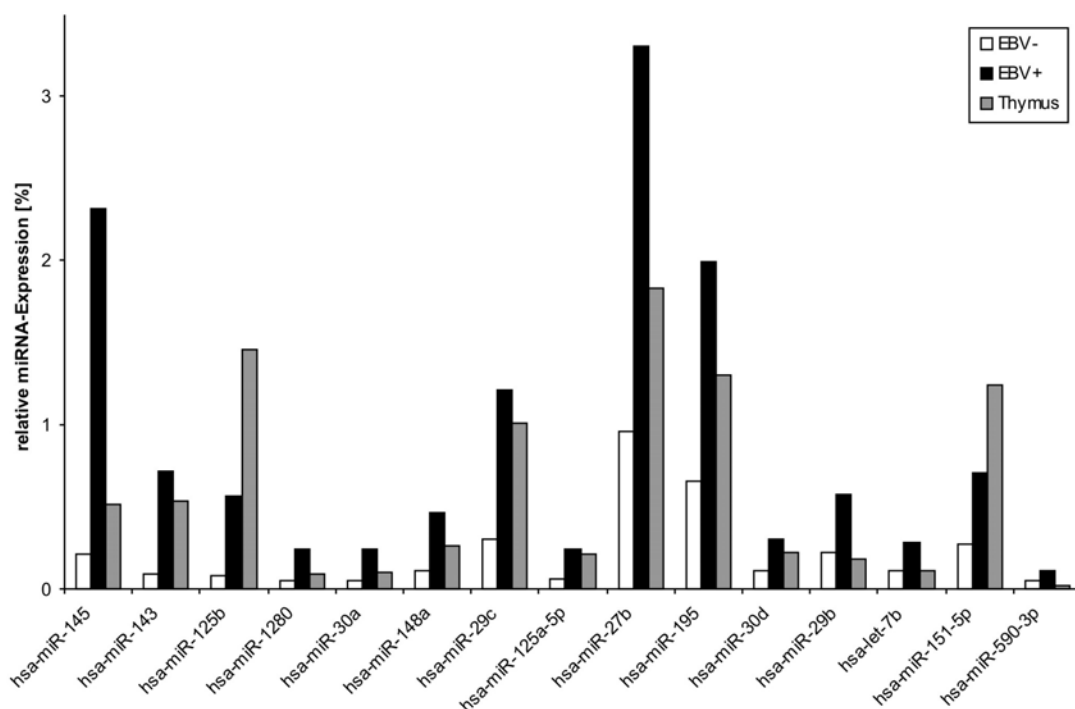
Dargestellt ist die Änderung der relativen miRNA-Expression als log2. Jede Blase stellt eine einzelne miRNA dar, während die Blasengröße der relativen Expression dieser miRNA innerhalb der EBV-positiven Lymphome entspricht. miRNAs oberhalb der x-Achse sind in EBV-positiven Lymphomen hochreguliert, miRNAs unterhalb der x-Achse herunterreguliert. Von den 31 differentiell exprimierten miRNAs waren 15 induziert und 16 reprimiert.

Manche der miRNAs zeigten zwar eine mindestens 0,1%ige Expression in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen, wurden in den EBV-negativen Banken jedoch gar nicht exprimiert. Da sich diese miRNAs nicht mit Hilfe von Blasendiagrammen darstellen ließen, wurden sie extra in Tabelle 17 aufgeführt.

Vergleich man die miRNA-Expression der in den EBV-positiven bzw. -negativen Lymphomen in allen Geweben (Abbildung 18), stachen drei verschiedene Gruppen



hervor. Zum einen gab es miRNAs wie miR-145, miR-1280, miR-30a, miR-29b, let-7b und miR-590-3p, die in den EBV-positiven Lymphomen sowohl im Vergleich zu den EBV-negativen Lymphomen als auch im Vergleich zum Thymus stärker exprimiert waren. Zum anderen wurden die miRNAs miR-205, miR-125b und miR-151-5p zwar im Vergleich zu den EBV-negativen Lymphomen stärker exprimiert, zeigten aber immer noch eine schwächere Expression als im Normalgewebe. Die restlichen miRNAs, wie miR-29c, miR-148a usw. zeigten in den EBV-positiven Lymphomen eine ähnliche Expression wie im Thymus, waren aber im Vergleich zu den EBV-negativen Lymphomen deutlich induziert.

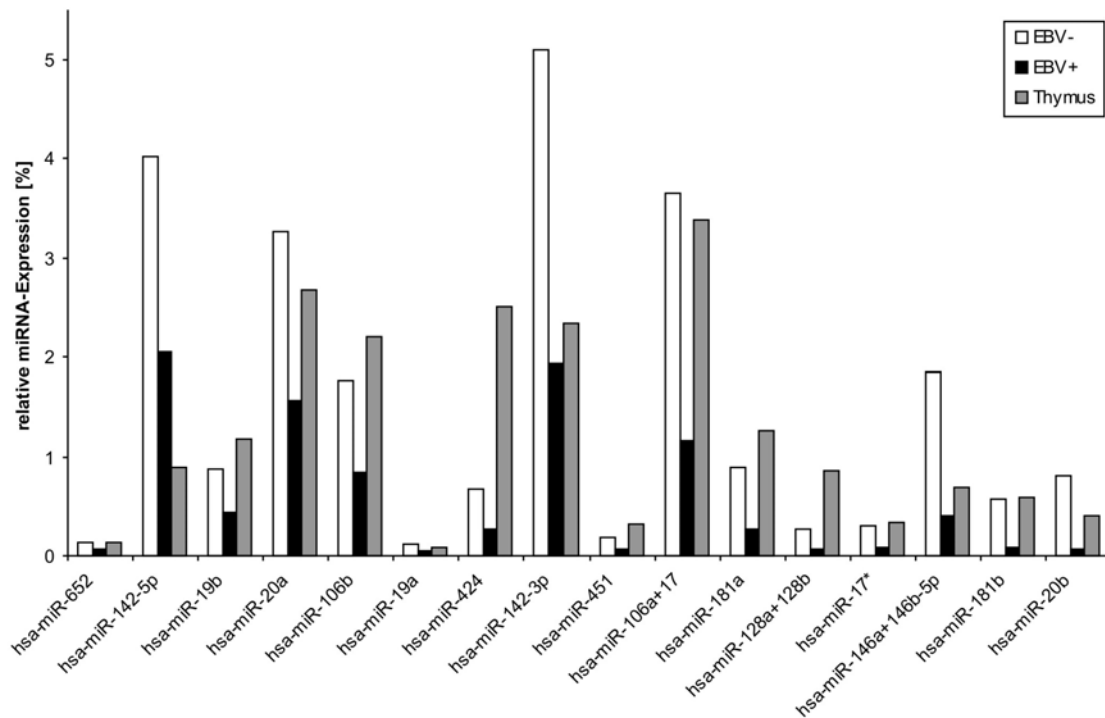


**Abbildung 18: Relative miRNA-Expression der im Vergleich EBV-positiven zu EBV-negativen Lymphomen induzierten miRNAs in allen cDNA-Banken**

Dargestellt ist die relative Expression der im Vergleich EBV-positiven zu -negativen Lymphomen hochregulierten miRNAs in %. Der weiße Balken repräsentiert die EBV-negativen, der schwarze Balken die EBV-positiven Lymphome und der graue Balken das Normalgewebe Thymus.

Dieselben Gruppen fand man auch für die im Vergleich von EBV-positiven NK/T-Zell- zu EBV-negativen T-Zell Lymphomen herunterregulierten miRNAs. Hier war die Verteilung jedoch völlig anders. Die meisten der miRNAs waren sowohl im Vergleich zu EBV-negativen Lymphomen als auch zum Normalgewebe reprimiert wie miR-20a, miR-106b, miR-20b, miR-181a, miR-181b etc. Nur miR-142-5p zeigte im Vergleich zu den EBV-negativen Lymphomen eine verminderte Expression, war aber immer noch stärker vertreten als im Normalgewebe. Zu den herunterregulierten miRNAs, die in

den EBV-positiven Lymphomen ein Thymus-ähnliches Expressionsniveau zeigten, zählten miR-652, miR-142-3p und miR-146a+b-5p.



**Abbildung 19: Relative miRNA-Expression der im Vergleich EBV-positiver zu EBV-negativer Lymphome reprimierten miRNAs in allen cDNA-Banken**

Dargestellt ist die relative Expression der im Vergleich EBV-positiver zu -negativer Lymphomen reprimierten miRNAs in %. Der weiße Balken repräsentiert die EBV-negativen, der schwarze Balken die EBV-positiven Lymphome und der graue Balken den Thymus.

### 6.3.3. Identifizierung von potentiell neuen miRNAs

Einen Vorteil, den die 454-Sequenzierung gegenüber Array-Analysen zur Untersuchung von miRNA-Expression hat, ist die mögliche Identifizierung von neuen miRNAs. Während ein miRNA-Array nur bereits bekannte Sequenzen enthält, können mit Hilfe der Sequenzierung neue miRNAs gefunden werden. Um neue miRNAs zu identifizieren, wurden in dieser Arbeit die Sequenzen untersucht, die trotz ihrer Länge von ca. 20 nt auch nach der Annotierung weder bekannten miRNAs noch ncRNAs zugeordnet werden konnten. Mit Hilfe der Such-Funktion der miRNA-Datenbank von Sanger konnten zunächst miRNAs von bereits bekannten miRNA-Vorläufern gefunden werden.

Tabelle 18: Neue miRNAs von bereits bekannten miRNA-Vorläufern

Name	Sequenz	genomische Lokalisation	Reads pro cDNA Bank		
			Thymus	EBV-	EBV+
hsa-miR-874-5p	CGGCCCCACGCACCAGGGT	5q31.2	1		4
hsa-miR-1248-3p	TGCTAGCAGAGTACACACAAG	3q27.3			4
hsa-miR-153-2-5p	GTCAATTTTTGTGATGTTGCAGC	7q36.3		4	
hsa-miR-98-3p	CTATACAACCTTACTACTTTC	Xp11.22		1	
hsa-miR-382-3p	AATCATTCACGGACAACACTT	14q32.31		2	
hsa-miR-511-3p	AATGTGTAGCAAAAAGACAG	10p12.33		10	
hsa-miR-1277-5p	TATATATATATATGTACGTAT	11q24		3	
hsa-miR-1185-3p	ATATACAGGGGGAGACTCTTAT	14q32.31	2		
has-miR-107-5p	AGCTTCTTTACAGTGTTCCTTGT	10q23.31	3		1
hsa-miR-let-7c-3p	CTGTACAACCTTCTAGCTTCC	21q21.2	2		

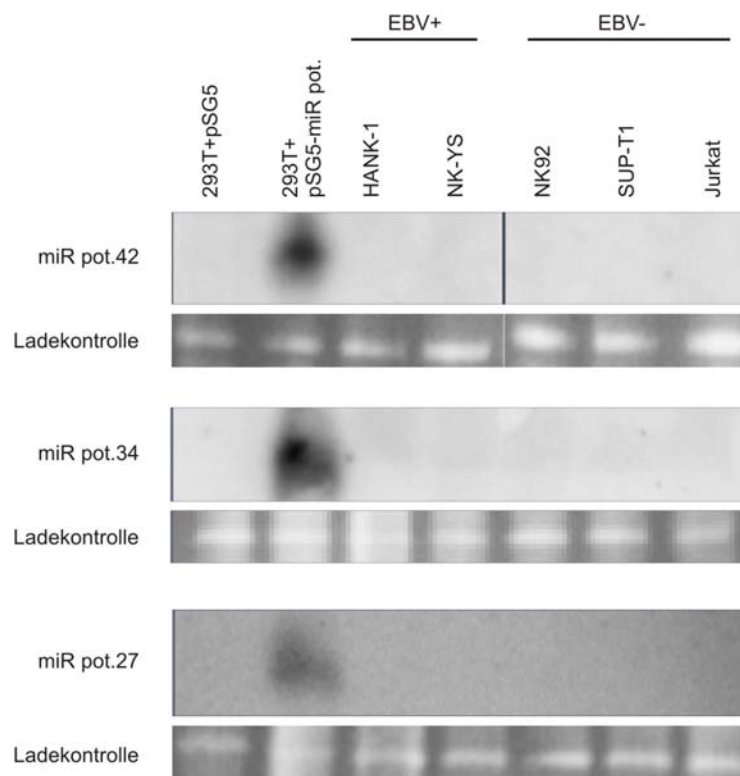
Neue miRNAs von bisher nicht bekannten miRNA-Vorläufern wurden identifiziert, indem die Sequenz der Vorläufer und ca. 100 nt der sie umgebenden Nukleotide mit Hilfe des Programms mfold untersucht wurden. Dieses Programm ermöglicht die Vorhersage der Faltung dieser Sequenz und somit die Vorhersage von typischen Haarnadelschleifen-Strukturen möglicher miRNA-Vorläufer. Tabelle 19 zeigt drei mögliche neue miRNAs, ihre genomische Lokalisation und die Konservierung der dargestellten Haarnadelschleife in *Pan troglodytes* (Schimpanse). Die Sequenz der reifen miRNA, welche in der cDNA-Bank gefunden wurde, ist jeweils unterstrichen.

Tabelle 19: Neue potentielle miRNA-Vorläufer

Name	miRNA-Vorläuferstruktur	dG	genomische Lokalisation	Konservierung
miR pot.27	<pre> CAGGAUGA  ---   C  C  .-A  CA       AGCU  GCCU  UG  UGCUGG  CCAG  C       UCGG  CGGA  AC  AUGACU  GGUC  U AGA-----  UGUC^  U  -  \  -  CC </pre>	-33,9	10q11.23	ptr
miR pot.34	<pre>           C          GAUUUGG CACUUUUAAUUUCAGCUA  UACCUCUAUUAG  \ GUGAGAAUUAAAGUUUAU  AUGGAGAUAAUC  G           A          AUUUUGA </pre>	-39,5	20q11.23	ptr
miR pot.42	<pre>           C          U          U--  -   C AAGGGCUUCAGC  AGGCUAG  GCAGUC  GCUUU  GUG  C UUUUCGAAGUCG  UCUGAUC  CGUCAG  UGGGG  CAC  A           A          C          UAG  U^  A </pre>	-41,8	10q24.1	ptr

Wie man erkennen kann, bildeten diese Sequenzen bzw. ihre umgebende Region potentielle Haarnadelschleifen-Strukturen aus, was für mögliche miRNA-Vorläufer sprach. Im nächsten Schritt sollte deshalb die Existenz der potentiell neuen miRNAs in NK/T-Zelllinien mittels Northern Blot untersucht werden. Als Positivkontrolle wurde die Sequenz einschließlich der sie umgebenden 50 nt stromauf- und stromabwärts in

einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert und in 293T-Zellen exprimiert. Nach 48 h wurde die Gesamt-RNA isoliert, in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Durch Inkubation der Membran mit radioaktiv markierten, gegen die potentiellen miRNAs gerichteten Sonden konnten die miRNAs spezifisch nachgewiesen werden. In Abbildung 20 ist die Expression der reifen miRNAs in den transfizierten 293T-Zellen und in den NK/T-Zelllinien dargestellt. Die Banden der tRNA, welche durch Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht wurden, dienten als Ladekontrolle. 293T-Zellen, die mit pSG5 transfiziert wurden, stellten die Negativkontrolle dar und exprimierten keine der potentiell neuen miRNAs. Lediglich die mit den miRNA-Expressionsplasmiden transfizierten 293T-Zellen, zeigten eine Bande in Höhe der reifen miRNA. Keine der untersuchten NK- bzw. T-Zelllinien zeigten ein Signal für eine der drei untersuchten miRNAs.

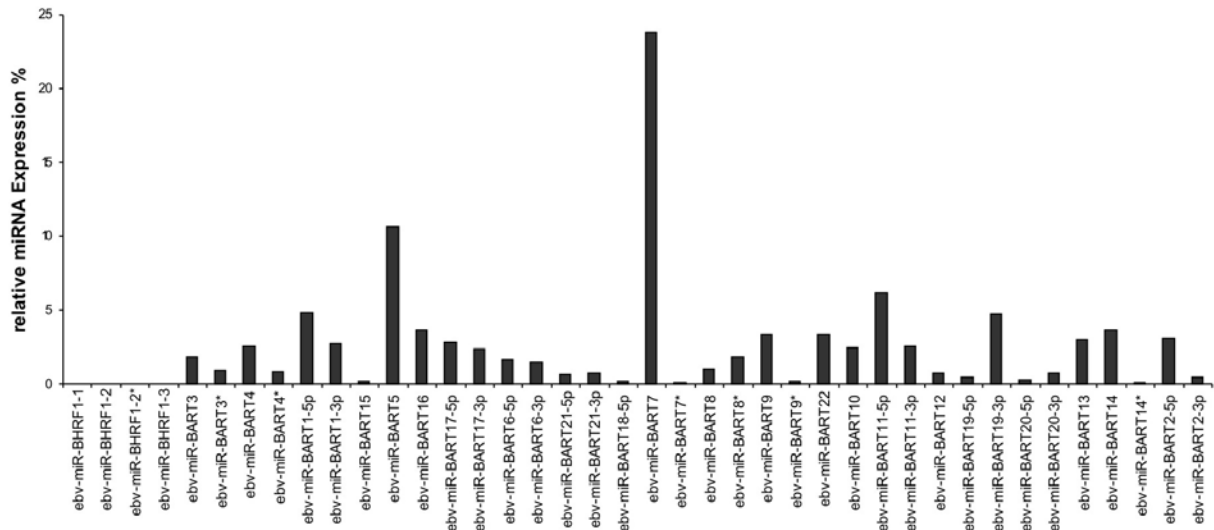


**Abbildung 20: Northern Blot zum Nachweis potentiell neuer miRNAs**

Als Positivkontrolle dienten 293T-Zellen 48 h nach Transfektion mit spezifischen miRNA-Expressionsvektoren. Es wurden jeweils 25 µg RNA in einem 12,5%igen Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Nach Quervernetzen der RNA auf der Membran erfolgte der miRNA-Nachweis mit radioaktiv markierten, zur jeweiligen miRNA komplementären RNA-Sonden. Die tRNA-Bande, welche durch Ethidiumbromidfärbung des Gels sichtbar gemacht wurde, diente als Ladekontrolle. Lediglich die Positivkontrollen zeigten eine Bande auf Höhe der miRNA. Es konnte keine endogene Expression in den untersuchten NK- bzw. T-Zelllinien detektiert werden.

### 6.3.4. Expressionsanalyse der viralen miRNAs

Die EBV-positiven NK/T-Zell Lymphome exprimierten neben zellulären miRNAs ebenfalls EBV-kodierte miRNAs. Diese machten aber nur 2,3 % aller miRNA-Sequenzen aus. Die Verteilung der verschiedenen EBV-miRNAs in Abbildung 21 entspricht der Reihenfolge der miRNAs im EBV-Genom.

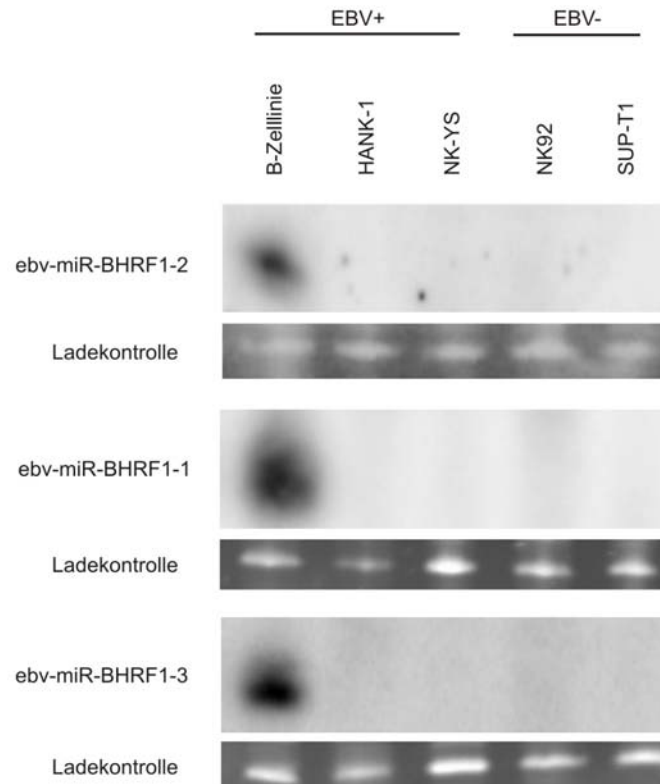


**Abbildung 21: Verteilung der EBV-kodierten miRNAs in NK/T-Zell Lymphomen**

Dargestellt ist die relative Expression der verschiedenen EBV-kodierten miRNAs in Bezug auf die Anzahl der Gesamt-EBV-miRNAs.

Am stärksten war BART7 (23,8 %) exprimiert, gefolgt von BART5 (10,7 %), BART11-5p (6,2 %), BART1-5p (4,8 %) und BART19-3p (4,7%). Diese fünf am stärksten exprimierten EBV-miRNAs umfassten bereits 50 % aller exprimierten, viralen miRNAs. In den Tumoren waren alle bisher bekannten BART-miRNAs vorhanden, lediglich die miRNAs des BHRF1-Clusters wurden nicht exprimiert. Um zu überprüfen, ob diese miRNAs in EBV-positiven NK/T-Zelllinien ebenfalls nicht exprimiert werden, wurden die EBV-positiven NK-Zelllinien NK-YS und HANK-1 auf die Expression von BHRF1-miRNAs im Northern Blot getestet. Dazu wurden je 25 µg Gesamt-RNA in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Der Nachweis der BHRF1-miRNAs erfolgte mit Hilfe von radioaktiv markierten, einzelsträngigen RNA-Sonden, die komplementär zur jeweiligen miRNA waren. Wie Abbildung 22 zeigt, konnte lediglich in der EBV-positiven B-Zelllinie, die als Positivkontrolle diente, je eine Bande für die reifen miRNAs BHRF1-1, -2 und -3 detektiert werden. Die EBV-negative NK-Zelllinie NK-92 und die EBV-negative T-Zelllinie SUP-T1 dienten als Negativkontrollen. Als

Ladekontrolle fungierte die tRNA-Bande, welche durch Färben des Gels mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht wurde. Die Sequenzierdaten und der Northern Blot deuten also daraufhin, dass die miRNAs des BHRF1-Clusters nicht in EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen exprimiert werden.



**Abbildung 22: Northern Blot zur Untersuchung der Expression von BHRF1-miRNAs in NK- bzw. T-Zelllinien**

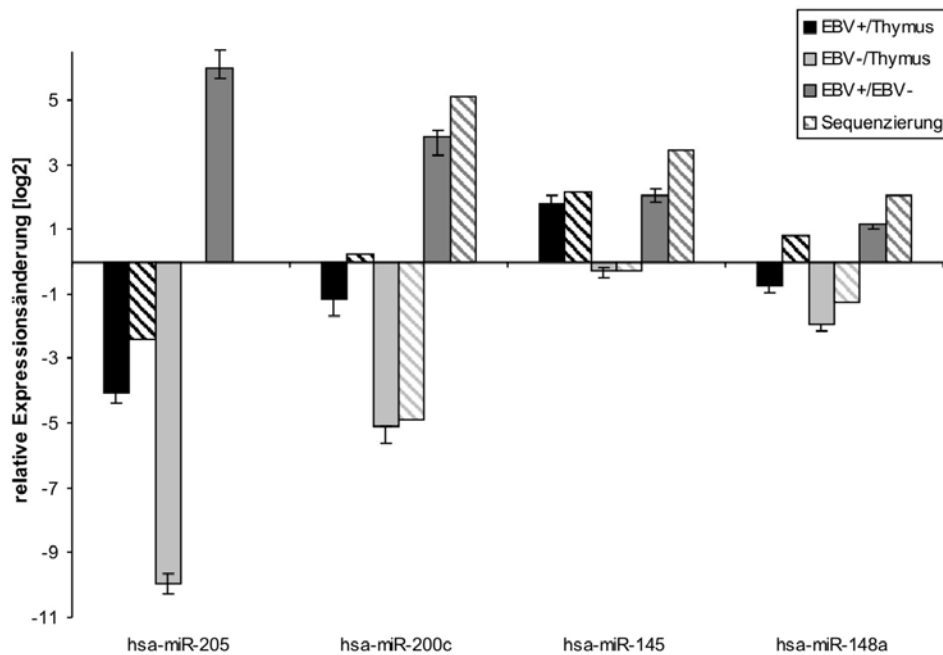
25 µg Gesamt-RNA aller Zelllinien wurden in einem 12,5 % Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit der jeweiligen zur miRNA komplementären, radioaktiven Sonde inkubiert. Die tRNA Bande des Ethidiumbromid gefärbten Gels diente als Ladekontrolle. Als Positivkontrolle wurde RNA aus den EBV-positiven B-Zelllinien Jijoye bzw. B95.8 verwendet, während die EBV-negativen NK- bzw. T-Zelllinien NK-92 und SUP-T1 als Negativkontrollen dienten.

#### 6.4. Validierung differentiell exprimierter miRNAs

Die mit der Sequenzierung erhaltenen Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Tumoren bzw. dem Normalgewebe sollten mit Hilfe einer zweiten, unabhängigen Methode bestätigt werden. Dazu wurden je vier miRNAs ausgewählt, die in EBV-positiven NK/T-Zell- im Vergleich zu EBV-negativen T-Zell Lymphomen differentiell exprimiert waren. Aus den für die Sequenzierung eingesetzten Geweben wurde deshalb cDNA hergestellt und die miRNA-Expression anschließend in einer quantitativen Real-Time PCR bestimmt. Die Detektion der reifen miRNAs bzw. des internen Standards 5.8sRNA erfolgte mit Hilfe von SYBR Green. Ausgewertet wurden die Expressionsdaten mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode. Die PCR wurde für drei

verschiedene cDNA-Präparationen durchgeführt. Abbildung 23 stellt die resultierenden mittleren, relativen Expressionsänderungen als  $\log_2$  für vier der induzierten miRNAs für den Vergleich zwischen EBV-positiven und EBV-negativen Lymphomen dar. Für jede Vergleichsmöglichkeit sind jeweils zwei Balken abgebildet. Während der ausgefüllte Balken den Ergebnissen der Real-Time PCR entspricht, gibt der schraffierte Balken jeweils die Ergebnisse aus der Sequenzierung wieder.

Im Fall von miR-205 konnten die Ergebnisse der Sequenzierung für den Vergleich zwischen EBV-negativen Lymphomen und Thymus sowie zwischen EBV-positiven und -negativen Lymphomen nicht in dieser Form dargestellt werden, da diese miRNA in EBV-negativen T-Zell Lymphomen nicht exprimiert war. Die relative Quantifizierung dieser miRNA bestätigte die bereits in der Sequenzierung beobachtete Repression der miRNA für den Vergleich zwischen den verschiedenen Tumoren und dem Normalgewebe. Die Induktion von miR-205 in den EBV-positiven im Vergleich zu EBV-negativen Lymphomen entspricht ebenfalls dem mit der Sequenzierung erhaltenen Ergebnis. Beim Vergleich der Real-Time PCR Daten mit der Sequenzierung von miR-200c kann man übereinstimmend die Repression im Vergleich EBV-negative Lymphome zum Thymus bzw. die Induktion im Vergleich von EBV-positiven und -negativen Lymphomen beobachten. Lediglich die Werte für den Vergleich zwischen EBV-positiven Lymphomen und Thymus wichen etwas voneinander ab. Während miR-200c in beiden Banken laut Sequenzierung gleich exprimiert war, wurde mit der quantitativen Real-Time PCR eine leichte Repression der miRNA auf das 0,5-fache beobachtet. Der aus der Sequenzierung resultierende Expressionsvergleich von miR-145 zwischen den verschiedenen Geweben konnte mit der Real-Time PCR bestätigt werden. Auch für miR-148a stimmten die relativen Expressionsunterschiede, die durch Sequenzierung und Real-Time PCR ermittelt wurden, weitgehend überein. Während miR-148a im Vergleich EBV-positiver Lymphome und Thymus laut Sequenzierung 1,7-fach in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen induziert war, ergab die Real-Time PCR eine Reduktion auf das 0,6-fache.



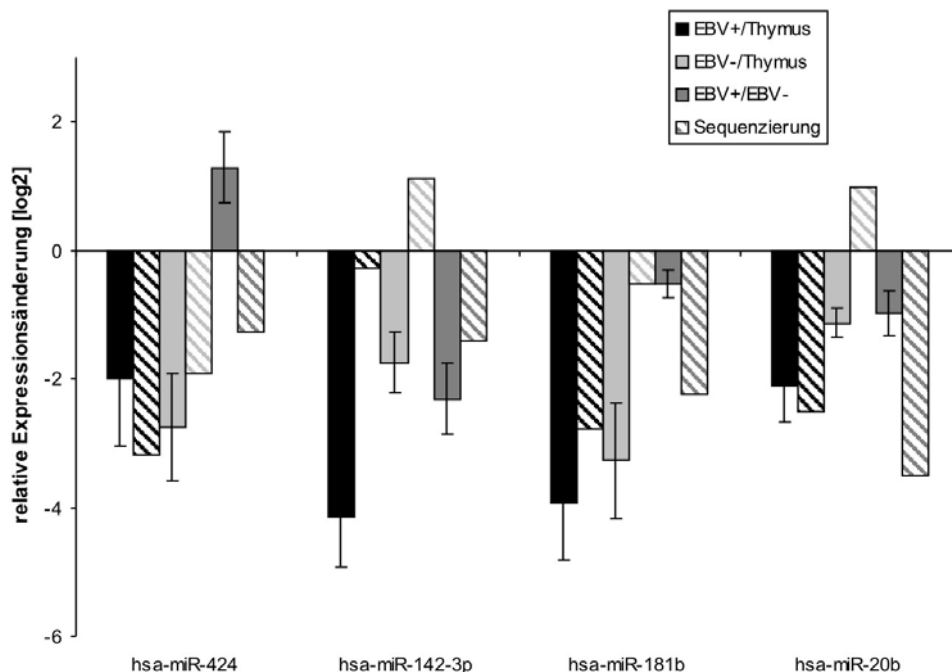
**Abbildung 23: Relative Expressionsänderung induzierter miRNAs in Sequenzierung und quantitativer Real-Time PCR**

Aus den untersuchten Geweben wurde cDNA hergestellt und die Expression der miRNAs sowie der 5.8sRNA mit Hilfe von SYBR-Green im LightCycler untersucht. Die relative Quantifizierung, welche mit der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode bestimmt wurde, ist als log2 dargestellt. Deshalb entsprechen Balken oberhalb der x-Achse einer Induktion, während Balken unterhalb der x-Achse eine Reduktion der entsprechenden miRNAs beschreiben. Dargestellt sind die Vergleiche zwischen EBV-positiven Lymphomen und Thymus (schwarz), EBV-negativen Lymphomen und Thymus (dunkelgrau) sowie EBV-positiven und –negativen Lymphomen (hellgrau) sowie die jeweils zugehörigen Ergebnisse der Sequenzierung (schraffiert).

Die Ergebnisse für die im Vergleich EBV-positiver und –negativer Lymphome herunterregulierten miRNAs ist in Abbildung 24 dargestellt. Die einzige aller untersuchten miRNAs, die beim Vergleich zwischen EBV-positiven und –negativen Lymphomen in der Real-Time PCR gegensätzliche Ergebnisse zur Sequenzierung zeigte, war miR-424. Laut Sequenzierung sollte diese miRNA in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen schwächer als in den EBV-negativen T-Zell Lymphomen exprimiert werden. Die Real-Time PCR ergab jedoch eine Induktion von miR-424 in den EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen. Die beiden anderen Vergleichsmöglichkeiten zeigten in der Real-Time PCR jedoch keine dramatischen Abweichungen im Vergleich zur Sequenzierung. Für miR-142-3p wurde mit Hilfe der Real-Time PCR eine deutlich stärkere Repression in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen im Vergleich zum Normalgewebe beobachtet werden. Der Vergleich zwischen den EBV-negativen T-Zell Lymphomen und Normalgewebe zeigte statt der in der Sequenzierung beobachteten Induktion der miRNA auf das 2,2-fache eine deutliche Reduktion auf das 0,3-fache. Die Repression der miRNA in den EBV-positiven



verglichen zu den EBV-negativen Lymphomen hingegen zeigte für beide Methoden die gleiche Tendenz. Die Expression von miR-181b zeigte für beide Methoden die gleiche Tendenz, während die Vergleiche zwischen EBV-negativen Lymphomen und Thymus sowie EBV-positiven und –negativen Lymphomen starke Abweichungen in der Stärke der miRNA-Reduktion für Sequenzierung bzw. Real-Time PCR zeigten. Im Vergleich EBV-positiver Lymphome und Thymus konnten gleiche Expressionsmengen für miR-20b in PCR und Sequenzierung beobachtet werden. Die Real-Time Daten zeigten eine verringerte Expression der miRNA in den EBV-negativen Tumoren verglichen zum Thymus, während laut Sequenzierung miR-20b stärker in den Lymphomen exprimiert werden sollte. Beim Vergleich zwischen EBV-positiven und –negativen Lymphomen konnte wiederum für beide Methoden die gleiche Tendenz beobachtet werden, wobei die Reduktion wiederum unterschiedlich stark war.



**Abbildung 24: Relative Expressionsänderung reprimerter miRNAs in Sequenzierung und qRT-PCR**

Aus den untersuchten Geweben wurde cDNA hergestellt und die Expression der miRNAs und der 5.8sRNA mit Hilfe von SYBR-Green im LightCycler untersucht. Nach Bestimmung der relativen Quantifizierung mit der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode, wurde die Expressionsänderung als log2 dargestellt. Dargestellt sind die mittleren Expressionsänderungen aus drei verschiedenen cDNA-Präparationen. Balken oberhalb der x-Achse stellen induzierte miRNAs dar, während Balken unterhalb der x-Achse eine Reduktion der entsprechenden miRNAs beschreiben. Dargestellt sind die Vergleiche zwischen EBV-positiven Lymphomen und Thymus (schwarz), EBV-negativen Lymphomen und Thymus (dunkelgrau), EBV-positiven und –negativen Lymphomen (hellgrau) sowie die dazugehörigen Ergebnisse der Sequenzierung (schraffiert).

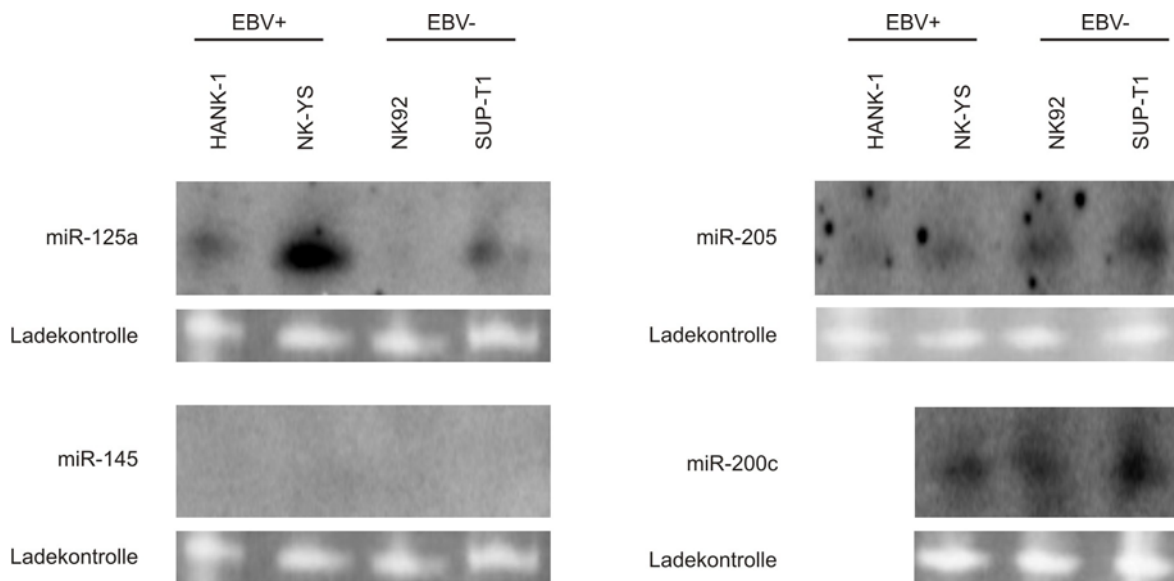
Abschließend kann man sagen, dass für sieben von acht der untersuchten miRNAs zumindest die Expressionsunterschiede zwischen EBV-positiven NK/T- und EBV-negativen T-Zell Lymphomen aus der Sequenzierung mit der Real-Time PCR bestätigt werden konnten. Nur die Expression von miR-424 zeigte entgegengesetzte Ergebnisse. Für die Vergleiche zwischen Tumor und Thymus konnte in den meisten Fällen zumindest die Tendenz der Expressionsänderung bestätigt werden, wenn auch nicht immer die gleiche Intensität beobachtet werden konnte. Es gab für zwei der untersuchten miRNAs widersprüchliche Ergebnisse im Expressionsunterschied für den Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe.

### **6.5. Untersuchung differentiell exprimierter miRNAs in Zelllinien**

Um Zelllinien als Modellsysteme für spätere funktionelle Experimente nutzen zu können, sollten diese zunächst hinsichtlich der Expression differentiell regulierter miRNAs untersucht werden. Als EBV-positive Zelllinien wurden HANK-1 und NK-YS, als EBV-negative NK- bzw. T-Zelllinien wurden NK-92 und SUP-T1 gewählt. Jeweils 20 µg Gesamt-RNA der Zelllinien wurden in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion der einzelnen miRNAs im Northern Blot erfolgte spezifisch mit Hilfe von radioaktiv markierten, zur miRNA komplementären RNA-Sonden. Es wurde die Expression von folgenden miRNAs untersucht, deren Expression in EBV-positiven NK/T-Zell- im Vergleich zu EBV-negativen Lymphomen induziert war: miR-200c, miR-205, miR-125a und miR-145.

Für miR-145 konnte kein endogenes Signal für die reife microRNA in den untersuchten Zelllinien detektiert werden. Die Expression von miR-125a zeigte in den EBV-positiven NK-YS Zellen verglichen zu den EBV-negativen Zelllinien eine deutliche Induktion, während die Expression in HANK-1 Zellen zwar deutlich stärker als in NK-92 Zellen, jedoch nur leicht stärker (38 %) als in SUPT-1 war. Für miR-205 war die Expression in beiden EBV-positiven Zelllinien wesentlich schwächer als in den EBV-negativen Zellen. Die Gesamt-RNA der HANK-1 Zellen reichte zur Untersuchung der Expression von miR-200c leider nicht mehr aus. Die Zelllinie scheint sehr empfindlich zu sein, da sie nur eine kurze Zeit in einem selbst angesetzten Medium kultiviert werden konnte. Deshalb war es nur möglich die Expression von miR-200c in der EBV-positiven NK-YS-Zelllinie zu untersuchen. Hier zeigte sich eine leicht schwächere Expression (60 %) in den NK-YS-Zellen

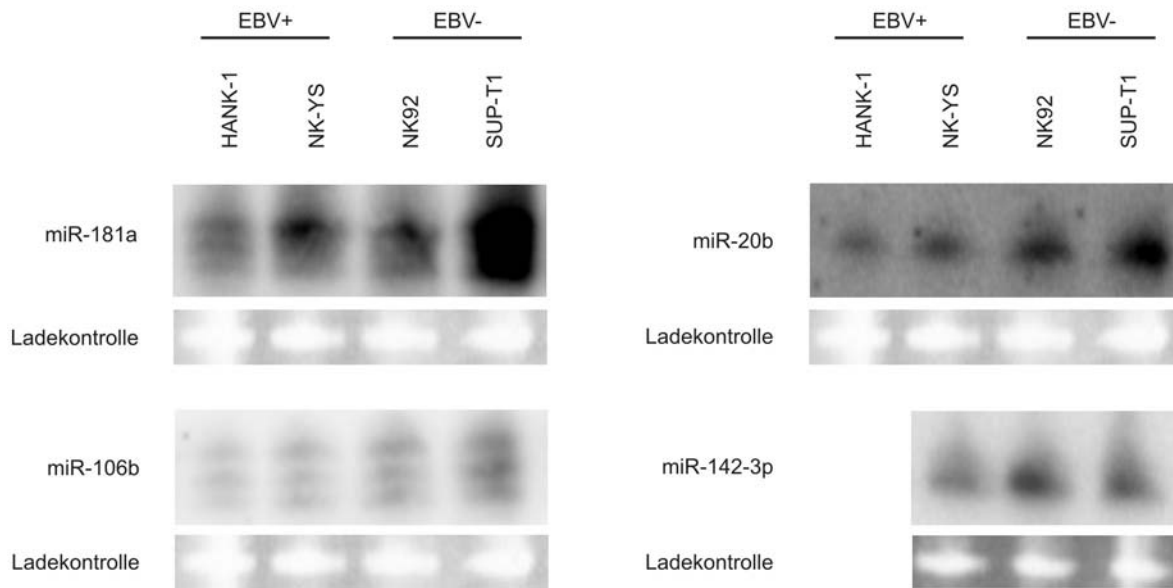
verglichen zur NK-Zelllinie NK-92 und eine noch deutlichere Expressionsabnahme verglichen zur T-Zelllinie SUP-T1.



**Abbildung 25: Untersuchung induzierter miRNAs in NK- bzw. T-Zelllinien**

Je 20 µg Gesamt-RNA aus verschiedenen Zelllinien wurden im 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblotet. Nach Immobilisation der RNA auf der Membran erfolgte der Nachweis der reifen miRNAs mit spezifisch gegen die verschiedenen miRNAs gerichteten, radioaktiv markierten RNA-Sonden. Für miR-145 konnte kein Signal für die reife miRNA detektiert werden. Während miR-125a deutlich stärker in EBV-positiven als in EBV-negativen Zelllinien exprimiert wurde, war deutlich mehr miR-205 und miR-200c in den EBV-negativen Zelllinien vorhanden.

Zu den reprimierten miRNAs, deren Expression in den Zelllinien untersucht werden sollte, zählten miR-181a, miR-106b, miR-20b und miR-142. Die Expression von miR-181a war in beiden EBV-positiven Zelllinien deutlich geringer als in der EBV-negativen T-Zelllinie SUP-T1. Während das Signal für miR-181a in HANK-1 Zellen ebenfalls schwächer als in NK-92 Zellen war, zeigten die NK-YS Zellen eine vergleichbare Expression dieser miRNA wie NK-92 Zellen. Die Expressionsstärke von miR-106b und miR-20b entsprach den Beobachtungen der Tumore und war deutlich geringer in den EBV-positiven als in den EBV-negativen Zelllinien. Aufgrund des Engpasses der HANK-1 RNA konnten diese Zellen auch nicht auf Expression von miR-142 getestet werden. Die Expression in den EBV-positiven NK-YS Zellen zeigte ebenfalls die erwartete Repression der miRNA im Vergleich zu den EBV-negativen Zelllinien.



**Abbildung 26: Expression reprimierter miRNAs in NK- bzw. T-Zelllinien**

In einem 12,5%igen Polyacrylamidgel wurden je 20 µg RNA verschiedener Zelllinien aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran geblottet. Nach Immobilisation der RNA auf der Membran wurden die miRNAs mit spezifisch gegen die verschiedenen miRNAs gerichteten, radioaktiv markierten RNA-Sonden nachgewiesen. Bis auf miR-181a zeigen alle miRNAs eine geringere Expression in EBV-positiven Zelllinien verglichen zu EBV-negativen. Für miR-181a trifft das nur bedingt zu, sie zeigt eine ähnliche Expression in NK-YS und in NK-92 Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Zelllinien kein sehr gutes *in vitro* Modellsystem für die analysierten Tumore darstellen. Die stärkere Expression der miRNAs, die in den EBV-positiven verglichen zu den EBV-negativen Tumoren beobachtet wurde, stimmt für die Zelllinien nur im Hinblick auf miR-125a. Während miR-145 nicht detektiert werden konnte, zeigten miR-200c und miR-205 statt der Induktion eine Repression in den EBV-positiven Zelllinien. Für die reprimierten miRNAs hingegen haben sich die beobachteten Expressionsunterschiede aus den Tumoren fast vollständig für die Zelllinien bestätigen lassen.

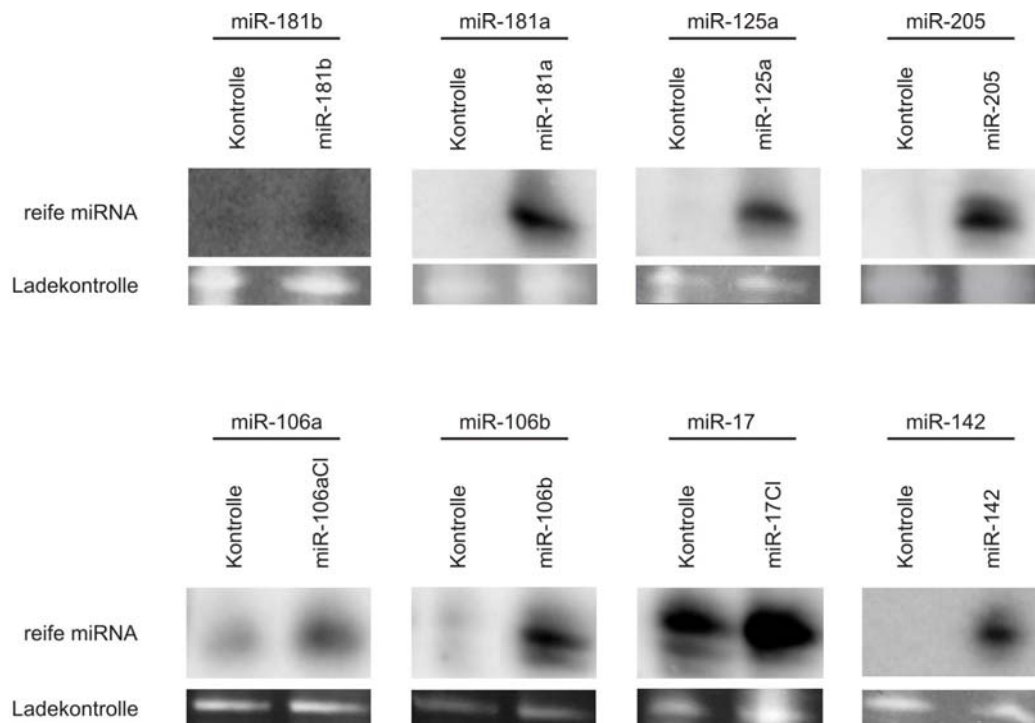
### 6.6. Identifizierung von Ziel-mRNAs differentiell exprimierter miRNAs in NK/T-Zell Lymphomen

Im nächsten Schritt sollten Targets für die in den Tumoren differentiell exprimierten miRNAs gefunden werden, um mehr über die Funktion dieser miRNAs z.B. bei der Tumorentstehung zu erfahren. Die Vorhersage von miRNA-Targets ist trotz der verschiedenen Algorithmen, die zur Verfügung stehen, sehr unzuverlässig. Oft können selbst *in silico* als sehr wahrscheinlich vorhergesagte Targets experimentell nicht bestätigt werden. Um die Identifizierung von miRNA-Targets zu vereinfachen, ist es sinnvoll miRNA- mit mRNA-Expressionsanalysen zu verknüpfen (Barbato et al.,

2009). Für viele Tumorentitäten gibt es bereits unzählige mRNA-Expressionsdaten. Zum Zeitpunkt dieser Untersuchung gab es für EBV-positive NK/T-Zell Lymphome lediglich eine veröffentlichte Arbeit, welche die mRNA-Expression zwischen EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen und normalen Lymphozyten verglichen hatte (Zhang et al., 2006). Die mRNA-Daten wurden mit den miRNA-Daten aus dieser Arbeit mit Hilfe des Programms SigTerms (Creighton et al., 2008) verknüpft. Sigterms vereint die Vorhersagen aus drei verschiedenen Programmen zur besseren Vorhersage von miRNA-Targets (Pictar, TargetScan, miRanda). Es ermöglicht somit die Identifizierung von potentiellen miRNA-Targets aufgrund von bekannten miRNA- und mRNA-Daten.

### **6.6.1. Herstellung von miRNA-Expressionsvektoren**

Um in späteren Experimenten eine ektoische Expression der zu untersuchenden, zellulären miRNAs zu ermöglichen, wurden zunächst miRNA-Expressionsvektoren hergestellt. Neben der eigentlichen miRNA-Vorläufer-Sequenz wurden zusätzlich noch mindestens 100 der umliegenden Basen in den eukaryotischen Expressionsvektor pSG5 kloniert. In den nachfolgenden Northern Blots konnte mit Hilfe radioaktiv markierter, spezifischer Sonden gezeigt werden, dass die Konstrukte 48 h nach transienter Transfektion in 293T-Zellen die jeweilige miRNA exprimieren. Für miRNAs, die auf bekannten miRNA-Clustern liegen, wie z.B. miR-17, wurde statt der einzelnen miRNA das komplette Cluster in den pSG5 kloniert. Abbildung 27 zeigt für alle miRNAs eine deutlich stärkere Expression nach Transfektion der miRNA-Expressionsplasmide in 293T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Alle hergestellten miRNA-Expressionsplasmide konnten also in 293T-Zellen exprimiert und zu reifen miRNAs prozessiert werden.



**Abbildung 27: Expressionskontrolle zellulärer miRNA-Expressionsplasmide im Northern Blot**

293T-Zellen wurden mit dem Kontrollvektor oder den entsprechenden miRNA-Expressionsplasmiden transfiziert. Nach 48 h wurde die RNA isoliert und 20 µg davon im 12,5%igen, harnstoffhaltigen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Der Nachweis der reifen miRNAs erfolgte mit Hilfe einzelsträngiger, radioaktiv markierter RNA-Sonden, die komplementär zur miRNA-Sequenz sind. Als Ladekontrolle dienen die Banden der tRNA, welche durch Färben des Gels mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden konnte.

### 6.6.2. FOS, CD44 und IL1R1 als mögliche Zielgene differentiell exprimierter miRNAs

Zu den in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen hochregulierten mRNAs der Analyse von Zhang und Kollegen gehörten CD44 und FOS (Zhang et al., 2006). Das Proto-Onkogen FOS (*v-fos* FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog) gehört zu einer Proteinfamilie, welche für Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren kodiert und zusammen mit Proteinen der JUN-Familie den Transkriptionsfaktor AP1 bilden. FOS ist an der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Transformation beteiligt und stellte deshalb ein interessantes miRNA-Target dar. Es ist weiterhin bekannt, dass FOS in Non-Hodgkin-Lymphomen stärker als im Normalgewebe (Szremska et al., 2003) exprimiert ist und dass das EBV-kodierte LMP1 Protein die Expression von FOS induziert (Vaysberg et al., 2008).

CD44 repräsentiert eine Familie aus Oberflächenproteinen, welche die Bindung an die extrazelluläre Matrix über Hyaluronsäure vermittelt und an vielen Adhäsions-abhängigen, molekularen Funktionen wie z.B. der Cytotoxizität von NK-Zellen

beteiligt ist (Sconocchia et al., 1994). Das Protein vermittelt außerdem Zell-Zell-Interaktionen und Migration. CD44 stellte ein interessantes Target dar, weil seine Wechselwirkung mit Hyaluronsäure eine Rolle beim Wachstum und der Progression von Tumoren spielt (Drillenburger and Pals, 2000).

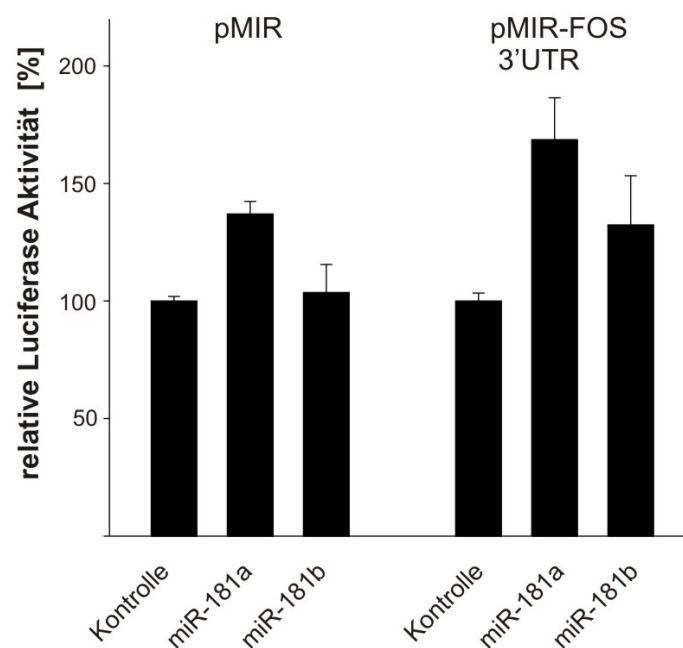
Mit Hilfe von SigTerms wurden miRNAs ermittelt, deren Bindung an die CD44 bzw. FOS-3'UTR von Pictar, TargetScan oder miRanda vorhergesagt wurden und die in EBV-positiven Lymphomen herunterreguliert waren. Eine miRNA, die FOS oder CD44 als Target hätte, könnte durch ihre Repression zu einer verstärkten Expression der Target-mRNAs führen. Laut Vorhersage sollten miR-181a und miR-181b an die 3'UTR von FOS binden. Für die CD44-3'UTR wurden Bindestellen für miR-106a und miR-20a vorhergesagt. Da diese miRNAs zu bekannten paralogen miRNA-Clustern (mir-17-92 Cluster, miR-106b-92 und miR-106a-25) gehören, deren Seed-Region sich sehr ähnlich ist, wurden statt der einzelnen miRNAs die kompletten Cluster in den Expressionsvektor pSG5 kloniert um alle miRNAs testen zu können.

Für die mRNA von IL1R1 (Interleukin 1 Rezeptor Typ I) beschrieb die Arbeitsgruppe um Zhang eine geringere Expression in EBV+ NK/T-Zell Lymphomen im Vergleich zu Lymphozyten (Zhang et al., 2006). IL1R1 ist ein Zytokinrezeptor, der an der Vermittlung vieler Immun- und Entzündungsantworten beteiligt ist (Lewis et al., 2006). Die Suche nach in den EBV-positiven Lymphomen überexprimierten miRNAs mit vorhergesagten Bindungsstellen in der IL1R1-3'UTR ergab miR-125a und miR-205 als mögliche Kandidaten. Die induzierte Expression dieser miRNAs könnte eine Erklärung für die verminderte IL1R1-Expression in den EBV-positiven Lymphomen sein.

#### **6.6.2.1. Regulation der 3'UTR von FOS, CD44 und IL1R1 durch miRNAs**

Der Einfluss der miRNAs auf die Regulation der vorhergesagten Target-mRNA wurde im Luciferase-Assay untersucht. Dazu wurden Reporterkonstrukte hergestellt, in denen die 3'UTR von FOS, CD44 und IL1R1 hinter das für die Firefly-Luciferase kodierende Gen in den Vektor pMIR-RNL-TK kloniert wurde. Die Luciferase-Assays wurden mit dem Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter System 48 h nach transienter Transfektion von 293T-Zellen mit 0,8 µg Effektor- und 0,2 µg Reporterplasmid durchgeführt. Sollte die kotransfizierte miRNA an die 3'UTR binden, würde dies zur Translationshemmung der Luciferase und somit zu weniger Luciferase-Protein sowie einer Reduktion der Luciferase-Aktivität führen.

Zunächst wurde der Einfluss von miR-181a und miR-181b auf die 3'UTR von FOS untersucht. Abbildung 28 zeigt die mittleren Luciferase-Aktivitäten mit ihrem jeweiligen Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten im Doppelansatz, wobei alle Ansätze in Bezug zur Aktivität der kontroll-transfizierten Zellen gesetzt wurden. Man kann erkennen, dass die Kotransfektion von miR-181b keinen signifikanten Effekt hat. Währenddessen führt die Transfektion von miR-181a sowohl zu einem Anstieg der Luciferase-Aktivität des Reporterkonstrukts auf 169 % als auch des leeren Reporters um 37 %. Somit hat keine der beiden miRNAs einen spezifischen Effekt auf die 3'UTR von FOS.



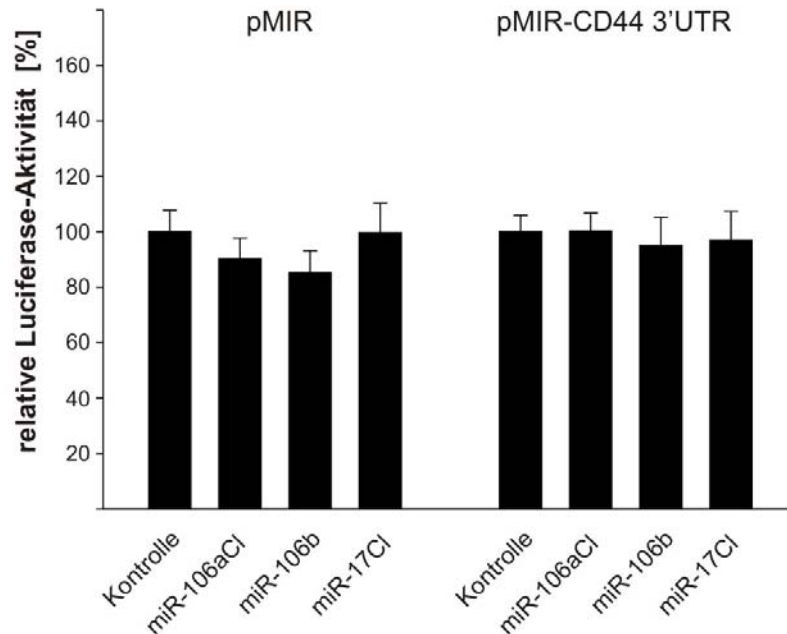
**Abbildung 28: Regulation der 3'UTR von FOS durch miR-181a und miR-181b**

293T-Zellen wurden mit 0,8 µg Effektor- und 0,2 µg Reporterplasmid transfiziert und 48 h später wurden Luciferase-Assays durchgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit ihrem jeweiligen Standardfehler. Die Aktivität der kontroll-transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. MiR-181a führt zur Aktivierung der Luciferase-Aktivität von Kontrollvektor und 3'UTR, während miR-181b keinen signifikanten Effekt hat.

Da die CD44-3'UTR im Vektor pMIR vorlag und dieser nicht für die Renilla-Luciferase kodiert, wurden die Zellen neben 0,8 µg Effektor- und 0,2 µg Reporterplasmid zusätzlich mit 0,2 µg pEGFP-c1 transfiziert. Nach 48 h Stunden wurden die Luciferase-Assays wie in Abschnitt 5.6.2 beschrieben durchgeführt. Die Transfektionseffizienz konnte aufgrund der EGFP-Transfektion am FACS durchgeführt werden und diente der Normalisierung der gemessenen Luciferase-Aktivitäten. Abbildung 29 zeigt ein Balkendiagramm der mittleren Luciferase-Aktivitäten aus vier unabhängigen Versuchen mit doppeltem Ansatz und ihren



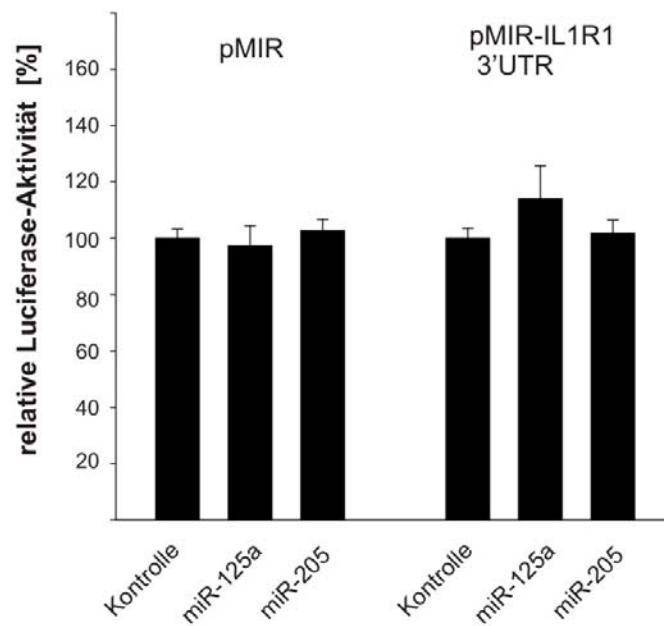
zugehörigen Standardfehlern. Alle mit einer miRNA transfizierten Ansätze wurden in Bezug zum kontroll-transfizierten Ansatz gesetzt. Wie man erkennen kann, hat keine der untersuchten miRNAs einen statistisch signifikanten Effekt auf den CD44-3'UTR-Reporter. Somit konnte CD44 als vorhergesagtes Target für miR-106 und die miRNAs des Clusters miR-17-92 experimentell nicht bestätigt werden.



**Abbildung 29: Einfluss differenziell exprimierter miRNAs auf die CD44-3'UTR**

Je 0,2 µg pEGFG-c1, 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmid wurden in 293T-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden Luciferase-Assays durchgeführt. Es sind die mittleren Luciferase-Aktivitäten aus vier unabhängigen Experimenten im Doppelansatz mit ihrem Standardfehler dargestellt. Die Kotransfektion von pEGFP-c1 diente der Normalisierung der Luciferase-Aktivität. Weder das Cluster miR-17, miR-106a noch miR-106b haben einen Einfluss auf die CD44-3'UTR.

In Abbildung 30 ist die Regulation der IL1R1-3'UTR durch miR-125a und miR-205 dargestellt. Es handelt sich um die Mittelwerte und zugehörigen Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit Duplikaten. Die mittlere Luciferaseaktivität der kontroll-transfizierten Zellen wurde auf 100 % und alle anderen Ansätze dazu in Bezug gesetzt. Wie zu erkennen ist, hat weder miR-125a noch miR-205 einen Effekt auf die Luciferase-Aktivität des IL1R1-3'UTR Reporters. Somit kann die Vorhersage der Bindung dieser beiden miRNAs an diese 3'UTR ebenfalls nicht bestätigt werden.



**Abbildung 30: Einfluss von miR-125a und miR-205 auf die 3'UTR von IL1R1**

48 h nach Transfektion von 293T-Zellen mit je 0,8 µg Effektor- und 0,2 µg Reporterplasmid wurden Luciferase-Assays durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit ihrem jeweiligen Standardfehler. Die mittlere Luciferase-Aktivität der kontroll-transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Weder miR-125a noch miR-205 haben einen Effekt auf die 3'UTR von IL1R1.

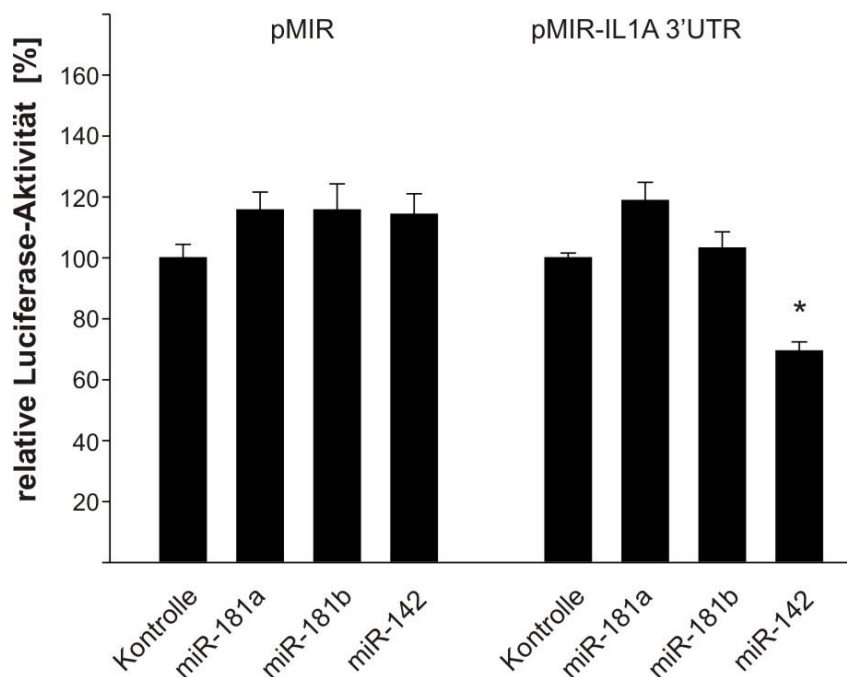
### 6.6.3. IL1A als Target von miR-142

Eine der ebenfalls hochregulierten mRNAs in den EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen der Analyse von Zhang und Kollegen (Zhang et al., 2006) war IL1A (Interleukin-1 alpha). IL1A ist ein proinflammatorisches Zytokin, das als 31-33 kDa großes Vorläufer-Protein synthetisiert und anschließend zum reifen, 17 kDa großen IL1A und zu einem 16 kDa großen N-terminalen Spaltprodukt prozessiert wird (Apte and Voronov, 2008). Das reife IL1A kann entweder sekretiert werden oder in den Nukleus gelangen und so als auto- oder parakriner Wachstumsfaktor wirken (Ito et al., 1993; Karakas et al., 2006) sowie prometastatische Gene induzieren (Lewis et al., 2006). Da IL1A somit zum Tumorwachstum und zur Tumorentität beitragen kann, stellte dieses Protein ein interessantes Target dar. Aufgrund der IL1A-Überexpression in den EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen wurde nach potentiell an die 3'UTR von IL1A bindenden miRNAs gesucht, die in dieser Tumorentität reprimiert waren. Mögliche Bindestellen in der IL1A-3'UTR wurden für miR-181a, miR-181b und miR-142 vorhergesagt.

### 6.6.3.1. Regulation der 3'UTR von IL1A durch miR-142-3p

Zunächst sollte im Reporterassay die Bindung der verschiedenen miRNAs an die IL1A-3'UTR untersucht werden. Dazu wurde die 3'UTR von IL1A ebenfalls in den Reportervektor pMIR-RNL-TK hinter das für die Firefly-Luciferase kodierende Gen kloniert. Die Luciferase-Assays wurden 48 h nach transienter Transfektion von 0,8 µg Effektor- und 0,2 µg Reporterplasmid in 293T Zellen durchgeführt. Abbildung 31 zeigt ein Balkendiagramm der mittleren, relativen Luciferase-Aktivitäten mit den zugehörigen Standardfehlern, wobei die mittlere Luciferase-Aktivität der kontroll-transfizierten Ansätze auf 100% gesetzt wurde. Es handelt sich um fünf unabhängige Experimente, die im Doppelansatz durchgeführt wurden.

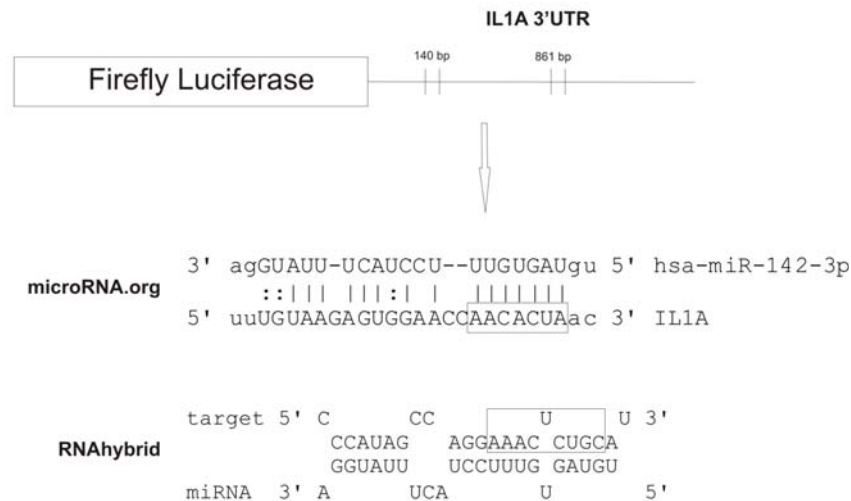
Vergleicht man die Kotransfektion von IL1A-3'UTR und miRNAs mit der Kontrolle, zeigt sich, dass miR-181a und miR-181b keinen Einfluss auf die 3'UTR haben. Währenddessen führt die Kotransfektion von miR-142 zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Luciferase-Aktivität des IL1A-Reporters auf 69 % ( $p < 0,05$ ). Da diese miRNA keinen Effekt auf den leeren Reporter hat, handelt es sich um einen spezifischen Effekt der miRNA auf die 3'UTR.



**Abbildung 31: Regulation der IL1A-3'UTR durch miR-142, miR-181a und miR-181b**

293T Zellen wurden mit je 0,2 µg Reporterplasmid und 0,8 µg Kontrollvektor bzw. miRNA transfiziert. 48 h nach Transfektion von 293T-Zellen wurden Luciferase-Assays durchgeführt. Dargestellt sind fünf unabhängige Experimente mit Standardfehler, die je im Doppelansatz durchgeführt wurden. Die Luciferase-Aktivität der kontroll-transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Lediglich die Kotransfektion von miR-142 führte zu einer Reduktion der Luciferase-Aktivität um 31 % ( $p < 0,05$ ).

Mit Hilfe der Reporterassays konnte die Vorhersage von IL1A als Target von miR-181a und miR-181b nicht bestätigt werden. Offenbar ist jedoch miR-142 in der Lage im Luciferaseassay an die 3'UTR von IL1A zu binden und die Luciferase-Aktivität zu reduzieren. Im nächsten Schritt galt es die Bindestelle von miR-142 in der 3'UTR von IL1A zu identifizieren. Mit Hilfe von RNAhybrid und microRNA.org wurden zwei verschiedene Bindestellen für miR-142-3p in der 3'UTR vorhergesagt (Abbildung 32).

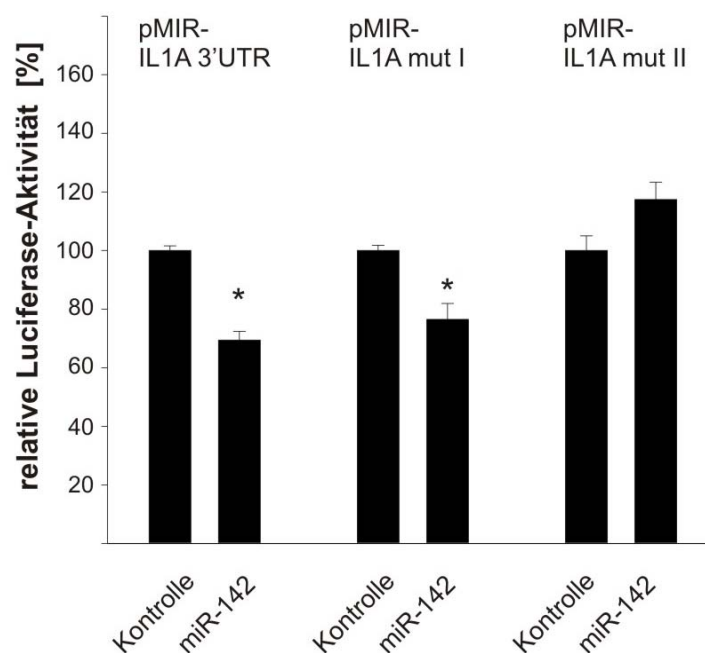


**Abbildung 32: Schematische Übersicht über die vorhergesagten Bindestellen für miR-142 in der IL1A-3'UTR**

Dargestellt sind die mit Hilfe der Programme microRNA.org und RNAhybrid vorhergesagte Bindestellen für miR-142-3p in der IL1A-3'UTR. Die Sequenz der IL1A-3'UTR, welche zur Identifizierung der tatsächlichen miRNA-Zielsequenz mutiert wurde, ist umrahmt.

Um die Bindung der miRNA an die vorhergesagten Zielsequenzen in der 3'UTR zu bestätigen, wurden IL1A-3'UTR Mutanten hergestellt. Da die Seed-Region von miRNAs eine kritische Rolle bei der Bindung an Target-mRNAs hat, wurde die zur Seed-Region komplementäre Sequenz der 3'UTR von IL1A mit Hilfe einer zielgerichteten Mutagenese ausgetauscht. Aufgrund der hohen Komplementarität der vorhergesagten Bindestellen der miRNA in der 3'UTR wurden neben der Seed-Region noch zwei weitere Nukleotide mutiert. Mit diesen mutierten Luciferase-Konstrukten wurden erneut Luciferase-Assays durchgeführt. In Abbildung 33 sind die mittleren, relativen Luciferase-Aktivitäten mit ihren Standardfehlern aus fünf unabhängigen Experimenten mit je doppeltem Versuchsansatz dargestellt. Die Aktivität der Reportervektoren bei Kotransfektion von miR-142 wurde wieder in Bezug zur Luciferase-Aktivität der kontroll-transfizierten Zellen gesetzt. Wie man erkennen kann, reduziert miR-142 die Luciferase-Aktivität von Mutante I um 24 %

( $p < 0,05$ ). Da kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Reduktion der Luciferase-Aktivität des Wildtyps und dieser mutierten 3'UTR besteht, kann ausgeschlossen werden, dass diese Bindestelle tatsächlich eine Zielsequenz für miR-142 innerhalb der IL1A-3'UTR darstellt. Die Kotransfektion von miR-142 und Mutante II hingegen hat keinen Effekt auf die Luciferase-Aktivität dieses Konstrukts. Da die Aktivität dieser Mutante nicht mehr durch miR-142 beeinflussbar ist, kann man davon ausgehen, dass miR-142 tatsächlich an die 3'UTR von IL1A bindet und zwar über diese zweite vorhergesagte Bindestelle. Dies ist also ein weiterer Hinweis darauf, dass die mRNA von IL1A durch miR-142 reguliert wird.



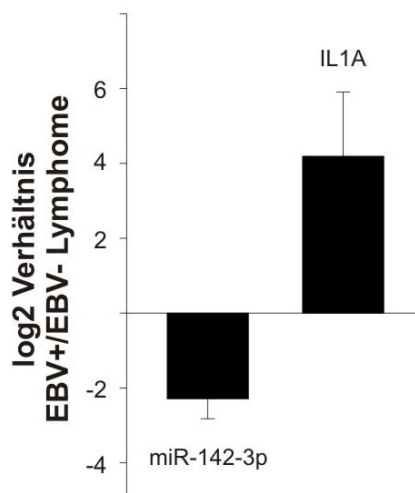
**Abbildung 33: Identifikation der Zielsequenz von miR-142 in der IL1A-3'UTR**

Dargestellt sind die mittleren, relativen Luciferase-Aktivitäten aus fünf unabhängigen Experimenten mit ihrem Standardfehler im doppelten Ansatz. Die Luciferase-Assays wurden 48 h nach Transfektion von 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmid durchgeführt. Die mittlere Luciferase-Aktivität von Reportervektor mit Kontrolle ist auf 100 % gesetzt. Die Koexpression von miR-142 führt bei der IL1A-3'UTR ( $p < 0,05$ ) und bei Mutante I ( $p < 0,05$ ) zu einer Reduktion der Luciferase-Aktivität um ~30 %. Auf die Aktivität von Mutante II hat miR-142 keinen Einfluss.

### 6.6.3.2. Korrelation zwischen der Expressionsmenge von miR-142-3p und der IL1A-mRNA in den untersuchten Tumoren

Um eine mögliche Korrelation zwischen der Expression von miR-142-3p und IL1A in den sequenzierten Geweben zu untersuchen, wurde die cDNA der verschiedenen Tumoren mit Hilfe einer quantitativen Real-Time PCR analysiert. Durch das Verwenden von SYBR Green und spezifischen Primern konnte auch in vorherigen Experimenten bereits gezeigt werden, dass miR-142-3p in EBV-positiven im

Vergleich zu EBV-negativen Lymphomen reprimiert ist (Abbildung 34). Die Amplifikation bzw. Detektion der IL1A-mRNA erfolgte mit Hilfe von spezifischen Primern und der „Universal Probe Library“ von Roche. Um die Expression mit Hilfe der relativen Quantifizierung analysieren zu können, wurde ein interner Standard für die cDNA mitgeführt, 5.8sRNA für miRNAs und GAPDH für mRNAs. Die Auswertung erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode und das Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten ist als log2 in Abbildung 34 dargestellt. Wie bereits in den vorhergehenden Experimenten beobachtet, ist die Expression von miR-142-3p in den EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen im Vergleich zu den EBV-negativen T-Zell Lymphomen vermindert. Die mRNA von IL1A ist trotz des großen Standardfehlers stärker in den EBV-positiven Tumoren exprimiert als in den EBV-negativen. Die Expression von IL1A ist also anscheinend mit der Expression der miR-142-3p in NKT- bzw. T-Zell Lymphomen invers korreliert, was ebenfalls indirekt für eine Regulation von IL1A durch miR-142 spricht.

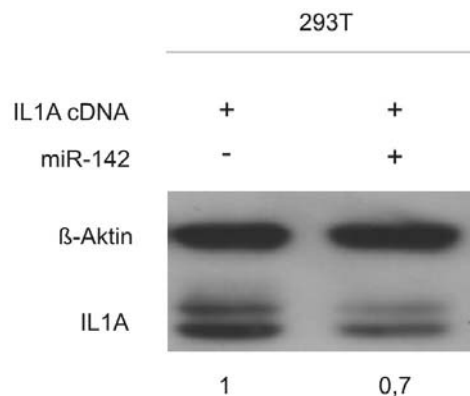


**Abbildung 34: Expressionsverhältnis von miR-142-3p and IL1A-mRNA zwischen EBV-positiven und EBV-negativen Lymphomen**

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR im LightCycler wurde die Expression von miR-142-3p und der IL1A-mRNA in den EBV-positiven and EBV-negativen Lymphomen in drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Die relative Quantifizierung mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode erlaubt eine Aussage über die Expressionsverhältnisse in beiden Tumorentitäten, wobei hier die log2-Werte zur vereinfachten Veranschaulichung dargestellt wurden. Während in den EBV-positiven Lymphomen weniger miR-142-3p als in den EBV-negativen nachgewiesen werden konnte, wurde die IL1A-mRNA stärker in den EBV-positiven Lymphomen exprimiert.

### 6.6.3.3. miR-142 inhibiert die Expression eines IL1A-Volllängen-Konstrukts in 293T-Zellen

Nachdem auf der mRNA-Ebene gezeigt werden konnte, dass miR-142 einen Effekt auf IL1A hat, sollte nun der Einfluss der miRNA auf die Proteinmenge untersucht werden. Dazu wurden zunächst 293T-Zellen mit miR-142 und einem Volllängen-cDNA-Klon kotransfiziert, der sowohl für den offenen Leserahmen als auch für die untranslatierte Region von IL1A kodiert. Die Zellen wurden nach 48 h zu Zellextrakten verarbeitet und 30 µg Gesamtprotein in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt. Der Proteinnachweis erfolgte in einem Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen IL1A bzw. β-Aktin. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mittels ImageQuant, wobei β-Aktin als Ladekontrolle diente. Abbildung 35 zeigt eines von drei repräsentativen Experimenten, in dem die Kotransfektion von miR-142 die Expression des ~ 33 kDa großen IL1A-Vorläufers um 30 % reduzierte. Die resultierende Doppelbande für IL1A ist wahrscheinlich auf posttranslationale Modifikationen von IL1A zurückzuführen.



**Abbildung 35: miR-142 reduziert die Expression eines Volllängen-cDNA-Klons von IL1A in 293T-Zellen**

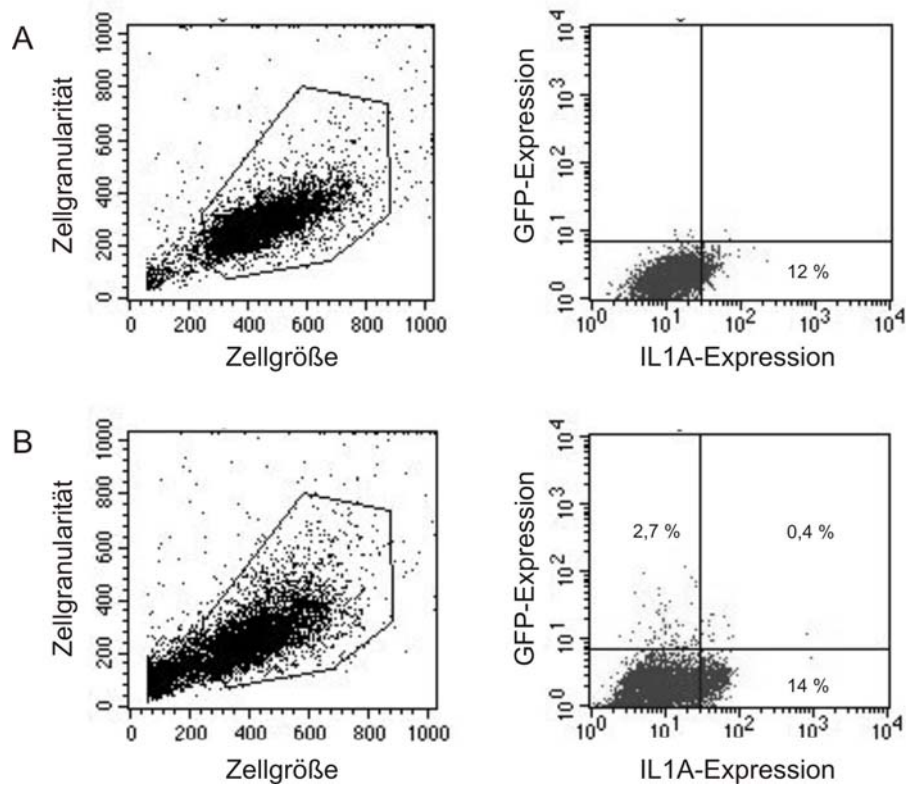
293T Zellen wurden mit 0,5 µg Volllängen-IL1A-cDNA und je 2,5 µg Kontrollvektor bzw. miR-142 transfiziert. Nach 48 h wurden 30 µg Proteinextrakt in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und IL1A, sowie die Ladekontrolle β-Aktin im Western Blot mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Kotransfektion von miR-142 verursachte eine Reduktion der IL1A-Expression um 30 %. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageQuant und das Verhältnis von IL1A zu β-Aktin wurde in kontrolltransfizierten Zellen gleich eins gesetzt.

Mit Hilfe des Volllängenkonstrukts konnte also ein erster Hinweis erbracht werden, dass miR-142 die Proteinmenge von IL1A reduziert. Es handelte sich bei diesem Experiment allerdings um ein artifizielles System, da nicht die endogene Proteinmenge von IL1A untersucht wurde, sondern die Expression eines transfizierten Konstrukts.

#### **6.6.3.4. Einfluss von miR-142 auf die endogene Proteinmenge von IL1A in NK bzw. T-Zellen**

Im nächsten Schritt sollte die Reduktion der endogenen IL1A-Menge in NK- bzw. T-Zelllinien durch miR-142 gezeigt werden. Da die EBV-positiven NK-YS Zellen nicht mehr weiterkultiviert werden konnten, musste auf die EBV-negativen Zelllinien zurückgegriffen werden. Die Untersuchung von Zellextrakten im Western Blot konnte jedoch keine Signale für endogenes IL1A in SUP-T1 oder NK-92 Zellen detektieren. Deshalb wurden mit diesen Zelllinien sensitivere FACS-Analysen durchgeführt. Um den Einfluss der microRNA auf die Proteinmenge des IL1A-Vorläufers zu untersuchen, wurde IL1A intrazellulär in NK-92 und SUP-T1 Zellen mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Unspezifische Signale wurden durch den Einsatz eines isotypspezifischen Kontrollantikörpers ausgeschlossen. Da beide Zelllinien eine starke miR-142-3p Expression zeigen, sollte die endogene miRNA mit Hilfe von 2'-O-methyl-antisense RNA reduziert werden und der daraus resultierende Effekt auf die IL1A-Menge untersucht werden. Abbildung 36 zeigt die intrazelluläre IL1A-Expression, die spezifisch mit einem PE-gekoppelten Antikörper angefärbt wurde. Dargestellt sind die untransfizierten NK-92 Zellen (Abbildung 36 A) und Zellen, die zunächst mit GFP transfiziert wurden (Abbildung 36 B). Zunächst wurde mit Hilfe von Zellgröße und –granularität die Lebendpopulation der untersuchten Zellen bestimmt. Die y-Achse stellt die Expression von GFP in der untersuchten Lebendpopulation dar. Währenddessen gibt die x-Achse die Expression von IL1A in der lebenden Zellpopulation wieder. Die größte Population bestand aus Zellen, die weder IL1A exprimieren, noch mit GFP transfiziert waren und ist im linken, unteren Quadranten dargestellt. Von den untersuchten Zellen exprimierten lediglich 14 % der Zellen überhaupt intrazelluläres IL1A (rechte Quadranten). Da sich die Zellen kaum mit GFP transfizieren ließen (obere Quadranten), resultierte daraus, dass nur 0,4 % der Zellen transfiziert waren und IL1A exprimierten (rechter, oberer Quadrant). Dieses Ergebnis zeigte, dass die Analyse der IL1A-Expression mit Hilfe der FACS-Analyse in NK-92 Zellen nicht möglich war.





**Abbildung 36: IL1A-Expression in GFP-transfizierten NK-92 Zellen**

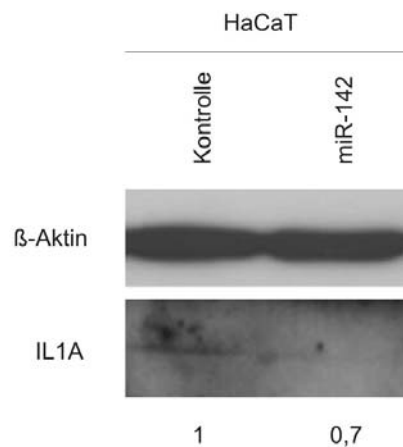
A: Das linke Diagramm zeigt Zellgröße und –granularität der untersuchten Zellen mit Selektion der lebenden Population. Im rechten Diagramm ist die IL1A-Expression dargestellt. 12 % der Zellen exprimieren IL1A. B: Links ist die Zellgröße GFP-transfizierter NK-92 Zellen abgebildet. Rechts ist die GFP-Expression, sowie die IL1A-Expression dargestellt. Während 14 % der Zellen IL1A-positiv sind, findet man 2,7 % GFP-exprimierende Zellen und 0,4 % Zellen, die sowohl GFP als auch IL1A exprimieren.

Die Analyse der intrazellulären IL1A-Expression in SUP-T1 Zellen mittels FACS-Analyse konnte ebenfalls nicht durchgeführt werden. Die Transfektion der Zellen resultierte in einem großen Anteil apoptotischer Zellen. Diese apoptotische Population zeigte eine starke Eigenfluoreszenz, die mit den anderen Fluoreszenzsignalen so stark überlappte, dass eine Unterscheidung zwischen toten und transfizierten bzw. IL1A-gefärbten Zellen nicht möglich war.

#### 6.6.3.5. miR-142 reduziert die endogene Proteinmenge und die Sekretion von IL1A in HaCaT-Zellen

Da mit Hilfe der zur Verfügung stehenden NK- und T-Zelllinien die Auswirkung von miR-142 auf die endogene IL1A-Proteinmenge nicht untersucht werden konnte, wurde auf die Zelllinie HaCaT zurückgegriffen. HaCaT ist eine humane Keratinozyten-Zelllinie und wurde ausgewählt, weil sie konstitutiv IL1A exprimiert und sezerniert (van Rietschoten et al., 2006). Die Zellen wurden mit je 2 µg Kontrollvektor

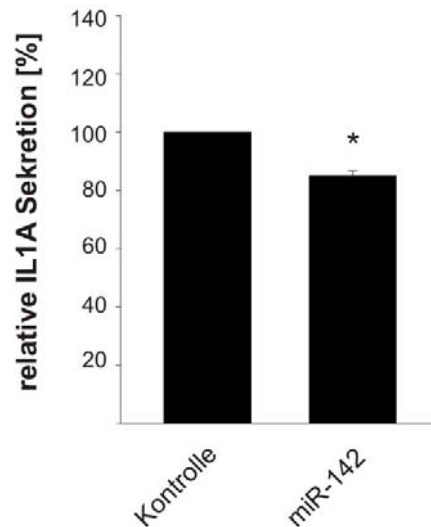
bzw. miR-142 transfiziert. Nach 48 h wurden die Proteine extrahiert, 30 µg in einem 12,5%igen Gel aufgetrennt und endogenes IL1A bzw. β-Aktin als Ladekontrolle im Western Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper angefärbt. Abbildung 37 zeigt, dass miR-142 die endogene Proteinmenge des ~ 33 kDa großen IL1A-Vorläufers um 30 % reduzieren konnte. Somit konnte gezeigt werden, dass die microRNA auch einen Einfluss auf die endogene Proteinmenge von IL1A hat. Im Western Blot konnte man jedoch kein Signal für das ~17 kDa große, reife IL1A detektieren, welches von den Zellen sezerniert werden kann.



**Abbildung 37: Einfluss von miR-142 auf die endogene Expression von IL1A in HaCaT-Zellen**

HaCaT-Zellen wurden in 6-Lochplatten mit Metafectene und je 2 µg miR-142 bzw. Kontrollvektor transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Auftrennung von 30 µg Proteinextrakt im 12,5%igen SDS-Gel. Die Proteine IL1A und β-Aktin wurden mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. Die Quantifizierung der 30%igen Reduktion von IL1A durch miR-142 erfolgte mittels ImageQuant. Dazu wurde das Verhältnis von IL1A zu β-Aktin in kontrolltransfizierten Zellen gleich eins gesetzt.

Um zu zeigen, dass miR-142 durch Reduktion der endogenen Menge an Vorläufer-IL1A auch die Sekretion von reifem IL1A beeinflussen kann, sollte die IL1A-Sekretion im ELISA gemessen werden. Dazu wurde die Menge von IL1A in den Überständen der oben beschriebenen kontroll- und miRNA-transfizierten HaCaT-Zellen bestimmt. Abbildung 38 zeigt die relative IL1A-Sekretion aus drei unabhängigen Versuchen im doppelten Ansatz mit zugehörigem Standardfehler. Man kann erkennen, dass miR-142 die Sekretion von IL1A in HaCaT-Zellen statistisch signifikant um 15 % ( $p < 0,05$ ) reduziert.



**Abbildung 38: Reduktion der IL1A-Sekretion von HaCaT-Zellen durch miR-142**

HaCaT-Zellen wurden in 6-Lochplatten mit Metafectene und je 2 µg miR-142 bzw. Kontrollvektor transfiziert. Der Überstand wurde 48 h später abgenommen und der IL1A-Gehalt mittels Antikörper im ELISA gemessen.

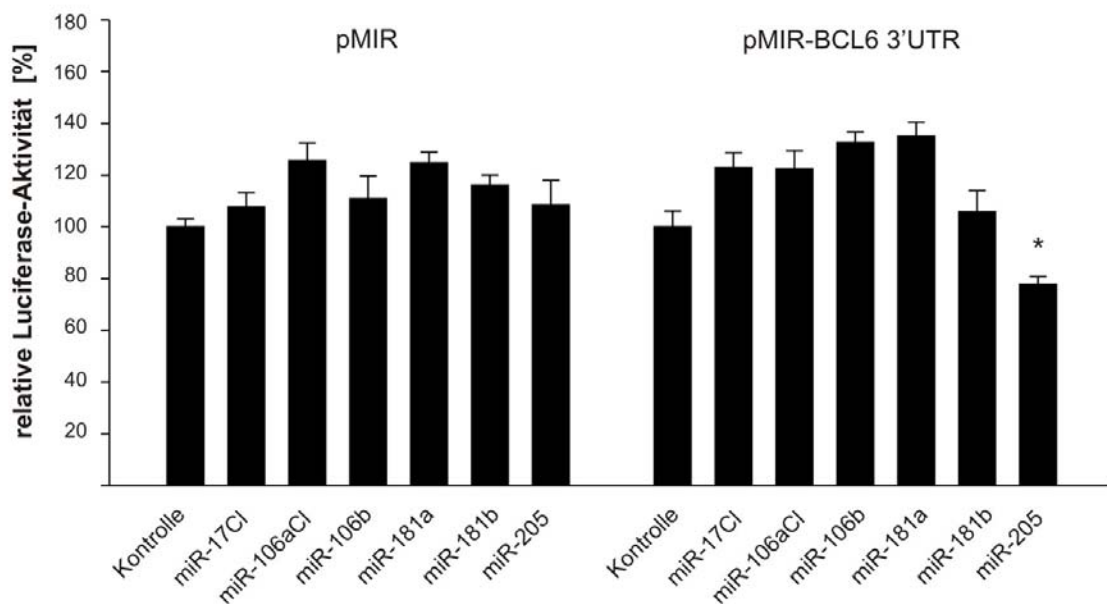
Aufgrund der Ergebnisse aus den Reporterassays, der quantitativen Real-Time PCR, der Western Blots und des ELISAS kann man folgern, dass miR-142 in der Lage ist IL1A durch Binden an seine 3'UTR posttranskriptionell zu regulieren.

#### **6.6.4. BCL6 als Target von miR-205**

Die mRNA für BCL6 (B-cell Lymphoma 6) sollte laut Expressionsanalyse der Gruppe um Zhang (Zhang et al., 2006) in den EBV-positiven Lymphomen stärker exprimiert werden als in Lymphozyten. BCL6 ist ein Zinkfinger-Protein, das ein weiteres interessantes miRNA-Target darstellt, da es als Transkriptionsfaktor u.a. eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation hat. Weiterhin vermutet man, dass die Repression von PDCD2 durch das Proto-Onkogen BCL6 eine Rolle bei der Pathogenese von verschiedenen Lymphomen hat (Baron et al., 2007). Die Regulation von BCL6 durch miRNAs könnte eine mögliche Erklärung für die abnormale BCL6 Expression in Non-Hodgkin-Lymphomen sein (Hyjek et al., 2001). Deshalb sollten mit Hilfe von SigTerms in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen reprimierte miRNAs gefunden werden, die möglicherweise BCL6 regulieren und so zu einer verstärkten BCL6-Menge in den EBV-positiven Lymphomen führen. Die Vorhersage ergab, dass BCL6 ein Target für miR-17, miR-20a, miR-106, miR-181 und miR-205 sein könnte.

### 6.6.4.1. Einfluss verschiedener miRNAs auf die Aktivität eines BCL6-Reporterkonstrukts

Zunächst wurden die Cluster für miR-17 und miR-106a, sowie die einzelnen microRNAs miR-106b, miR-205, miR-181a und miR-181b als Vertreter der miR-181-Familie auf ihre Bindung an die BCL6-3'UTR im Luciferase-Assay untersucht. Dazu wurde die 3'UTR von BCL6 hinter das Firefly-Luciferase-Gen von pMIR-RNL-TK kloniert und der Einfluss kotransfizierter miRNAs auf die Luciferase-Aktivität des Reporterkonstrukts 48 h nach Transfektion in 293T-Zellen untersucht. Abbildung 39 stellt die relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten aus drei unabhängigen Experimenten mit zugehörigen Standardfehlern dar. Wie man erkennen kann, führte die Kotransfektion von miR-17Cl, miR-106aCl, miR-106b oder miR-181a zu einer Steigerung der Aktivität des BCL6-Reporters um 20-30 %. Allerdings haben miR-106aCl und miR-181a bereits einen ähnlichen Effekt auf den Leervektor. Während miR-181b keinen Einfluss hat, ist miR-205 die einzige miRNA, die zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Aktivität des Reporterkonstrukts auf 78 % führt ( $p < 0,05$ ).

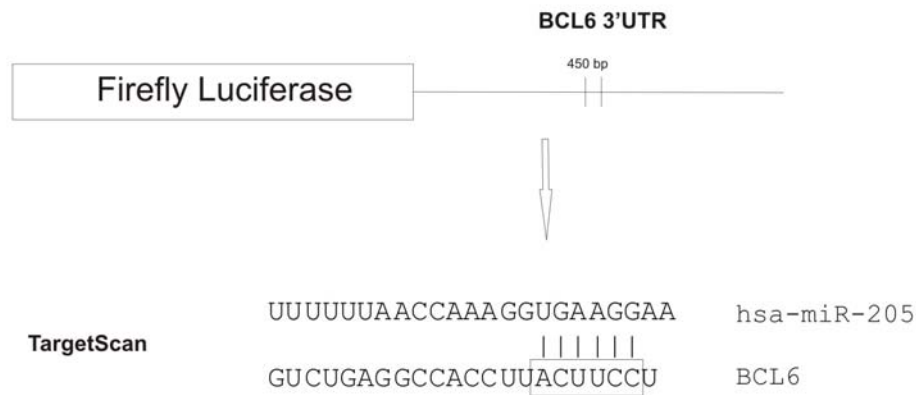


**Abbildung 39: Einfluss verschiedener miRNAs auf die BCL6-3'UTR**

293T-Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit 0,2 µg Reporterplasmid und 0,8 µg Effektorplasmid im Luciferase-Assay untersucht. Dargestellt sind die relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten aus drei unabhängigen Experimenten im Doppelansatz mit ihrem Standardfehler. Während miR-17Cl, miR-106aCl und miR-181a zu einer leichten Aktivitätssteigerung des BCL6-Reporterkonstrukts führten, hatte miR-181b keinen Effekt. Die Kotransfektion von miR-205 reduzierte die Luciferase-Aktivität statistisch signifikant um 22 % ( $p < 0,05$ ).

Um die Bindung von miR-205 an die BCL6-3'UTR zu bestätigen und näher zu untersuchen, wurde die von TargetScan vorhergesagte Bindestelle der miRNA in der

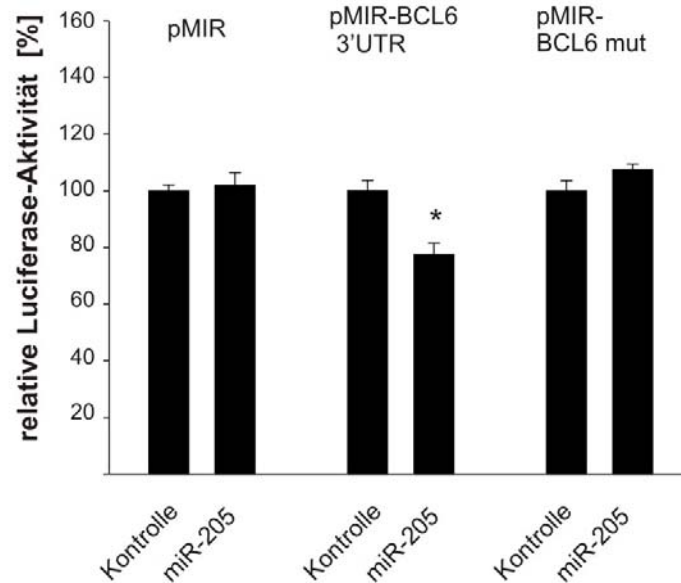
3'UTR mit Hilfe einer zielgerichteten Mutagenese verändert. Abbildung 40 zeigt die Bindestelle der miRNA in der 3'UTR und die markierte Seed-Sequenz, die mutiert wurde.



**Abbildung 40: Schematische Übersicht der Bindung von miR-205 in der BCL6-3'UTR**

Dargestellt ist die von TargetScan vorhergesagte Bindestelle für miR-205 in der 3'UTR von BCL6. Die zur Seed-Sequenz der miRNA komplementäre Sequenz, welche mutiert wurde, ist durch ein Rechteck markiert.

Die mutierte BCL6-3'UTR wurde anschließend neben dem Leervektor und der Wildtyp-3'UTR erneut in Luciferase-Assays auf eine Regulation durch miR-205 getestet. In Abbildung 41 sind die Ergebnisse der relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten mit ihrem Standardfehler aus vier unabhängigen Versuchen im Doppelansatz dargestellt. Während miR-205 die Luciferase-Aktivität der Wildtyp-3'UTR statistisch signifikant um 22 % ( $p < 0,05$ ) reduzierte, hatte sie keinen Effekt auf die mutierte 3'UTR. Somit konnte die vorhergesagte Bindestelle bzw. die Regulation der BCL6-3'UTR durch miR-205 im Reporterassay bestätigt werden.

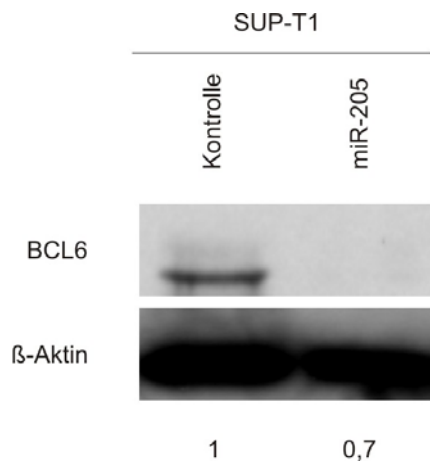


**Abbildung 41: Identifizierung der Bindungsstelle von miR-205 in der BCL6-3'UTR**

48 h nach Transfektion von 293T-Zellen mit 0,2  $\mu\text{g}$  Reporter- und 0,8  $\mu\text{g}$  Effektorplasmid wurde die Luciferase-Aktivität der verschiedenen Transfektionsansätze gemessen. Es sind die relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten mit zugehörigem Standardfehler aus vier unabhängigen Versuchen im Doppelansatz dargestellt. Während miR-205 die Luciferase-Aktivität der *wt*-3'UTR statistisch signifikant um 22 % ( $p < 0,05$ ) reduziert, hat sie keinen Effekt auf die mutierte BCL6-3'UTR.

#### 6.6.4.2. miR-205 reduziert die endogene Proteinmenge von BCL6

Im nächsten Schritt sollte gezeigt werden, dass die Bindung von miR-205 an die 3'UTR von BCL6 auch einen Effekt auf die Proteinmenge von BCL6 hat. Deshalb wurde die T-Zelllinie SUP-T1 mit dem Expressionsplasmid, welches für die miRNA kodiert, transfiziert und 30  $\mu\text{g}$  Protein 48 h nach Transfektion im 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Der Western-Blot wurde mit BCL6- bzw.  $\beta$ -Aktin-spezifischen Antikörpern inkubiert. Abbildung 42 stellt einen von mehreren repräsentativen Western Blots dar. Wie man erkennen kann führt die Kotransfektion von miR-205 in SUP-T1 zu einer deutlichen Reduktion der BCL6-Proteinmenge um etwa 30 %.



**Abbildung 42: Reduktion von BCL6 durch miR-205 in SUP-T1 Zellen**

SUP-T1 Zellen wurden mit 2 µg Kontrollvektor oder miRNA-Expressionsplasmid mit Hilfe eines Nucleofactors transfiziert. 48 h nach Transfektion isolierte man die Gesamtproteine und trennte 30 µg in einem 10%igen Polyacrylamidgel auf. BCL6 und die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western Blot sichtbar gemacht. Die Transfektion von miR-205 reduziert die Proteinmenge von BCL6 um etwa 30 %. Zur Quantifizierung wurde das Verhältnis zwischen BCL6 und  $\beta$ -Aktin kontrolltransfizierten Zellen gleich eins gesetzt.

Mit Hilfe der durchgeführten Reporterassays und des Western Blots konnte also gezeigt werden, dass miR-205 an die 3'UTR von BCL6 bindet und dadurch zur Reduktion der BCL6-Proteinmenge führt.

### 6.7. Identifizierung von zellulären Zielgenen EBV-kodierter miRNAs

Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit war die Identifizierung von zellulären Zielgenen viraler miRNAs in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen Dölken, Haas und Meister des NGFN+ Forschungsverbundes zur Analyse herpesviraler miRNAs. Zunächst wurden Immunpräzipitationen der Argonaut-Protein enthaltenden RISC-Komplexe in EBV-negativen (BL41) und EBV-positiven B-Zellen (Jijoye, BL41-B95.8) durchgeführt. Ein anschließender Vergleich der in den RISC-Komplexen vorliegenden mRNAs mittels Mikroarray-Analysen sollte mögliche miRNA-Targets EBV-kodierter und EBV-regulierter, zellulärer miRNAs identifizieren (Dölken et al., 2010; Shinozaki et al., 2010). Es wurden zwei EBV-positive Zelllinien für die Studie herangezogen, da BL41-B95.8 zwar das natürliche EBV-infizierte „Gegenstück“ zu EBV-negativen BL41 ist, jedoch einen großen Teil der EBV-kodierten BART-miRNAs aufgrund einer genomischen Deletion nicht exprimiert. Die Zelllinie Jijoye hingegen exprimiert alle viralen miRNAs. Die bioinformatische Vorhersage von Targets viraler miRNAs gestaltet sich zurzeit sehr schwierig, da es bislang keinen öffentlich zugänglichen Algorithmus für die Vorhersage von viralen miRNA-Targets gibt.

---

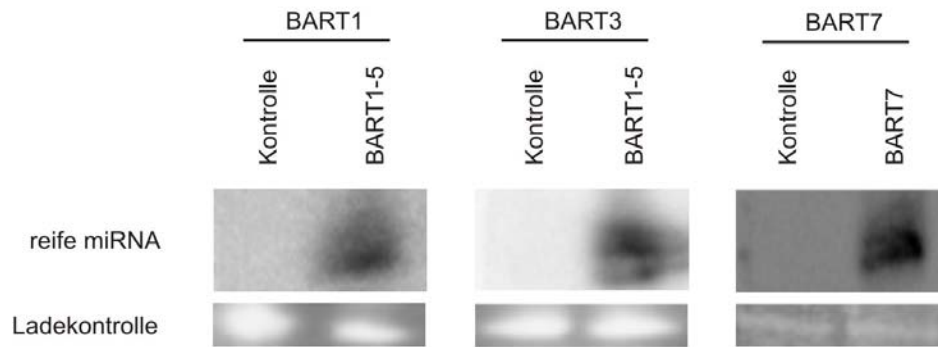
Deshalb sollten zunächst die mit Hilfe der Mikroarrays identifizierten, potentiellen Targets im Reporterassay auf die Regulation durch eine der EBV-miRNAs getestet werden.

### **6.7.1. Expressionskontrolle von BART-miRNA Expressionsplasmiden**

Um dieses Vorhaben zu vereinfachen, wurden alle EBV-kodierten miRNAs in eukaryotische Expressionsvektoren so kloniert, dass immer mehrere im EBV-Genom nebeneinander liegende miRNAs zusammen in einem Vektor exprimiert wurden. Die meisten der Cluster wurden freundlicherweise von Dr. Stephanie Barth zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit wurden zunächst nur das Cluster BART1-5, welches die miRNAs BART-1, -3, -4, -5 und -15 enthält, sowie BART-7 in den eukaryotischen Expressionsvektor pSG5 kloniert. Die Expression der miRNAs wurde 48h nach Transfektion in 293T-Zellen im Northern Blot getestet. Jeweils 20 µg Gesamt-RNA wurden dazu im 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Der Nachweis erfolgte mittels spezifischer, radioaktiv markierter RNA-Sonden. Das Färben des Gels mit Ethidiumbromid ermöglichte die Verwendung der tRNA-Bande als Ladekontrolle. Es wurden nicht alle miRNAs des Clusters BART1-5 auf Expression im Northern Blot getestet, sondern nur zwei der miRNAs. Da spezifische Sonden die Expression von BART1 und BART3 nach Transfektion des Clusters im Northern Blot (Abbildung 43) detektierten, konnte davon ausgegangen werden, dass auch alle anderen miRNAs exprimiert bzw. prozessiert wurden. Die Transfektion des Expressionskonstrukts für BART7 zeigte ebenfalls, dass die miRNA exprimiert und prozessiert wurde.

Somit konnten diese Expressionsplasmide in nachfolgenden Experimenten zur Überexpression der miRNAs eingesetzt werden.





**Abbildung 43: Expressionskontrolle viraler miRNA-Expressionsplasmide im Northern Blot**

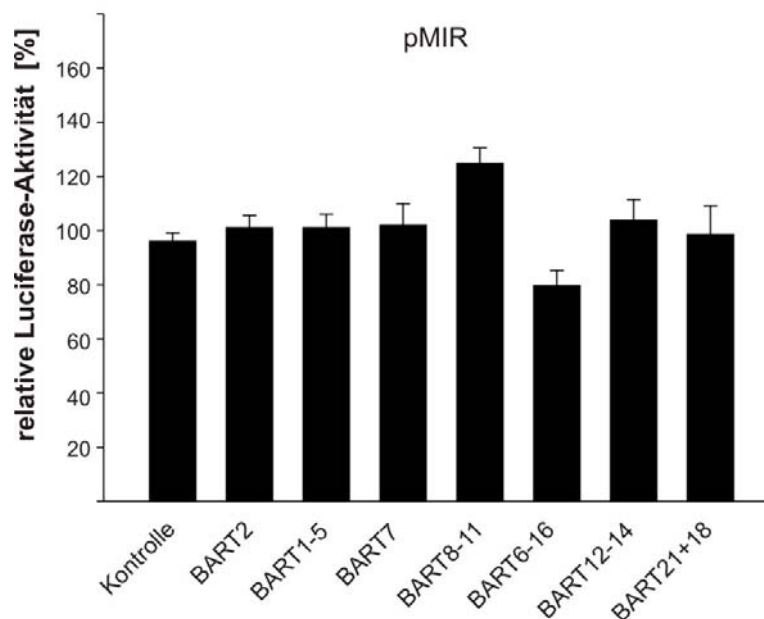
48 h nach Transfektion von 293T-Zellen mit pSG5 oder den EBV-miRNA Expressionsplasmiden wurde die Gesamt-RNA isoliert. 20 µg RNA wurden in einem 12,5%igen, harnstoffhaltigen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und anschließend immobilisiert. Die reife miRNA-Sequenz wurde durch radioaktiv markierte, einzelsträngige RNA-Sonden, die komplementär zur miRNA-Sequenz sind, nachgewiesen. Die Banden der tRNA wurden durch Färben des Gels mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und dienten als Ladekontrolle. Es konnten Banden auf Höhe der reifen miRNAs für BART1, BART3 und BART7 detektiert werden.

### 6.7.2. Die 3'UTR von ELK3 und SOCS3 wird nicht durch BART-miRNAs reguliert

Zwei der Kandidaten, die im RISC-Komplex von Jijoye stärker angereichert waren als in den EBV-negativen BL41-Zellen, waren ELK3 (ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)) und SOCS3 (suppressor of cytokine signalling). Die Anreicherung von ELK3 im RISC-Komplex von Jijoye-Zellen war 3,1-fach stärker verglichen zu der in BL41-Zellen, während in BL41-B95.8 kaum ein Unterschied (1,3-fach) zur EBV-negativen Zelllinie erkennbar war (Dolken et al., 2010). ELK3 gehört zur ETS-Transkriptionsfaktorfamilie und kann einerseits einen negativen Einfluss auf die Transkription haben, andererseits aber auch in Gegenwart von Proteinen wie Ras oder Src zur Transkriptionsaktivierung führen. Da ELK3 eine Rolle bei der B-Zellreifung hat (Lopez et al., 1994), könnte es ein interessantes Target für EBV-kodierte miRNAs darstellen.

Die mRNA von SOCS3 war sogar 7,1-fach stärker in Jijoye- als in den BL41-RISC-Komplexen vertreten, in EBV-positiven BL41-B95.8 gab es wiederum keinen signifikanten Unterschied (1,4-fach) zu EBV-negativen BL41 (Dolken et al., 2010). Da SOCS3 die Zytokin-Signalgebung von IL-6 unterdrückt, stellt das Gen ein interessantes Target dar. Durch eine Reduktion von SOCS3 könnte die Signalgebung des B-Zell-Wachstumsfaktors IL-6 nicht mehr unterdrückt werden, was den Zellen ein stärkeres Wachstum erlauben würde (Kenney, 2006; Scala et al., 1990). Weiterhin ist SOCS3 auch an der Reifung von B-Zellen beteiligt.

Da die Anreicherung für beide mRNAs in den RISC-Komplexen von BL41-B95.8 nicht wesentlich stärker als in den EBV-negativen Zellen war, konnte man davon ausgehen, dass die viralen miRNAs, welche im EBV-Stamm B95.8 deletiert sind, für die Anreicherung von ELK3 und SOCS3 in den RISC-Komplexen verantwortlich war. Deshalb sollten lediglich die EBV-kodierten BART-miRNAs getestet werden. Dazu wurden die vollständigen 3'UTRs hinter das Gen der Firefly-Luciferase in den Vektor pMIR-RNL-TK kloniert. Die Luciferase-Assays wurden 48 h nach Transfektion von 0,8 µg Effektor- und 0,2 µg Reporterplasmid durchgeführt. Zunächst wurde der Einfluss aller BART-Cluster auf den leeren Reportervektor getestet. Abbildung 44 zeigt die resultierenden, mittleren Luciferase-Aktivitäten aus vier unabhängigen Experimenten im Doppelansatz mit zugehörigem Standardfehler. Lediglich die Cluster BART8-11 und BART6-16 haben einen Einfluss auf den leeren Kontrollvektor. Während Kotransfektion von BART8-11 zu einer Steigerung der Luciferase-Aktivität um 25 % führt, hat die Kotransfektion des Clusters BART6-16 eine 20%ige Reduktion zur Folge.

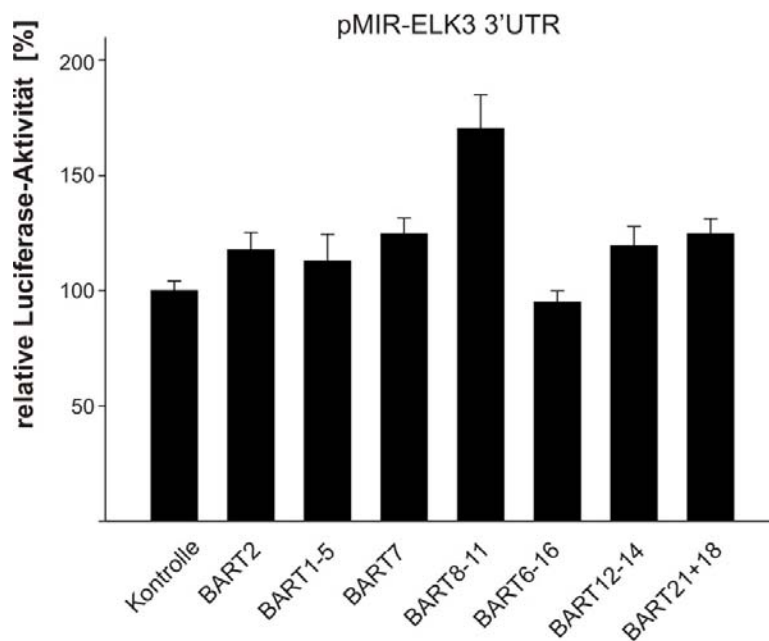


**Abbildung 44: Einfluss der verschiedenen BART-Cluster auf die Aktivität des Leervektors pMIR-RNL-TK**

Die Luciferase-Assays wurden 48 h nach Transfektion von 0,2 µg pMIR-RNL-TK und 0,8 µg Effektorplasmid durchgeführt. Dargestellt sind vier unabhängige Versuche im Doppelansatz mit zugehörigen Standardfehlern. BART8-11 führt zur Steigerung der Luciferase-Aktivität des Reporters um 25 %, während Kotransfektion von BART6-16 eine Reduktion um 20 % zur Folge hat.

Im folgenden Diagramm (Abbildung 45) ist die Regulation der ELK3-3'UTR durch die BART-Cluster abgebildet. Es handelt sich um die relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten mit ihrem Standardfehler aus vier unabhängigen Versuchen im

Doppelansatz. Man kann erkennen, dass keine der BART-miRNAs in der Lage ist die Luciferase-Aktivität des ELK3-3'UTR-Reporters zu reduzieren. Während die meisten mRNA-Cluster keinen Effekt haben, führt die Kotransfektion von BART7 bzw. BART21+18 zu einer signifikanten 25%igen Steigerung der Reporteraktivität. Durch BART8-11 wird die Luciferase-Aktivität sogar auf 170 % erhöht. Allerdings hat dieses Cluster bereits einen Effekt auf den leeren Kontrollvektor, was die Schlussfolgerung nahelegt, dass es sich um keinen 3'UTR-spezifischen Einfluss handelt.

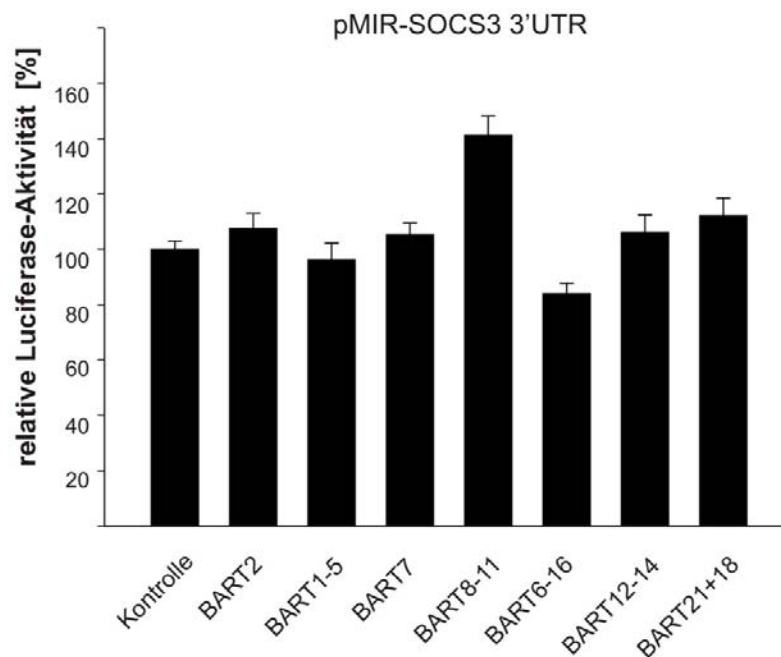


**Abbildung 45: BART-miRNAs haben keinen Einfluss auf die Aktivität des ELK3-3'UTR-Reporterkonstrukts**

293T-Zellen wurden mit je 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmid transfiziert, 48 h später wurden Luciferase-Assays durchgeführt. Es sind die relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten mit ihren zugehörigen Standardfehlern aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Kotransfektion von BART8-11 hat eine Steigerung der Luciferase-Aktivität auf 170 % zur Folge, während BART7 bzw. BART21+18 die Aktivität um 25 % steigern.

Abbildung 46 stellt die Untersuchung zur Regulation der SOCS3-3'UTR durch BART-miRNAs dar. Es handelt sich ebenfalls um die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten im Doppelansatz. Dargestellt sind die daraus resultierenden relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten mit ihren jeweiligen Standardfehlern. Die meisten Cluster haben keinen Effekt auf die Aktivität des Reporterkonstrukts. Kotransfektion von BART8-11 führt zu einer signifikanten Steigerung der Luciferase-Aktivität ( $p < 0,05$ ) um 44 %, während BART6-16 die Aktivität auf 85 % senkt ( $p < 0,05$ ). Vergleicht man diese Werte jedoch mit dem Einfluss, den diese Cluster bereits auf

den leeren Kontrollvektor haben, so kommt man zu dem Schluss, dass es sich um keine 3'UTR-spezifische Regulation handelt.



**Abbildung 46: Einfluss der BART-miRNAs auf die SOCS3-3'UTR**

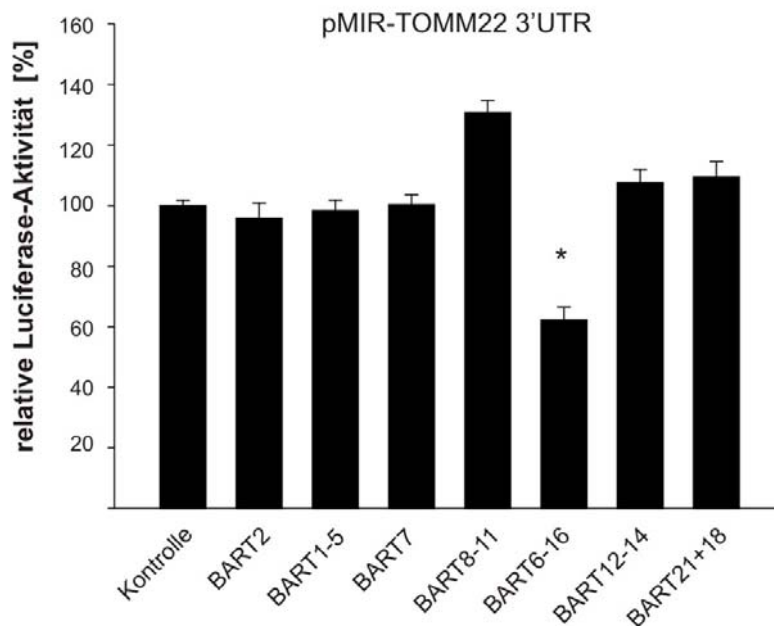
48 h nach Transfektion von 293T-Zellen mit 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmid wurden Luciferase-Assays durchgeführt. Es sind die relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten aus vier unabhängigen Experimenten mit ihren Standardfehlern dargestellt. Während BART6-16 die Luciferase-Aktivität auf 85 % reduziert, führt die Kotretransfektion von BART8-11 zur Aktivitätssteigerung um 44 %.

Somit scheint keine der BART-miRNAs für die Anreicherung der ELK3- oder SOCS3-mRNA in den RISC-Komplexen EBV-positiver Jijoye-Zellen verantwortlich zu sein.

### 6.7.3. Regulation von TOMM22 durch die virale miRNA BART16

Die mRNA von TOMM22 (translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)) war in den RISC-Komplexen der EBV-positiven Jijoye-Zelllinie im Vergleich zu BL41 ebenfalls angereichert (5,4-fach), während in den BL41-B85.8-Zellen kein Unterschied zu BL41 festzustellen war (1,3-fach) (Dolken et al., 2010). TOMM22 ist als mitochondrialer Rezeptor an der Proteintranslokation durch die äußere Mitochondrienmembran beteiligt. Weiterhin haben Untersuchungen gezeigt, dass dieser als Rezeptor für das proapoptische Protein BAX (Cartron et al., 2008) benötigt wird um die BAX-induzierte Apoptose einzuleiten. Da eine Reduktion von TOMM22 somit zu einem Wachstumsvorteil EBV-infizierter Zellen führen könnte, stellte TOMM22 ein interessantes Target für EBV-miRNAs dar.

In Luciferase-Assays wurde der Einfluss der BART-miRNAs auf die 3'UTR von TOMM22 48 h nach Transfektion von 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmid untersucht. Das nachfolgende Diagramm stellt die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten im Doppelansatz mit zugehörigem Standardfehler dar. Man kann erkennen, dass die meisten Cluster keinen Effekt auf die 3'UTR hatten. BART8-11 führt wieder zu einer Aktivierung des Reporterkonstrukts auf 130 %, die jedoch bei Kotransfektion des Leervektors zu beobachten und deswegen vernachlässigbar ist. Lediglich die Kotransfektion von BART6-16 reduziert die Luciferase-Aktivität des TOMM22-3'UTR-Konstrukts statistisch signifikant um 38 %. Da diese Reduktion stärker war als der Effekt des Clusters auf den Leervektor, konnte man davon ausgehen, dass es sich um einen 3'UTR-spezifischen Effekt handelt.

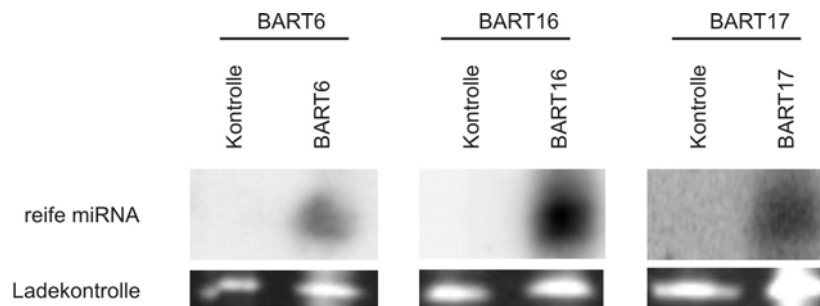


**Abbildung 47: Regulation der TOMM22-3'UTR durch BART6-16**

293T-Zellen wurden mit je 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmid transfiziert um 48 h später Luciferase-Assays durchzuführen. Es handelt sich um vier unabhängige Experimente im Doppelansatz mit den dazugehörigen Standardfehlern. BART8-11 induziert die Luciferase-Aktivität um 30 %, während die Kotransfektion von BART6-16 die Aktivität statistisch signifikant um 38 % reduziert.

Im nächsten Schritt musste untersucht werden, welche der miRNAs, für die das Cluster kodiert, einen Effekt auf die 3'UTR von TOMM22 hat. Daher wurden BART6, BART16 und BART17 einzeln in den Expressionsvektor pSG5 kloniert, damit ihr Einfluss auf das Reporterkonstrukt in nachfolgenden Experimenten untersucht werden konnte. Zunächst sollte jedoch die Expression der Konstrukte im Northern

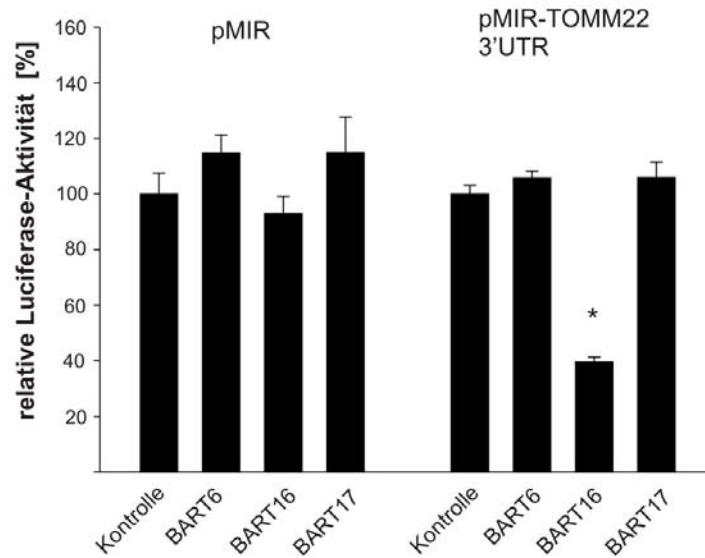
Blot getestet werden. Dazu wurden die Expressionsplasmide in 293T-Zellen transfiziert und 48 h später geerntet. Nach Auftrennung von 20 µg Gesamt-RNA in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel wurde die RNA auf eine Nylonmembran geblottet und immobilisiert. Der Nachweis der reifen miRNAs erfolgte mit Hilfe spezifischer, radioaktiv markierter RNA-Sonden. In Abbildung 48 ist zu erkennen, dass die Transfektion der Expressionskonstrukte für BART6, BART16 und BART17 zur Expression und Prozessierung der reifen miRNAs führt.



**Abbildung 48: Expressionskontrolle von BART6, BART16 und BART17 im Northern Blot**

293T-Zellen wurden mit pSG5 bzw. entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. 48 h später wurde die Gesamt-RNA isoliert und 20 µg der RNA in einem 12,5%igen, harnstoffhaltigen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Anschluss an das Blotten bzw. die Immobilisierung der RNA auf eine Nylonmembran wurden die miRNAs durch radioaktiv markierte, einzelsträngige RNA-Sonden, die komplementär zur miRNA-Sequenz waren, nachgewiesen. Die Banden der tRNA wurden durch Färben des Gels mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und dienten als Ladekontrolle. Es konnten Banden für BART6, BART16 und BART17 in den mit Expressionsvektor transfizierten Zellen nachgewiesen werden.

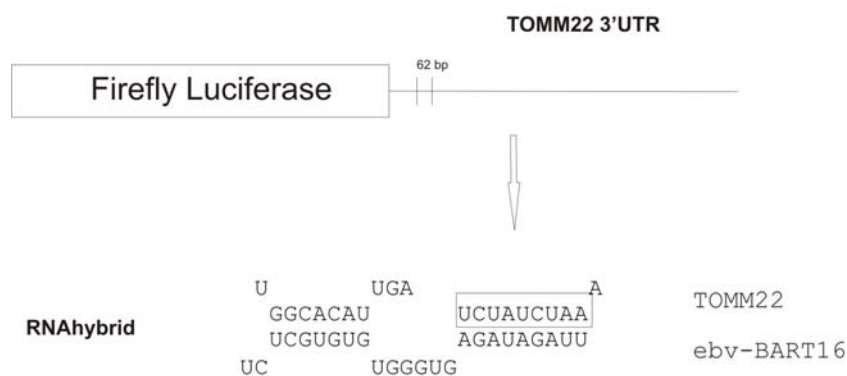
Da die klonierten Expressionsplasmide für BART6, BART16 und BART17 die reifen miRNAs exprimierten, konnten sie anschließend im Luciferase-Assay eingesetzt werden. Abbildung 49 zeigt die relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten aus vier unabhängigen Experimenten im Doppelansatz mit zugehörigem Standardfehler. Im linken Diagrammteil ist der Effekt der einzelnen miRNAs auf den Leervektor dargestellt, im rechten Teil die Regulation der 3'UTR durch die miRNAs. Man kann erkennen, dass von den drei untersuchten BART-miRNAs nur BART16 in der Lage ist, die Luciferase-Aktivität des TOMM22-3'UTR Reporters statistisch signifikant um 60 % zu reduzieren ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 49: Reduktion der Luciferase-Aktivität des TOMM22-3'UTR-Reporterkonstrukts durch BART16**

48 h nach Transfektion von 293T-Zellen mit 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmid erfolgten Luciferase-Assays. Es sind die relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten mit ihren Standardfehlern aus vier unabhängigen Experimenten im Doppelansatz dargestellt. Keine der getesteten miRNAs hat einen signifikanten Effekt auf den Leervektor. BART16 ist als einzige in der Lage die Aktivität des TOMM22-3'UTR-Reporterkonstrukts um 60 % zu reduzieren.

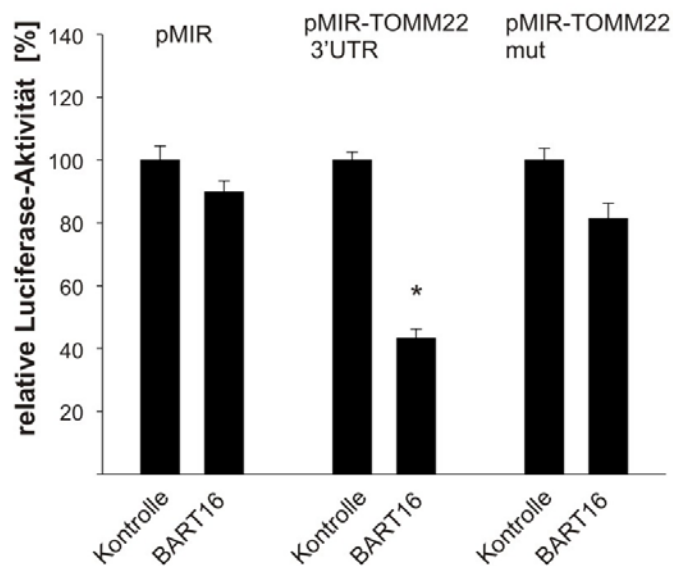
Um die Bindung von BART16 an TOMM22 näher zu untersuchen, wurde die potentielle Bindestelle in der 3'UTR mutiert. Da die Bindestelle eine starke Komplementarität zwischen 3'UTR und miRNA aufwies, wurden mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese neben der Seed-Sequenz noch zwei weitere Nukleotide ausgetauscht (Abbildung 50).



**Abbildung 50: Schematische Darstellung der vorhergesagten Bindestelle von BART16 in der TOMM22-3'UTR**

Dargestellt ist die Lokalisation der vorhergesagten Bindestelle von BART16 in der 3'UTR von TOMM22. Die Sequenz in der 3'UTR von TOMM22, die komplementär zur Seed-Sequenz von BART16 ist und mutiert wurde, ist markiert.

BART16 wurde anschließend erneut auf die Bindung an die 3'UTR von TOMM22 in Reporterassays untersucht. Bei Abbildung 51 handelt es sich um die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt worden waren. Dargestellt sind die relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten mit ihrem Standardfehler. Während die Aktivität des *wt*-Konstrukts durch Kotransfektion von BART16 wieder statistisch signifikant auf 57 % ( $p < 0,05$ ) abfällt, führt die miRNA nur zu einer leichten Reduktion der Luciferase-Aktivität des mutierten Konstrukts auf 81 %. Zieht man jedoch den Einfluss von BART16 auf den Leervektor in Betracht, so handelt es sich um einen unspezifischen, nicht signifikanten Effekt zu handeln. Somit konnte TOMM22 als Target der viralen miRNA BART16 in Reporterassays bestätigt werden.



**Abbildung 51: Einfluss der BART16 auf die *wt*-3'UTR von TOMM22 und ihre Mutante**

48 h nach Transfektion von 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmid wurden Luciferase-Assays durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt wurden. Es handelt sich um die relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten mit ihren zugehörigen Standardfehlern. BART16 reduziert die Aktivität der *wt*-3'UTR statistisch signifikant um 43 % ( $p < 0,05$ ). Die Reduktion der Mutante zeigt im Vergleich zur Reduktion des Leervektors pMIR keinen signifikanten Unterschied.



## 7. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es die miRNA-Expression in EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen zu untersuchen. Dazu wurden zunächst cDNA-Banken aus verschiedenen Geweben mit der 4-5-4 Methode sequenziert und anschließend semimanuell analysiert. Es konnten einerseits EBV-spezifische Unterschiede durch Vergleich mit EBV-negativen T-Zell Lymphomen herausgestellt werden. Andererseits ergab der Vergleich der miRNA-Expressionsprofile beider Lymphomentitäten mit Normalgewebe Hinweise auf den Einfluss von miRNAs bei der Entstehung von NK/T-Zell bzw. T-Zell Lymphomen. Dabei konnte ein erster Einblick gewonnen werden, wie die differentielle Expression von miRNAs dazu beiträgt, günstige Bedingungen für das Wachstum des Tumors zu schaffen. Mit IL1A gelang es, ein Target für miR-142-3p, eine in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen deregulierte miRNA zu entdecken, welches zum Phänotyp dieser Lymphomentität beiträgt. Außerdem konnte das Onkogen BCL6 als Target von miR-205, die in beiden Lymphomen im Vergleich zum Normalgewebe reduziert ist, identifiziert werden.

Weiterhin sollten mit Hilfe von RISC-Immünpräzipitationen aus EBV-positiven und -negativen B-Zelllinien Targets viraler miRNAs bestimmt werden. Im Rahmen dieses Teilprojektes gelang es TOMM22 als Target der EBV-kodierten miRNA BART16 zu identifizieren, dessen Repression der EBV-infizierten Zelle vermutlich einen Wachstumsvorteil verschafft.

### 7.1. Auswahl der Tumoren und Herstellung der cDNA-Banken

Die Auswahl der Tumoren erfolgte mit Hilfe von Frau PD Dr. Marianne Tinguely, Institut für Pathologie des Universitätslinikums Zürich, die uns auch die Tumoren zur Verfügung stellte. Für EBV-assoziierte NK/T-Zell Lymphome ist meist nur wenig Tumormaterial vorhanden, da es sich bei dieser Entität zum einen um eine äußerst selten vorkommende Form von Tumoren handelt und die Lymphome zum anderen durch progressive, nekrotische Läsionen gekennzeichnet sind (Coppo et al., 2009; Moriai et al., 2009). Diese Tatsache erschwert die Untersuchung dieser Tumore stark und deshalb konnten auch in dieser Arbeit lediglich zwei Fälle EBV-positiver, nasaler NK/T-Zell Lymphome eingesetzt werden. Die geringe Anzahl der Proben erlaubte nach Analyse der Daten keine statistische Aussage, sie diente lediglich einer anfänglichen Identifikation deregulierter miRNAs.

Um die miRNA-Expressionsprofile der Lymphome mit denen von Normalgewebe vergleichen zu können, wurde parallel das miRNA-Profil von Thymusgewebe erstellt. Lymphome stellen ein heterogenes Gemisch aus Tumorzellen und nicht entarteten Zellen dar. Um die Normalkontrolle besser mit den Primärtumoren vergleichen zu können, wurde deshalb auf Thymus als Normalgewebe anstatt auf NK- bzw. T-Zelllinien oder isolierte NK- bzw. T-Zellen aus Blut zurückgegriffen, auch wenn diese im Hinblick auf die Zelllinienzugehörigkeit vielleicht geeigneter gewesen wären.

## **7.2. Analyse der cDNA-Banken**

### **7.2.1. Verteilung der kleinen ncRNAs in den untersuchten Geweben**

Nach Analyse der cDNA-Banken wurde das Vorkommen verschiedener kleiner, nicht-kodierender RNAs bestimmt. Aufgrund störender Signale vom Poly(A)-Schwanz bei der Sequenzierung wurden die cDNA-Banken trotz des sehr hohen Zeitaufwandes semimanuell untersucht um falsche „A“s zu identifizieren und eine hohe Anzahl falsch negativer Sequenzannotationen zu vermeiden. In den Banken konnten zwischen 53 % und 86 % der analysierten Sequenzen als zelluläre miRNAs identifiziert werden. Die Gesamtzahl der durch die Sequenzierung erhaltenen Sequenzen schwankte zwischen 46340 für Thymus, 35437 für EBV-negative T-Zell Lymphome und 81889 für die EBV-positiven NK/T-Zell Lymphome. Es wäre denkbar, dass man aufgrund einer schlechteren RNA-Qualität für die EBV-assoziierten Lymphome fast mehr als doppelt so viele Sequenzen wie für die beiden anderen Banken erhalten hatte. Abbildung 13A zeigt zwar keine verstärkte Degradation der kleinen RNA-Fraktion, sie sagt aber nichts über den Abbau größerer RNAs, wie rRNA oder tRNA aus. Da EBV-positive NK/T-Zell Lymphome oftmals eine Vielzahl nekrotischer Zellen aufweisen (Nava and Jaffe, 2005), könnte die Nekrose eine Ursache für den RNA-Abbau sein und damit das verstärkte Vorkommen von Abbauprodukten größerer RNAs in der cDNA-Bank begründen. In Abbildung 13B erkennt man, dass die nach der Amplifikation resultierende cDNA-Menge für beide Gewebe unterschiedlich stark war und ebenfalls Grund für die extrem variable Sequenzzahl sein könnte.

Auffällig war die Korrelation zwischen der Anzahl der identifizierten miRNAs und der Gesamtzahl der erhaltenen Sequenzen. Obwohl die cDNA-Bank der EBV-negativen Lymphome die wenigsten Sequenzen lieferte, fand sich hier mit 86 % der größte

miRNA-Anteil. Die höchste Anzahl an Sequenzen gab es in der cDNA-Bank der EBV-assoziierten Lymphome, wo jedoch nur 53 % als miRNAs identifiziert werden konnten. Weiterhin findet man mit steigender Sequenzzahl der Banken auch prozentual gesehen die meisten ncRNAs wie rRNA, tRNA und sn/snoRNA. Die Größenordnungen der verschiedenen ncRNA-Proportionen dieser Analyse stimmt mit denen aus anderen Untersuchungen überein (Kuchenbauer et al., 2008; Neilson et al., 2007; Zhu et al., 2009b).

### **7.2.2. Differentielle Expression zellulärer miRNAs in den untersuchten Geweben**

In den verschiedenen cDNA-Banken wurden unterschiedlich viele zelluläre miRNAs identifiziert. Die EBV-negativen T-Zell Lymphome exprimierten mit 275 verschiedenen miRNAs die wenigsten miRNAs, gefolgt von EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen mit 325 und Thymus mit 348 verschiedenen miRNAs. Bereits die Gruppe um Zhang konnte durch ihre Untersuchungen zur akuten lymphatischen Leukämie zeigen, dass Tumoren im Vergleich zu Normalgewebe ein weniger komplexes miRNA-Expressionsmuster aufweisen (Zhang and Chen, 2009).

Die Expression einzelner miRNAs innerhalb verschiedener Cluster war in den untersuchten cDNA Banken zum größten Teil nicht konsistent, was nicht im Einklang mit der Untersuchung von Yu und Kollegen war. Diese hatten in Leukämiezellen für einen Großteil der Cluster eine konsistente Expression der miRNAs von einem Cluster gefunden (Yu et al., 2006). Es gibt jedoch Veröffentlichungen, die zeigen, dass miRNAs von genomischen Clustern unabhängig voneinander transkribiert und reguliert werden können (Song and Wang, 2008). In der vorliegenden Arbeit war für das miR-200b-Cluster eine wesentlich stärkere Expression von miR-200b im Vergleich zu miR-200a und miR-429 im Normalgewebe und in den EBV-assoziierten Lymphomen zu erkennen. In EBV-negativen Lymphomen wurden diese miRNAs überhaupt nicht exprimiert. MiR-143 und miR-145, die ebenfalls gemeinsam in einem Cluster kodiert sind, zeigten im Thymus eine ähnliche Expression, während miR-145 in beiden Lymphomarten wesentlich stärker exprimiert wurde. Es gab noch weitere Beispiele für Cluster, deren miRNAs eine unterschiedlich starke Expression zeigten, sowie Cluster, deren miRNAs aufgrund ihrer hohen Sequenzähnlichkeit und aufgrund von Sequenzierungsfehlern nicht voneinander zu unterscheiden waren und deshalb keine Aussage über ihre Expressionsstärke getroffen werden kann. Die Resultate

zeigen, dass die Expression der reifen miRNAs unterschiedlich ist, wobei unklar bleibt, ob diese Tatsache auf eine unabhängige Transkription der miRNAs oder durch zusätzliche Regulation der miRNA-Prozessierung zurückzuführen ist.

#### **7.2.2.1. Expressionsunterschiede der EBV-negativen T-Zell Lymphome im Vergleich zum Normalgewebe**

Für beide Lymphomentitäten konnte eine verstärkte Reduktion von miRNAs im Vergleich zum Normalgewebe beobachtet werden. Von 45 miRNAs, die in EBV-negativen Lymphomen Expressionsunterschiede im Vergleich zum Normalgewebe zeigten, waren 14 in den Tumorgeweben induziert und 31 miRNAs reprimiert (Abbildung 15).

Die Beobachtung, dass Tumore eine reduzierte miRNA-Expression zeigen, wurde bereits in anderen Untersuchungen gemacht (Calin et al., 2004b; Kumar et al., 2007; Lu et al., 2005). Eine Arbeit von Kumar und Kollegen zeigte, dass eine allgemeine Repression von miRNAs die Tumorigenese verstärken kann und dass zumindest zum Teil die Veränderung der miRNA-Prozessierungsmaschinerie in den Tumoren dafür verantwortlich ist (Kumar et al., 2007; Newman and Hammond, 2010). Durch Verlust von Dicer kommt es zur Reduktion von reifen miRNAs (Kumar et al., 2007).

Zu den wichtigsten epigenetischen Veränderungen, die mit maligner Transformation verknüpft sind, zählen Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen, sowie aberrante Histonmodifikationen. Diese stellen ebenfalls eine Möglichkeit zur Stilllegung von miRNAs dar (Agirre et al., 2009; Herman, 2002; Ting et al., 2008). Weiterhin ist bekannt, dass viele miRNAs in fragilen Chromosomenregionen lokalisiert sind, welche eine Assoziation mit Tumoren zeigen und deshalb verstärkt oder vermindert in Tumoren exprimiert werden (Calin et al., 2004b). Anscheinend gibt es noch eine Reihe weiterer Mechanismen bzw. Proteine, die einen Einfluss auf die Regulation der miRNA-Prozessierung haben. Mehrere Gruppen konnten zeigen, dass RNA-bindende Proteine an die primären Transkripte von miRNAs binden und dadurch die Drosha-vermittelte Prozessierung zu reifen miRNAs inhibieren können (Newman et al., 2008; Viswanathan et al., 2008). Die Interaktion von Proteinen wie p53 mit dem Drosha-Komplex kann aber die Prozessierung von ausgewählten pri-miRNAs zu pre-miRNAs auch vereinfachen (Suzuki et al., 2009).

Aufgrund der großen Anzahl deregulierter miRNAs soll hier nur die Funktion von einigen miRNAs besprochen werden. Die im Vergleich zum Normalgewebe

induzierten miRNAs der EBV-negativen Lymphome stimmten fast völlig mit denen aus EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen überein. Zu den am stärksten induzierten miRNAs zählten miR-21 und miR-155. Diese beiden miRNAs sind in einer großen Zahl von Tumoren induziert und in den meisten Zellen wird ihnen eine onkogene Wirkung u.a. durch ihre antiapoptotischen Eigenschaften zugeschrieben (Chan et al., 2005; Selcuklu et al., 2009). Die Induktion dieser miRNAs stimmt auch mit einer Veröffentlichung von Huang und Kollegen überein, die bereits gezeigt hat, dass EBV-positive NK/T-Zell Lymphome miR-21 und miR-155 im Vergleich zu normalen NK-Zellen stärker exprimieren und dass die Induktion dieser miRNAs für die verstärkte AKT-Phosphorylierung in den Lymphomen verantwortlich ist (Chow et al., 2005; Huang et al., 2010; Jeon et al., 2007). In EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen kann die Expression von miR-155 durch die verstärkte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in diesen Lymphomen begründet sein (Chow et al., 2005; Gatto et al., 2008; Jeon et al., 2007). Einige Mitglieder der let-7-Familie wie let-7a, let-7b, let-7f und let-7g zeigten ebenfalls in beiden Lymphomen eine verstärkte Expression im Vergleich zum Normalgewebe, obwohl diese miRNAs eigentlich klassische Tumorsuppressorgene darstellen und in vielen soliden Tumoren reprimiert sind (Esquela-Kerscher and Slack, 2006; Takamizawa et al., 2004; Zhang et al., 2007). Da aber let-7f z.B. für beide Lymphomentitäten eine der am stärksten induzierten miRNAs darstellt, könnte diese miRNA in den Lymphomen wichtige Aufgaben erfüllen, die sich von denen in soliden Tumoren vielleicht unterscheiden. Let-7f kann aber auch zum Tumorwachstum beitragen, da diese miRNA Inhibitoren der Angiogenese hemmt und somit die Entstehung von Blutgefäßen fördert (Kuehbacher et al., 2007).

Die im Vergleich zum Normalgewebe reprimierten miRNAs stimmten nur zum Teil mit denen aus den EBV-positiven Lymphomen überein. Zu den miRNAs, welche in beiden Lymphomen im Vergleich zum Thymus reprimiert waren, zählten miR-218 und miR-455-3p. Für die muskelspezifische miR-455-3p ist bisher noch kein Zusammenhang mit Tumoren bekannt und die Funktion der Repression in den Lymphomen bleibt deshalb unklar (Walden et al., 2009). Währenddessen konnte die Repression von miR-218 bereits in Magenkarzinomen beobachtet werden. Die miRNA wirkte dort als Inhibitor von Invasion bzw. Metastasierung und ihre verringerte Expression war mit einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B assoziiert (Gao et al., 2008; Tie et al., 2010; Zunino et al., 2001). Somit könnte die Reduktion von miR-218 auch zur Entstehung bzw. Progression der hier untersuchten Lymphome beitragen.

Die in verschiedenen soliden Tumoren, wie z.B. in Prostatakarzinomen (Szczyrba et al., 2010) und auch in B-Zell-Erkrankungen beobachtete Reduktion von miR-143 und miR-145, ist ebenfalls in den EBV-negativen T-Zell Lymphomen zu beobachten (Akao et al., 2007). Da diese miRNAs das Wachstum von Zellen hemmen, wäre eine Reduktion der miRNAs für das Tumorwachstum von Vorteil.

Die Mitglieder der miR-200-Familie miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429 und miR-205 zeigten in den EBV-negativen Lymphomen eine geringere Expression als im Normalgewebe. Dies deckt sich auch mit anderen Veröffentlichungen, die zeigten, dass durch die geringere Expression dieser miRNAs verstärkt ZEB1 exprimiert und somit E-Cadherin inhibiert wird, was die Invasion der Tumorzellen durch EMT (epitheliale-mesenchymale Transition) nach sich zieht (Burk et al., 2008; Gregory et al., 2008; Hurteau et al., 2007; Korpál et al., 2008; Park et al., 2008).

Die miRNA miR-142-5p ist in Mantel-Zell-Lymphomen und Lungentumoren schwächer exprimiert, was zur Förderung des Zellwachstums in diesen Tumoren beiträgt (Sempere et al., 2009; Zhao et al., 2010). Die Induktion dieser miRNA in den T-Zell Lymphomen ist damit aufgrund der bisher bekannten Funktionen nicht zu erklären.

#### **7.2.2.2. Differentiell exprimierte miRNAs in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen verglichen zum Thymus**

Wie bereits beschrieben, ist bekannt, dass miRNAs auch aufgrund von chromosomalen Aberrationen differentiell in den Tumoren exprimiert sein können. Aufgrund der häufigen nekrotisierten Läsionen in den Tumoren ist bisher nur wenig über den Karyotyp dieser Tumoren bekannt, bislang wurden u.a. die Deletion von Chromosom 6q21-25, Chromosom 1p und Chromosom 13q beschrieben (Huang et al., 2010; Jaffe, 2002). Auf diesen Chromosomenabschnitten kodieren zwar miRNAs, die Aberrationen erklären jedoch die miRNA-Expressionsunterschiede der EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphome nicht, da die in dieser Arbeit gefundene differentielle miRNA-Expression nicht mit diesen Chromosomenregionen in Zusammenhang steht. In den EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen waren 18 der insgesamt 46 deregulierten miRNAs induziert und mit 28 der Großteil der miRNAs ebenfalls reprimiert (Abbildung 16). Aufgrund der großen Anzahl an deregulierten miRNAs kann hier nur auf wenige eingegangen werden.

Wie bereits im vorigen Abschnitt beschrieben, stimmen die meisten der im Vergleich zum Normalgewebe induzierten miRNAs für beide Lymphomentitäten überein. Zusätzlich war in diesem Gewebe die Expression von miR-26a und miR-214 erhöht. MiR-26a ist in einigen Tumoren als reprimierter Tumorsuppressor beschrieben, zeigt aber eine Amplifikation in Gliomen, wo es den Tumorsuppressor PTEN reguliert (Huse et al., 2009; Visone et al., 2007). Auch miR-214 ist ein negativer Regulator von PTEN (Yang et al., 2008), so dass die Induktion dieser miRNAs in Lymphomen einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Normalgewebe bedeuten könnte.

Die einzigen miRNAs, die nur in einer der drei Banken identifiziert werden konnten, waren miR-449a+b. Veröffentlichungen haben gezeigt, dass diese miRNAs einen negativen Feedback-Mechanismus für den wachstumsfördernden Faktor E2F1 darstellt (Feng and Yu, 2010). Diese miRNAs verhindern somit das exzessive Wachstum von Zellen durch Zellzyklusarrest und Apoptose (Lize et al., 2010). Weiterhin ist bekannt, dass miR-449a die Histon-Deacetylase HDAC1 reguliert und dadurch in Prostatazellen ebenfalls Zellzyklusarrest und Apoptose auslösen kann (Noonan et al., 2009). Dies erklärt jedoch nicht, warum die miRNAs ausgerechnet nur in EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen exprimiert sind. Es müssten also erst weitere Targets dieser miRNAs identifiziert werden, um die stärkere Expression erklären zu können.

Die herunterregulierte miRNA miR-181b reguliert die Translation des Onkogens Tcl1 (Pekarsky et al., 2006) und könnte so einen Anstieg an Tcl1 in den EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen verursachen. Obwohl für einige Tumorarten eine verstärkte Expression dieser miRNA im Vergleich zum Normalgewebe beschrieben ist (Calin et al., 2004a), gibt es auch Hinweise, dass eine geringe Expression von miR-181b eine schlechtere Prognose für aggressive chronische lymphatische Leukämie bedeuten kann (Rossi et al., 2010). Übertragen auf die NK/T-Zell Lymphome könnte die verminderte miR-181b-Expression in den EBV-assoziierten Lymphomen auch charakteristisch für die Aggressivität und die geringe Überlebensrate dieser Lymphome sein (Heslop, 2005; Oshimi, 2007).

Ein Teil der miR-200-Familie, wie miR-205, miR-429 und miR-200a ist in den EBV-assoziierten Tumoren ebenfalls reprimiert. Allerdings ist die Repression für miR-200b und miR-141 leicht unter der Grenze der mindestens zweifachen Reduktion der Expression, weshalb diese miRNAs in Abbildung 16 nicht abgebildet sind. Die Repression dieser miRNAs oder zumindest die von miR-200a sowie miR-200b

könnte in den EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen durch EBNA1 begründet sein. Es ist bekannt, dass dieses Protein die Expression von miR-200a und miR-200b negativ beeinflusst, obwohl man noch nicht weiß durch welchen Mechanismus dies geschieht (Shinozaki et al., 2010). Die Reduktion dieser miRNAs durch EBNA1 soll wahrscheinlich dazu dienen die Reaktivierung des lytischen Zyklus zu unterdrücken. Verschiedene Veröffentlichungen haben gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen Vertretern der miR-200 Familie, dem transkriptionellen Repressor ZEB1 und dem lytischen EBV-Protein BZLF1 gibt. Da Mitglieder der miR-200 Familie die Expression von ZEB1 regulieren (Gregory et al., 2008; Hurteau et al., 2007; Korpál et al., 2008; Park et al., 2008) und ZEB1 wiederum BZLF1 inhibiert (Kraus et al., 2003), führt eine Repression dieser miRNAs zu einer Hemmung des lytischen Zyklus (Lin et al., 2010). Außerdem kann die Repression von ZEB1 in diesen Lymphomen natürlich wie bereits für die EBV-negativen Lymphome beschrieben auch zur Invasion der Tumorzellen führen (Burk et al., 2008; Gregory et al., 2008; Hurteau et al., 2007; Korpál et al., 2008; Park et al., 2008).

### **7.2.2.3. Expressionsunterschied in EBV-positiven im Vergleich zu EBV-negativen Lymphomen**

Um durch EBV fehlregulierte miRNAs in den EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen zu identifizieren, wurde das miRNA-Muster mit dem von EBV-negativen T-Zell Lymphomen verglichen. Von den 31 deregulierten miRNAs waren 15 induziert und 16 reprimiert (Abbildung 17).

Wodurch diese Fehlregulation begründet ist, kann nur vermutet werden. Zum einen können EBV-kodierte Proteine direkt für die Fehlregulierung der miRNAs verantwortlich sein. Bisher ist nur bekannt, dass LMP1 und EBNA1 einen Einfluss auf die Expression zellulärer miRNAs haben können. LMP1 induziert die Expression zellulärer miRNAs wie miR-146a und miR-155 über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Gatto et al., 2008; Motsch et al., 2007). Erst kürzlich hat man herausgefunden, dass EBNA1 die Expression des primären Transkriptes von miR-200b und somit auch die Expression der reifen miRNA reduziert, wobei der zugrunde liegende Mechanismus bisher noch nicht aufgeklärt ist (Shinozaki et al., 2010). Eines der in dieser Arbeit untersuchten EBV-assoziierten Lymphome zeigte Latenztyp I und exprimierte somit nur EBNA1 sowie EBER-Transkripte. Das andere Lymphom exprimierte ebenfalls EBNA1 und EBER-Transkripte sowie sporadisch LMP1 und musste deshalb dem



Latenztyp II zugeordnet werden. Da LMP1 jedoch nur von einem geringen Teil der Lymphomzellen exprimiert wurde, ist fraglich, in wieweit das LMP1-Protein für die Regulation von zellulären miRNAs in den untersuchten Lymphomen verantwortlich ist. Denkbar ist auch, dass die nicht-kodierenden EBER-Transkripte (EBV-encoded RNA) einen Einfluss auf die Expression zellulärer miRNAs nehmen. Bisher ist der Mechanismus dazu nicht bekannt, aber die Veröffentlichung von Shinozaki und Kollegen (Shinozaki et al., 2010) zeigte, dass diese nicht-kodierenden RNAs die Menge reifer miR-200b reduzieren können, ohne einen Einfluss auf das Niveau des primären Transkriptes zu nehmen. Deshalb ist durchaus denkbar, dass EBER-Transkripte durch die Wechselwirkung mit RNA-bindenden Proteinen, welche z.B. die Schleifenstruktur des miRNA-Vorläufers binden, einen Einfluss auf die Prozessierung von miRNAs haben. Chromosomale Aberrationen, die spezifisch für eine der beiden Lymphomklassen sind, können natürlich nicht ausgeschlossen werden und ebenfalls für die unterschiedliche Expression von miRNAs verantwortlich sein.

Vergleicht man die in den EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen veränderten miRNAs mit Veröffentlichungen, die in anderen Tumoren oder Zellarten eine Regulation zellulärer miRNAs durch EBV zeigten, so findet man nur wenig Übereinstimmung. Einerseits kann die Expression unterschiedlicher EBV-kodierter Latenzgene, die für verschiedene Tumore spezifisch ist, die unterschiedliche Deregulierung von zellulären miRNAs begründen. Es ist aber auch vorstellbar, dass das Virus abhängig vom zellulären Kontext die Expression zellulärer miRNAs reguliert. Die einzigen Übereinstimmungen im Vergleich zu Untersuchungen EBV-assoziiierter DLBCLs ist die Induktion von miR-27b und die Repression von miR-20b (Imig, unveröffentlicht). Die veränderte Expression dieser miRNAs könnte durch ihre Rolle bei der Angiogenese begründet sein (Cascio et al., 2010; Kuehbacher et al., 2007). Vergleicht man die deregulierten miRNAs mit denen in Hodgkin-Lymphomen, findet man in beiden Arbeiten eine Repression von miR-128a und miR-128b (Navarro et al., 2008). Die Reduktion von miR-128a+b ist bereits in Hirntumoren beobachtet worden und da miR-128 durch Inhibition von E2F3a sowie Bmi die Proliferation hemmt (Godlewski et al., 2008; Zhang et al., 2009), könnte sich die aberrante Expression dieser miRNAs vorteilhaft für das Wachstum der Lymphome zeigen.

Die verstärkte Expression von miR-29b in den EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen wurde einerseits in B-Zelllinien unterschiedlichen Latenztyps, als auch

in LMP1 transfizierten DLBCL-Zelllinien beobachtet (Anastasiadou et al., 2010; Mrazek et al., 2007). Da diese miRNA keine Expressionsänderung in EBV-negativen Lymphomen zeigt, könnte die induzierte Expression durchaus auf LMP1 in zumindest einem der beiden untersuchten NK/T-Zell Lymphomen zurückzuführen sein. Da miR-29b das Onkogen Tcl1 als Target hat, scheint die stärkere Expression auf den ersten Blick kontraintuitiv, Tcl1 kann aber ebenfalls durch miR-181b reguliert werden (Pekarsky et al., 2006) und diese miRNA ist in EBV-assoziierten Lymphomen wesentlich geringer exprimiert als in EBV-negativen Lymphomen.

Die differentielle Expression mancher miRNAs scheint aufgrund der bisher bekannten Funktionen dieser miRNAs auf den ersten Blick nicht offensichtlich bzw. scheint nicht den aggressiven Verlauf der Erkrankung wiederzugeben. Die Vertreter der miR-200 Familie z.B., die in vielen Tumoren als Tumorsuppressoren wirken (Burk et al., 2008; Gregory et al., 2008; Hurteau et al., 2007; Korpál et al., 2008; Park et al., 2008), sind im Vergleich zu EBV-negativen Lymphomen induziert, während sie verglichen zum Thymus gleich oder geringer exprimiert sind.

Die in den EBV-positiven Lymphomen am stärksten induzierten miRNAs miR-143 und miR-145 sind in vielen anderen Tumoren als Tumorsuppressoren beschrieben und die Expression dieser miRNAs ist in soliden Tumoren wie auch in EBV-transformierten B-Zelllinien mit einer Wachstumsinhibition der Tumorzellen verknüpft (Akao et al., 2007; Wang et al., 2009). Während miR-143 in den EBV-negativen Lymphomen am schwächsten exprimiert ist, zeigen Normalgewebe und EBV-assoziierte Lymphome eine ähnliche Expression. Da miR-145 sogar im Vergleich zum Normalgewebe stark induziert ist, bleibt ungeklärt, in wiefern diese miRNA zur Entstehung oder Progression der NK/T-Zell Lymphome beiträgt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass diese miRNAs in NK- oder T-Zellen eine bisher noch unbekannt Funktion haben, da miRNAs auch zellspezifisch als Onkogene oder Tumorsuppressoren wirken können (Visone and Croce, 2009). Die induzierte miR-195 zeigt in akuter lymphatischer Leukämie im Vergleich zu normalen B-Zellen ebenfalls eine verstärkte Expression, während diese miRNA in Magen- und Leberkarzinomen reprimiert ist (Guo et al., 2009; Xu et al., 2009; Zanette et al., 2007).

Ebenfalls ungeklärt bleibt die Induktion von miR-125a und miR-125b in EBV-positiven NK/T-Zell- im Vergleich zu EBV-negativen T-Zell Lymphomen. MiR-125b inhibiert die Expression des proapoptotischen Proteins BAK1, fördert somit das

Zellwachstum (Zhou et al., 2010) und ist in beiden Lymphomen bzw. in den EBV-negativen Tumoren stärker reprimiert. MiR-125a, die in vielen Tumoren reprimiert ist, zeigt nur in EBV-negativen Lymphomen eine reduzierte Expression während EBV-assoziierte NK/T-Zell Lymphome gleiche Mengen an miR-125a wie das Kontrollgewebe exprimieren.

Das onkogene miR-17-92 Cluster besteht aus miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20a und miR-92 und seine Expression ist in B-Zell Lymphomen und in vielen soliden Tumoren induziert. Während Mitglieder dieser Familie die Expression von Bim, E2F1 und PTEN reduzieren und somit als Onkogene wirken (Mendell, 2008; Xiao et al., 2008), zeigt das Cluster in EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen zum größten Teil eine reduzierte Expression. Die miRNAs miR-17\*, miR-18, miR-19a, miR-19b und miR-20a sind sowohl im Vergleich zum Normalgewebe als auch zu den EBV-negativen T-Zell Lymphomen reduziert. Das gleiche gilt für miR-106b, welche von einem paralogen Cluster exprimiert wird und ähnliche Funktionen hat. Es ist bereits bekannt, dass miR-17 in Brustkrebs auch als Tumorsuppressor wirkt (Hossain et al., 2006). Aber erst kürzlich gab es eine Veröffentlichung, die zeigt, dass das Cluster miR-17-92 in kutanen T-Zell Lymphomen reprimiert ist und dass eine Überexpression des Clusters in verstärkter Apoptose und vermindertem Zellwachstum resultiert (Ballabio et al., 2010). Somit hat dieses Cluster abhängig vom Zellhintergrund unterschiedliche Funktionen.

Die Induktion von miR-30a und miR-30d scheint in Anbetracht der bisher bekannten Funktionen dieser miRNA vorteilhaft für Tumorzellen zu sein, auch wenn ihre Expression in EBV-negativen T-Zell Lymphomen im Vergleich zum Thymus reprimiert ist. Die verstärkte Expression von miR-30a führt zur Inhibition des Tumorsuppressors Beclin1, der an der Autophagozytose beteiligt ist (Zhu et al., 2009a). Durch Überexpression von miR-30d wird außerdem die Tumorerkrankung in hepatozellulären Karzinomen gefördert (Yao et al., 2010). Eine miRNA, deren Expression ebenfalls eine verstärkte Tumorerkrankung und Metastasierung nach sich zieht, ist miR-151 und diese ist ebenfalls in EBV-assoziierten Lymphomen induziert (Ding et al., 2010).

Auch die Reduktion der Tumorsuppressoren miR-181a und miR-181b ist im Einklang mit anderen Veröffentlichungen, die gezeigt haben, dass diese miRNAs Tumorerkrankung bzw. -invasion inhibieren und Apoptose induzieren (Shi et al., 2008).

Die abschließende Beurteilung der in EBV-positiven NK/T-Zell Lymphomen deregulierten miRNAs ist schwierig. Manche miRNAs, wie z.B. miR-151-5p und miR-125b sind in beiden Lymphomen reduziert, wobei die Expression in den EBV-positiven Lymphomen stärker ist. Die differentielle Expression im Vergleich zum Normalgewebe ist dadurch begründet, dass manche dieser miRNAs offensichtlich zur Förderung von Tumorinvasion oder Tumorwachstum beitragen. Warum diese miRNAs im Vergleich zu EBV-negativen Lymphomen induziert sind, vor allem wenn man bedenkt, dass EBV-assoziierte NK/T-Zell Lymphome meist einen schweren Verlauf bzw. eine schlechte Prognose haben, ist allerdings unklar. Dann gibt es miRNAs wie miR-145 und miR-27b, die in den EBV-positiven Lymphomen eine differentielle Expression im Vergleich zu den beiden anderen Geweben zeigen und deshalb möglicherweise die miRNAs darstellen, die den Unterschied zwischen EBV-negativen und EBV-assoziierten Tumoren ausmachen. Für manche der fehlregulierten miRNAs sind bislang zu wenige Funktionen bekannt um eine endgültige Beurteilung abzugeben.

### **7.2.3. Identifizierung möglicher neuer miRNAs**

Durch Analyse der Sequenzen konnten 10 neue miRNAs, die von bereits bekannten miRNA-Vorläufern stammen, identifiziert werden. Weiterhin kamen drei Sequenzen in Betracht von bisher unbekanntem miRNA-Vorläufern zu stammen. Durch Klonieren der möglichen Vorläufersequenz in einen eukaryotischen Expressionsvektor konnte die Expression bzw. Prozessierung der reifen miRNA in 293T-Zellen gezeigt werden. Jedoch war in keiner der untersuchten NK- oder T-Zelllinien die endogene miRNA im Northern Blot nachweisbar. Ob es sich tatsächlich um eine im Genom existierende miRNA handelt, kann deshalb aufgrund dieser Ergebnisse nur vermutet werden. Es könnte sein, dass die miRNAs, die nur in den EBV-negativen Lymphomen gefunden wurden, zu schwach exprimiert werden um sie im Northern Blot nachweisen zu können. Die Gruppe um Ambros hat ein System zur miRNA-Annotation erstellt (Ambros et al., 2003), wonach neue miRNAs bestimmte Expressions- und Biogenese-Kriterien erfüllen müssen. Zum einen muss die Expression der miRNA mindestens im Northern Blot oder durch Sequenzierung einer cDNA-Bank nachgewiesen werden. Letzteres wurde für alle drei potentiellen neuen miRNAs erfüllt, da die Sequenzen in der cDNA-Bank gefunden wurden. Außerdem falteten sich alle potentiellen miRNA-Vorläufer zu charakteristischen haarnadelähnlichen

Strukturen (Tabelle 19), wobei sich die potentielle miRNA auf einem Arm der Haarnadel befand und mindestens 18 bp des anderen Arms eine zur miRNA komplementäre Sequenz aufwies. Die beiden Haarnadelstrukturen der miRNA-Vorläufer EBV- pot 34 und pot 42 zeigten weiterhin keine zusätzlichen Blasen oder Schleifen. Ein weiteres Kriterium war die Konservierung der Haarnadelstruktur in weiteren Organismen. Die Sequenz der Vorläufer in Schimpansen (*Pan troglodytes*) war konserviert und zeigte zumindest für die miRNAs EBV-pot34 und EBV-pot42 gute Haarnadelstrukturen. Zieht man alle Kriterien in Betracht, so kann man davon ausgehen, dass es sich um neue miRNAs handelt. Da es sich bei allen drei wenn überhaupt um sehr schwach exprimierte miRNAs handelt, stellt sich jedoch die Frage, welche Funktion sie in den untersuchten Lymphomen haben. Es könnte natürlich sein, dass die miRNAs in anderen Geweben bzw. Zelltypen stärker exprimiert sind und dort wichtige Aufgaben erfüllen.

#### **7.2.4. Expression viraler miRNAs in NK/T-Zell Lymphomen**

Die EBV-kodierten miRNAs stellten nur 2,3 % aller in den NK/T-Zell Lymphomen exprimierten miRNAs dar. Dies wirft die Frage auf, ob die viralen miRNAs überhaupt einen Beitrag zur Tumorigenese haben bzw. welche Funktion sie in der virusinfizierten Zelle erfüllen. In EBV-assoziierten diffus großzelligen B-Zell Lymphomen konnten ebenfalls nur 1,7 % aller miRNAs als EBV-kodiert identifiziert werden, während Nasopharynxkarzinome eine Expression viraler miRNAs zeigten, die 4,9 % bzw. 19,2 % aller miRNA-Sequenzen entsprachen (Imig, unveröffentlicht; (Zhu et al., 2009b). Da man in NPC-Zelllinien bereits eine sehr viel stärkere Expression der BART-miRNAs im Vergleich zu B-Zelllinien beobachten konnte, könnte es eine zelltypspezifische Expression dieser miRNAs geben (Cai et al., 2006; Pratt et al., 2009), die für den höheren Anteil an viralen miRNAs in NPC verantwortlich ist.

Während alle BART-miRNAs in den NK/T-Zell Lymphomen exprimiert wurden, waren keine der BHRF1-miRNAs exprimiert. Die einzigen Primärtumoren, in denen diese miRNAs bisher gefunden werden konnten, waren AIDS-assoziierte diffus großzellige B-Zell Lymphome (Xia et al., 2008). In EBV-assoziierten Magenkarzinomen (Kim do et al., 2007), Nasopharynxkarzinomen (Cosmopoulos et al., 2009; Zhu et al., 2009b) und peripheren T-Zell Lymphomen (Jun et al., 2008) gelang der Nachweis der BHRF1-miRNAs ebenfalls nicht. Scheinbar wird dieses Cluster in Primärtumoren von

immunkompetenten Patienten nicht exprimiert bzw. seine Expression ist mit dem Latenztyp III verknüpft (Cai et al., 2006). Obwohl NPC-Primärtumore keine BHRF1-miRNAs exprimierten, konnten sie in aus NPC abgeleiteten Zelllinien nachgewiesen werden (Cosmopoulos et al., 2009). Deshalb wurden auch EBV-positive NK/T-Zelllinien auf die Expression der BHRF1-miRNAs hin untersucht, es konnte allerdings keine der miRNAs im Northern Blot detektiert werden (Abbildung 22). Eine mögliche Erklärung für das verstärkte Vorkommen der BHRF1-miRNAs in Zellen des Latenztyp III ist, dass alle EBNAs in diesem Latenztyp von den beiden Haupt-Latenzpromotoren Cp oder Wp transkribiert werden. Die BHRF1-miRNAs entstehen in diesen Lymphomen wahrscheinlich durch Spleißen der Transkripte aus den Introns (Swaminathan, 2008). Da die Transkription der Latenzgene im Latenztyp I und II hauptsächlich vom Promotor Qp erfolgt (Sample et al., 1991; Schaefer et al., 1995; Schaefer et al., 1997), der stromabwärts von den BHRF1-miRNAs liegt, sind in diesen Zellen wahrscheinlich weniger BHRF1-miRNAs exprimiert (Cai et al., 2006).

Betrachtet man die Expressionsstärke der verschiedenen BART-miRNAs in den NK/T-Zell Lymphomen, lässt sich kaum ein Muster feststellen. Die Beobachtung von der Arbeitsgruppe um Cosmopoulos, dass die Expression der miRNAs von BART-Cluster 1 variabler ist als die von BART-Cluster 2, kann jedoch nicht bestätigt werden (Cosmopoulos et al., 2009). Die auch in anderen Zelltypen beobachtete variable Expression der verschiedenen BART-miRNAs ist wahrscheinlich auf Unterschiede im Spleißen der BART-mRNA bzw. der miRNA-Prozessierung aus diesen zurückzuführen (Edwards et al., 2008).

Am stärksten sind BART5 und BART7 mit 11 % bzw. 24 % exprimiert, die gemeinsam mehr als ein Viertel aller EBV-kodierten miRNAs in diesen Lymphomen ausmachen. Die fünf am stärksten exprimierten EBV-miRNAs stellen in NK/T-Zell Lymphomen bereits die Hälfte aller exprimierten viralen miRNAs. Das deutet daraufhin, dass diese miRNAs trotz der sehr variablen Expression der BART-miRNAs doch eine wichtige Rolle in diesen Lymphomen spielen. Vergleicht man die Expression einzelner BART-miRNAs zwischen verschiedenen EBV-assoziierten Tumoren, findet man eine starke Diskrepanz. Dies kann entweder durch unterschiedliche Latenztypen oder auf zelltypspezifische Unterschiede in der Regulation der Transkription oder Prozessierung der viralen miRNAs begründet sein. Hinsichtlich dieser starken Variabilität ist es interessant, dass beim Vergleich der fünf am stärksten exprimierten viralen miRNAs in DLBCLs (Imig, unveröffentlicht) und

NK/T-Zell Lymphomen zwei miRNAs deckungsgleich sind: BART7 und BART11. Das könnte bedeuten, dass diese miRNAs eine wichtige Funktion bei der Entstehung oder Progression von EBV-assoziierten Lymphomen haben.

Die Funktion vieler viraler miRNAs ist noch weitgehend unbekannt. Die bisherigen Veröffentlichungen lassen vermuten, dass die viralen miRNAs u.a. eine für das Virus günstige Modulation des Immunsystems zu schaffen. So kennt man bisher lediglich MICB als Target von BART2, PUMA als Target von BART5, IPO7 als Target von BART3 und CXCL11 als Target von BHRF1-3 (Choy et al., 2008; Dolken et al., 2010; Nachmani et al., 2009; Xia et al., 2008). Die Regulierung dieser Zielstrukturen trägt zum einen dazu bei, dass die EBV-infizierte Zelle unerkant durch das Immunsystem bleibt um das Überleben der infizierten Wirtszelle zu sichern bzw. die Etablierung oder Aufrechterhaltung der viralen Latenz zu gewährleisten. Auch die Regulierung der viralen DNA-Polymerase BALF5 durch BART2 unterstützt die virale Latenz (Barth et al., 2008). Die Inhibition von LMP1 durch BART1, BART3, BART16 sowie BART17 schützt die Zelle vor übersteigerter LMP1-Signalgebung, die in einer Hemmung des Zellwachstums resultieren kann (Lo et al., 2007). Außerdem handelt es sich bei LMP1 und LMP2A um virale Antigene, die durch cytotoxische T-Zellen erkannt werden können. Somit könnte die Regulation von LMP2A durch BART22 und die bereits erwähnte Regulation von LMP1 auch helfen, die virusinfizierte Zelle vor dem Immunsystem unentdeckt zu halten (Lung et al., 2009).

### **7.3. Validierung der Expression zellulärer miRNAs mittel quantitativer Real-Time PCR**

Um die Ergebnisse aus der Sequenzierung mit einer zweiten, unabhängigen Methode zu validieren, wurden quantitative Real-Time PCRs durchgeführt. Von den differentiell exprimierten miRNAs in EBV-positiven versus EBV-negativen Lymphomen wurden jeweils vier induzierte und vier reprimierte miRNAs ausgewählt und ihre Expression in den sequenzierten Geweben untersucht. Die Ergebnisse aus dem Vergleich EBV-positive gegen EBV-negative Lymphome konnten für sieben von acht miRNAs bestätigt werden (Abbildung 23 und Abbildung 24). Lediglich miR-424 zeigte in der Real-Time PCR eine induzierte Expression statt der in der Sequenzierung beobachteten Repression. Bei den Vergleichen Lymphom gegen Normalgewebe gab es für beide Tumorentitäten je zwei zur Sequenzierung gegensätzliche Ergebnisse in der Real-Time PCR. Für die meisten miRNAs konnte

jedoch zumindest die Tendenz aus der Sequenzierung bestätigt werden, wenn auch der Expressionsunterschied bei beiden Methoden oft unterschiedlich stark ausgeprägt war. Da bereits bekannt ist, dass sich Ergebnisse zur Untersuchung von miRNA-Expression aus Arrays, Klonierung und quantitativer Real-Time PCR nur zum Teil decken (Wu et al., 2007), ist es durchaus möglich, die Differenzen auf die Verwendung unterschiedlicher Methoden zurückzuführen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Methoden sind Unterschiede zu erwarten, da sowohl der Sequenzierung als auch der cDNA-Synthese verschiedene enzymatische Modifikationen vorausgehen. Für die Sequenzierung werden zunächst mehrere Adapter ligiert, was sicherlich nicht gleichermaßen effektiv für alle RNA-Moleküle erfolgt. Ebenso lassen sich nicht alle miRNA-Vorläufer bei der Poly(A)-tailing Reaktion mit der gleichen Effizienz mit einem Poly(A)-Schwanz versehen. Da auch sequenzspezifische Primer unterschiedlich gut binden, können durchaus sowohl bei der Umschreibung der RNA zur cDNA, als auch bei der Amplifikation in der Sequenzierung und in der quantitativen PCR einzelne Sequenzen bevorzugt vermehrt werden. Abschließend ist es nicht möglich zu sagen, welche der Methoden die reale Expression in den Geweben wiedergibt. Die Überprüfung der Ergebnisse durch Northern-Blot Analyse der miRNA-Expression in den Geweben konnte wegen der geringen Mengen an zur Verfügung stehendem Material nicht durchgeführt werden.

#### **7.4. Expression der deregulierten miRNAs in Zelllinien**

Die Analyse der Expression differentiell regulierter miRNAs in NK- bzw. T-Zelllinien sollte zeigen, ob die Zelllinien ein gutes *in vitro* System für die in dieser Arbeit untersuchten Lymphome darstellen. Da EBV-assoziierte NK/T-Zell Lymphome wie bereits erwähnt eine seltene Erkrankung sind und oft kaum Tumormaterial zur Verfügung steht (Coppo et al., 2009; Harabuchi et al., 2009; Moriai et al., 2009), gibt es auch nur sehr wenige EBV-positive NK/T-Zelllinien. Freundlicherweise wurden uns aus Japan die EBV-positiven NK-Zelllinien HANK-1 und NK-YS zur Verfügung gestellt. Bei HANK-1 handelt es sich wohl um eine sehr empfindliche Zelllinie, da sie nicht lange ohne ein spezielles Medium, welches nur in asiatischen Ländern zu erwerben ist, kultiviert werden konnte. Deshalb konnte ein Teil der Northern Blots nur für die NK-YS als EBV-positive Zelllinie durchgeführt werden.



Die Expressionsunterschiede zwischen EBV-positiven und -negativen Zelllinien im Northern Blot ergaben für die induzierten miRNAs miR-205, miR-145, miR-200c und miR-125a oft andere Ergebnisse als in den Tumoren (Abbildung 25). Drei von vier miRNAs zeigten statt der Hochregulierung eine verminderte Expression in EBV-positiven Zellen, während die in den Tumoren stark exprimierte miR-145 in den untersuchten Zelllinien überhaupt nicht mittels Northern Blot nachgewiesen werden konnte. Die Repression der miRNAs miR-181a, miR-106b, miR-20b und miR-142-3p in den EBV-positiven Lymphomen spiegelte sich dagegen auch in den untersuchten Zelllinien wieder (Abbildung 26). Auch wenn sich die Expressionsstärke von HANK-1 und NK-YS oft unterschied, konnte man für diese vier miRNAs eine geringere miRNA-Expression in EBV-positiven NK/T-Zelllinien zeigen.

Eine Begründung für die abweichenden Expressionsunterschiede in den Zelllinien verglichen zu den Tumoren könnte der unterschiedliche Latenztyp sein. Während die beiden Zelllinien Latenztyp II zeigen, handelt es sich bei einem der untersuchten Tumore um Latenztyp I und bei dem anderen um eine Mischung aus Latenztyp I und II, da einige Tumorzellen sporadisch LMP1 exprimierten. Außerdem könnte ein Vergleich von Primärtumoren mit Zelllinien auch ein Problem der Heterogenität sein. Die Schnitte der Primärtumoren beinhalten neben den eigentlichen Tumorzellen ebenfalls Stromazellen und infiltrierende Lymphozyten. Da es sich bei den Zelllinien um reine Tumorzellen handelt, könnte dieser Unterschied vielleicht zu der abweichenden Expression von miRNAs beitragen. Außerdem sind Zelllinien oft nur bedingt mit dem Ursprungstumor vergleichbar, da es durch Kultivieren der Zelllinien auch zu Veränderungen des Karyotyps kommt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von der Verwendung dieser Zelllinien als Modellsysteme für die Lymphome z.B. in RISC-Immunpräzipitationen vorerst abgesehen.

### **7.5. Identifizierung von Targets differentiell exprimierter miRNAs in NK/T-Zell Lymphomen**

Wie bereits beschrieben, ist es schwierig Ziel-mRNAs für miRNAs zu identifizieren. Es gibt zwar einige Algorithmen, die die Vorhersage von miRNA-Targets ermöglichen, allerdings mit einer großen Anzahl falsch Positiver. Deshalb ist es sinnvoll miRNA- mit mRNA-Expressionsdaten zu koppeln (Barbato et al., 2009). Da es für NK/T-Zell Lymphome lediglich eine Veröffentlichung zu mRNA-Expressionsdaten gab (Zhang et al., 2006), wurde diese mit Hilfe des Programms

SigTerms (Creighton et al., 2008) mit der in dieser Arbeit erhaltenen miRNA-Expression korreliert. Da SigTerms die Vorhersage von drei verschiedenen Algorithmen vereint, sollte somit die Wahrscheinlichkeit der richtigen Vorhersage eines miRNA-Targets erhöht werden.

Anschließend wurde der Einfluss von miRNAs, die in EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphome dereguliert waren, auf mRNAs, die in der Arbeit von Zhang (Zhang et al., 2006) differentiell exprimiert waren, im Luciferase-Assay untersucht. Zu den untersuchten mRNAs, die bei Zhang und Kollegen induziert waren, zählten FOS, CD44, IL1A und BCL6, während IL1R1 reprimiert war (Zhang et al., 2006).

Trotz der Vorhersage konnte FOS nicht als Target von miR-181a und miR-181b bestätigt werden. Die Aktivität des 3'UTR Reporters wurde im Luciferase-Assay nicht reduziert (Abbildung 28). Laut den Algorithmen sollten miRNAs der Cluster miR-17-92 und miR-106a-25 sowie miR-106b Bindestellen in der 3'UTR von CD44 haben. Die Luciferase-Assays in Abbildung 29 zeigen jedoch, dass keine dieser miRNAs einen Effekt auf den CD44-3'UTR Reporter hatte. Das gleiche gilt für IL1R1, weder miR-125a noch miR-205 waren in der Lage die 3'UTR von IL1R1 im Luciferase-Assay zu regulieren (Abbildung 30). Die Vorhersage war trotz der Kombination von miRNA- und mRNA-Daten nicht erfolgreich. Das kann natürlich zum einen daran liegen, dass auch trotz Kombination von Expressionsdaten immer noch ein Teil der Vorhersagen falsch positiv ist. Es ist aber auch denkbar, dass die fehlregulierten mRNAs aus der Arbeit von Zhang und Kollegen nicht mit den differentiell exprimierten mRNAs aus den in der Sequenzierung untersuchten Lymphomen übereinstimmt. Da es sich bei beiden Untersuchungen um eine sehr geringe Anzahl an Proben handelte, ist es möglich, dass es sich eher um individuelle Unterschiede als um allgemein für alle NK/T-Zell Lymphome gültige Expressionsunterschiede handelt. Für den Fall, dass es sich doch um eine für NK/T-Zell Lymphome typische Fehlregulierung handelt, könnten natürlich auch andere Mechanismen wie Transaktivierung oder Repression des Promotors sowie chromosomale Aberrationen für die Fehlregulation verantwortlich sein.

### **7.5.1. miR-142 reguliert posttranskriptionell die Expression von IL1A**

Laut Vorhersage konnten folgende miRNAs, die in den untersuchten Tumoren reprimierten waren, an die 3'UTR von IL1A binden: miR-181a, miR-181b und miR-142. Im Luciferase-Assay ließ sich jedoch nur die Bindung von miR-142-3p an die

3'UTR nachweisen, während miR-181a und miR-181b keinen Effekt hatten. Durch Mutation der 3'UTR konnte eine von zwei für die miRNA vorhergesagten Bindestellen bestätigt werden. Die Korrelation der Expression von miR-142-3p und der mRNA für IL1A in den mit Hilfe von quantitativer Real-Time PCR untersuchten Geweben deutete ebenfalls darauf hin, dass es sich um eine posttranskriptionelle Regulation der mRNA durch die miRNA handelte. Dies legte auch die Vermutung nahe, dass die Regulation durch den Abbau der mRNA begründet ist und es sich nicht nur um eine Translationsinhibition sondern auch um einen durch miRNA induzierten Abbau der mRNA handelte. Allerdings müsste diese Vermutung erst durch weitere Experimente belegt werden. Die unterschiedlich starke Expression der IL1A-mRNA könnte auch durch andere Faktoren in den Tumoren reguliert sein.

Zunächst konnte durch Überexpression eines IL1A-cDNA-Vollängen Klon, der auch für die 3'UTR von IL1A kodierte, und gleichzeitiger Kotransfektion von miR-142 in 293T Zellen gezeigt werden, dass die miRNA die Proteinexpression des IL1A-Konstruktes reduzierte. Die Untersuchung des Effekts der miRNA auf endogenes IL1A konnte nicht in NK- oder T-Zellen durchgeführt werden, da diese zu geringe Mengen IL1A exprimierten um sie im wenig sensitiven Western Blot detektieren zu können. Auch der Versuch die Proteinmenge abhängig von der Kotransfektion der miRNA mit Hilfe der sensitiveren FACS-Analyse zu untersuchen misslang zum einen, weil sich NK-92 Zellen nicht transfizieren ließen. Zum anderen überlappte die Fluoreszenz der vielen apoptotischen SUP-T1 Zellen nach Transfektion so stark mit der IL1A-spezifischen Fluoreszenz, dass keine Auswertung möglich war. NK-YS und HANK-1 Zellen konnten leider nicht in die Untersuchung mit einbezogen werden, da diese Zellen sich nicht mehr kultivieren ließen.

Deshalb musste auf die Keratinozytenzelllinie HaCaT zurückgegriffen werden, welche konstitutiv IL1A exprimiert und sezerniert (van Rietschoten et al., 2006). Durch Transfektion von HaCaT-Zellen mit miR-142 konnte im Western Blot gezeigt werden, dass diese miRNA die Proteinexpression des ~ 33 kDa großen IL1A-Vorläufers um 30 % reduziert. Im nachfolgenden ELISA konnte außerdem beobachtet werden, dass die Reduktion des IL1A-Vorläufers durch miR-142 auch die Sekretion des Zytokins um 15 % reduziert. Der Unterschied in der Reduktionsstärke durch miR-142 auf die Menge an endogenem IL1A-Vorläufer (30 %) und die Sekretion des reifen IL1A (15 %) ist wohl darauf zurückzuführen, dass nicht der komplette IL1A-Vorläufer zum reifen IL1A prozessiert wird. Somit könnte sich die

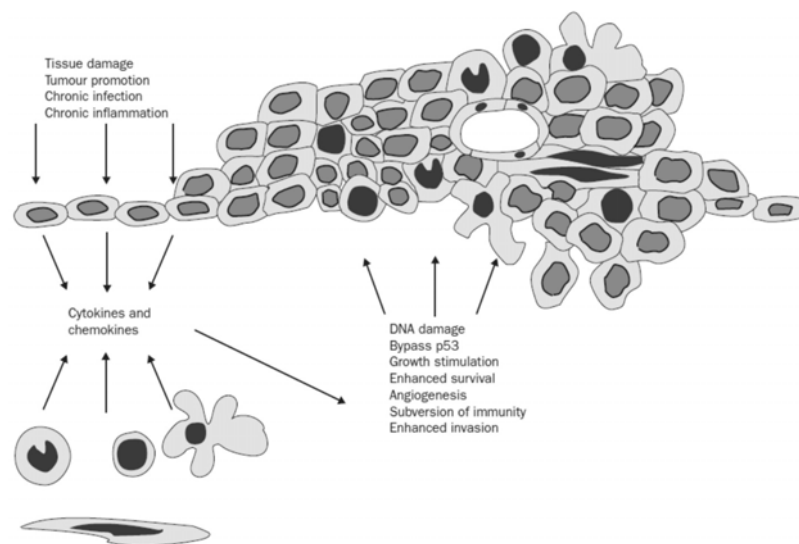
Reduktion an Vorläufer-IL1A stärker auf die endogene IL1A-Menge als auf die sekretierte IL1A-Menge auswirken. Die verschiedenen Experimente zeigen klar, dass IL1A ein Target von miR-142-3p ist und durch diese miRNA posttranskriptionell reguliert wird.

Es fehlt jedoch der endgültige Nachweis, dass die Reduktion von miR-142 wirklich für die Induktion von IL1A in EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen verantwortlich ist. Zunächst müsste untersucht werden, ob EBV-positive NK-YS oder HANK-1 Zellen IL1A exprimieren und ob die Überexpression von miR-142 zu einer verringerten Expression von IL1A in den Zellen führt. Zur korrekten Interpretation der IL1A Induktion in den Lymphomen müsste ebenfalls analysiert werden, ob die Tumorzellen oder umliegendes Stroma für die IL1A-Expression verantwortlich sind, ob und in welchem Ausmaß IL1A von den Zellen sezerniert wird, ob IL1A membranständig ist oder intrazellulär verbleibt. Je nach Lokalisation von IL1A kann das proinflammatorische Zytokin sehr unterschiedliche Auswirkungen auf den Zellkontext haben.

Die Expression von IL1A hat Vor- und Nachteile für Tumoren, da auch eine membranständige Form von IL1A nachgewiesen werden konnte, die eine anti-Tumor Immunantwort durch die Aktivierung von Effektorzellen auslösen kann, wohingegen IL1A in sezernierter oder endogener Form als parakriner bzw. autokriner Wachstumsfaktor wirken kann (Ito et al., 1993; Jaffe, 2002; Karakas et al., 2006). Normalerweise sezernieren hauptsächlich Monocyten und Makrophagen IL1A, während es bei den meisten anderen Zelltypen hauptsächlich intrazellulär oder membranständig verbleibt. In Tumorzellen ist dies jedoch anders, hier findet man oft IL1A-Sekretion (Apte et al., 2006). Endogenes IL1A wirkt in Tumorzellen meist autokrin und verstärkt z.B. die Invasivität der Tumorzellen, während nur sehr selten anti-Tumor Effekte beobachtet werden (Apte et al., 2006; Douvdevani et al., 1992; Voronov et al., 1999).

Untersuchungen in den verschiedensten Tumoren haben gezeigt, dass IL1A Tumorwachstum und –invasion vorantreiben kann, indem es prometastatische Gene induziert und benachbarte Zellen stimuliert, Wachstumsfaktoren sowie angiogenesefördernde Proteine zu produzieren (Ito et al., 1993; Kawakami et al., 1997; Nozaki et al., 2000). Die mögliche tumorfördernde Wirkung von IL1A in EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen wird außerdem durch Publikationen unterstützt, die zeigten, dass IL1A in NPC-Biopsien im Vergleich zu Kontrollgewebe induziert ist

und zum Tumorwachstum sowie zur Infiltration von Leukozyten während der Entstehung von NPCs beiträgt (Busson et al., 1987; Huang et al., 1999). Die konstitutive Aktivierung von NF $\kappa$ B, zu der IL1A in Pankreastumoren beiträgt, resultiert z.B. in chronischen Entzündungsreaktionen, die eng mit der Entstehung von Krebs verknüpft sind (Balkwill and Mantovani, 2001; Melisi et al., 2009; Niu et al., 2004). Die konstitutive Aktivierung von NF $\kappa$ B und die resultierende chronische Entzündung decken sich außerdem mit den fortschreitenden nekrotischen Läsionen, die für EBV-assoziierte NK/T-Zell Lymphome charakteristisch sind (Mori et al., 2000; Nava and Jaffe, 2005). Abbildung 52 zeigt schematisch wie chronische Entzündung, die Produktion von Zytokinen und Chemokinen, sowie die Entstehung und Progression von Tumoren zusammenhängen.

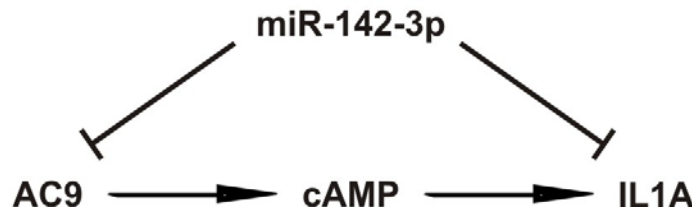


**Abbildung 52: Chronische Entzündung oder Infektion stimuliert Zytokine und Chemokine, die zur Entstehung maligner Erkrankungen führen**

Durch chronische Entzündung bzw. Infektion werden Zytokine und Chemokine exprimiert, die durch Wachstumsstimulation, verstärkte Invasion, Angiogenese, Umgehen der p53 Antwort usw. zur Entstehung maligner Erkrankungen bzw. zur Förderung von Tumoren beitragen (Balkwill and Mantovani, 2001).

Man weiß, dass miR-142 eine gewebsspezifische miRNA ist, deren Expression hauptsächlich auf lymphoides Gewebe beschränkt ist (Landgraf et al., 2007; Tili et al., 2007). Das einzig bisher veröffentlichte Target für miR-142-3p ist AC9 (Huang et al., 2009) und die Hemmung von AC9 resultiert in einer verringerten Menge an cAMP (cyclic adenosin monophosphate). Da cAMP interessanterweise IL1A-mRNA und –protein induziert, kann miR-142-3p die IL1A-Menge direkt über die 3'UTR von IL1A und indirekt durch Reduktion von AC9 reduzieren. Es ist bereits bekannt, dass IL1A unter einer strengen Kontrolle durch transkriptionelle und posttranskriptionelle

Regulation steht (Sung and Walters, 1991). Die in dieser Arbeit identifizierte direkte Regulation von IL1A durch miR-142 unterstreicht noch einmal, wie wichtig es ist, die Expression von IL1A zu kontrollieren um Gewebeschäden durch chronische Entzündung zu vermeiden.



**Abbildung 53: miR-142-3p beeinflusst die Expression von IL1A direkt und indirekt durch posttranskriptionelle Regulation**

miR-142-3p inhibiert die Expression von IL1A auf direktem Weg durch Interaktion mit der 3'UTR von IL1A. Die indirekte Inhibition von IL1A erfolgt durch die Inhibition des direkten miR-142-3p Targets AC9 und der daraus resultierenden Reduktion von cAMP.

In Anbetracht aller bisher bekannter Funktionen von IL1A und der Ergebnisse aus dieser Arbeit, kann man davon ausgehen, dass die induzierte Expression von IL1A in EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen durch die Reduktion von miR-142-3p zur Entstehung, Progression und Invasion der Tumoren sowie zu den fortschreitenden nekrotischen Läsionen, die charakteristisch für diese Tumoren sind, beiträgt.

### 7.5.2. BCL6 als Target von miR-205

Laut SigTerms waren folgende miRNAs vorhergesagt, die in EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen induzierte BCL6-mRNA zu regulieren: miR-17, miR-20a, miR-106, miR-181 und miR-205. Da die Bindung mehrerer Mitglieder der Cluster miR-17-92 und miR-106a-25 an die 3'UTR von BCL6 vorhergesagt wurde, wurden wieder die vollständigen miRNA-Cluster getestet. Die Untersuchung des Effekts der vorhergesagten miRNAs auf die 3'UTR von BCL6 wurde zunächst im Luciferase-Assay getestet. Es war jedoch nur miR-205 in der Lage die Expression des BCL6-3'UTR-Reporters signifikant um 22 % zu reduzieren. Die Bindung dieser miRNA konnte durch Mutagenese der Bindungsstelle in der 3'UTR bestätigt werden. Die anschließende Überexpression von miR-205 in EBV-negativen SUP-T1 Zellen reduzierte die Proteinmenge von BCL6 wie erwartet um 30 %. Es konnte also gezeigt werden, dass miR-205 auf posttranskriptioneller Ebene in der Lage ist, BCL6 zu regulieren.

Das Onkogen BCL6 hat als transkriptioneller Repressor verschiedene Funktionen und ist unter anderem an der Regulation des Zellwachstums beteiligt. Es hemmt die Tumorsuppressoren PDCD2 und p53, welche am programmierten Zelltod beteiligt sind (Baron et al., 2002; Phan and Dalla-Favera, 2004), sowie den Zellzyklusinhibitor p27<sup>Kip1</sup> (Shaffer et al., 2000). Die bekannteste Funktion von BCL6 ist seine Beteiligung an der Entstehung von diffus großzelligen B-Zell Lymphomen durch seine Überexpression aufgrund chromosomaler Translokationen oder Mutationen (Papadopoulou et al., 2010). Mittlerweile gibt es aber Veröffentlichungen, die zeigen, dass BCL6 auch eine Rolle in T-Zell Lymphomen spielt (Carbone et al., 1997; Hyjek et al., 2001; Ree et al., 1999). Eine Veröffentlichung von Baron und Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass es auch in T-Zell Lymphomen eine inverse Korrelation zwischen der Expression des Onkogens BCL6 und PDCD2 gibt (Baron et al., 2007).

Betrachtet man die Expression von miR-205 in den untersuchten Geweben, kann man feststellen, dass miR-205 in EBV-negativen Lymphomen überhaupt nicht und in EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphomen weniger als im Normalgewebe exprimiert wird. Somit sollte umgekehrt BCL6 am stärksten in den Lymphomen und am schwächsten im Normalgewebe exprimiert werden. Aufgrund seiner onkogenen Rolle sollte die verstärkte Expression in den Lymphomen zur Tumorentstehung oder –progression beitragen. Wie die im Vergleich zu den EBV-negativen Lymphomen induzierte miR-205 und die daraus resultierende verringerte BCL6-Expression der EBV-assoziierten NK/T-Zell Lymphome interpretiert werden sollen, ist unklar. Da BCL6 auch an der Differenzierung von Lymphozyten beteiligt ist (Yu et al., 2009), könnte der Expressionsunterschied zwischen EBV-positiven und –negativen Lymphomen auch darin begründet sein.

## **7.6. Identifizierung von zellulären Ziel-mRNAs EBV-kodierter miRNAs**

Da bisher nur wenige Targets von EBV-kodierten miRNAs bekannt sind und ihre Funktion in der virusinfizierten Zelle weitgehend unklar ist, sollten in dieser Arbeit auch zelluläre Targets für virale miRNAs identifiziert werden. Deshalb wurde in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen Dölken, Haas und Meister die Anreicherung von mRNAs in RISC-Komplexen EBV-infizierter und uninfizierter B-Zellen miteinander verglichen (Dolken et al., 2010). Im Anschluss daran sollten diese differentiell vorkommenden mRNAs in Luciferase-Assays auf ihre Regulation durch EBV-kodierte miRNAs getestet werden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der viralen BART-miRNAs auf die 3'UTR von ELK3, SOCS3 und TOMM22 getestet. Es konnte allerdings nur TOMM22 als Target einer viralen miRNA identifiziert werden. Die Immunpräzipitation von RISC-Komplexen in EBV-infizierten und uninfizierten B-Zellen zeigte ein verstärktes Vorkommen der TOMM22-mRNA in den RISC-Komplexen von EBV-positiven Jijoye-Zellen im Vergleich zu ebenfalls EBV-infizierten BL41-B95.8 oder uninfizierten BL41 Zellen (Dolken et al., 2010). Da keine Anreicherung von TOMM22 in BL41-B95.8 Zellen verglichen zu uninfizierten B-Zellen zu beobachten war, konnte man davon ausgehen, dass eine der BART-miRNAs, die im EBV-Stamm B95.8 deletiert sind, für die Anreicherung in Jijoye-Zellen verantwortlich war. Im ersten Schritt konnte gezeigt werden, dass das Cluster BART6-16 bzw. BART16 die Aktivität des TOMM22-3'UTR Reporters reduzieren konnte. Die Bindung von BART16 konnte durch Mutagenese ihrer Bindestelle in der TOMM22-3'UTR bestätigt werden. Die Bedeutung der Repression von TOMM22 in EBV-infizierten Jijoye-Zellen liegt wohl im Wachstumsvorteil EBV-infizierter Zellen. Da TOMM22 als mitochondrialer Rezeptor für die BAX-induzierte Apoptose benötigt wird (Cartron et al., 2008), ist BART16 fähig die Apoptose virusinfizierter Zellen zu hemmen.

Für die 3'UTRs von ELK3 und SOCS3 konnte keine Bindung von EBV-kodierten BART-miRNAs festgestellt werden. Beide mRNAs waren stärker in den RISC-Komplexen von Jijoye verglichen zu EBV-negativen B-Zellen angereichert. Da kein signifikanter Unterschied zwischen BL41-B95.8 und BL41 beobachtet werden konnte, lag es nahe, dass eine der in den B95.8 deletierten BART miRNAs für diese Anreicherung verantwortlich war. Da jedoch keine der BART-miRNAs im Luciferase-Assay an die 3'UTR binden konnte, ist anzunehmen, dass EBV-induzierte zelluläre miRNAs an die 3'UTR von ELK3 bzw. SOCS3 binden können und so das verstärkte Vorkommen der mRNA in den RISC-Komplexen verursachen. Da ELK3 und SOCS3 aufgrund ihrer Funktion bei der Regulation von Transkription, bei der Reifung von B-Zellen und beim Zellwachstum interessante Targets darstellen, sollte geklärt werden, ob sie Targets viral induzierter, zellulärer miRNAs sind und ihre Rolle bei der Infektion durch EBV oder innerhalb der EBV-infizierten Zelle näher untersucht werden. Um die in den RISC-Komplexen differentiell angereicherten mRNAs leichter als Targets von EBV-kodierten oder zellulären miRNAs zuordnen zu können, wäre es hilfreich die miRNA-Expressionsprofile dieser Zellen miteinander zu vergleichen. Das sollte Aufschlüsse hinsichtlich der unterschiedlichen Expression zellulärer miRNAs



---

geben, die mit den Daten der RISC-Immünpräzipitationen verknüpft werden könnten. Es gibt zwar einige zelluläre miRNAs wie miR-155 bzw. miR-146a, von denen man weiß, dass sie durch LMP1 induziert werden (Gatto et al., 2008; Motsch et al., 2007). Allerdings gibt es keine kompletten miRNA-Profile der untersuchten Zelllinien. Ein weiteres Problem bei der Identifikation von viralen Targets stellt die unzureichende Target-Vorhersage besonders für viral kodierte miRNAs dar. Bisher gibt es keinen automatisierten Algorithmus für die Vorhersage von viralen miRNA-Targets. Es wäre wünschenswert dieses Forschungsvorhaben in naher Zukunft zu verwirklichen, wobei eine Begrenzung bei der Entwicklung dieser Algorithmen wahrscheinlich wiederum durch die geringe Anzahl bisher identifizierter viraler miRNA-Targets gegeben ist.

## 8. Literaturverzeichnis

Agirre, X., Vilas-Zornoza, A., Jimenez-Velasco, A., Martin-Subero, J. I., Cordeu, L., Garate, L., San Jose-Eneriz, E., Abizanda, G., Rodriguez-Otero, P., Fortes, P., Rifon, J., Bandres, E., Calasanz, M. J., Martin, V., Heiniger, A., Torres, A., Siebert, R., Roman-Gomez, J., and Prosper, F. (2009). Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* **69**(10), 4443-53.

Akao, Y., Nakagawa, Y., Kitade, Y., Kinoshita, T., and Naoe, T. (2007). Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies. *Cancer Sci* **98**(12), 1914-20.

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.

Anastasiadou, E., Boccellato, F., Vincenti, S., Rosato, P., Bozzoni, I., Frati, L., Faggioni, A., Presutti, C., and Trivedi, P. (2010). Epstein-Barr virus encoded LMP1 downregulates TCL1 oncogene through miR-29b. *Oncogene* **29**(9), 1316-28.

Aozasa, K., Takakuwa, T., Hongyo, T., and Yang, W. I. (2008). Nasal NK/T-cell lymphoma: epidemiology and pathogenesis. *Int J Hematol* **87**(2), 110-7.

Apte, R. N., Dotan, S., Elkabets, M., White, M. R., Reich, E., Carmi, Y., Song, X., Dvozkin, T., Krelin, Y., and Voronov, E. (2006). The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev* **25**(3), 387-408.

Apte, R. N., and Voronov, E. (2008). Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunol Rev* **222**, 222-41.

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.

Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A. E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* **122**(4), 553-63.

Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**(9255), 539-45.

Ballabio, E., Mitchell, T., van Kester, M. S., Taylor, S., Dunlop, H. M., Chi, J., Tosi, I., Vermeer, M. H., Tramonti, D., Saunders, N. J., Boultonwood, J., Wainscoat, J. S., Pezzella, F., Whittaker, S. J., Tensen, C. P., Hatton, C. S., and Lawrie, C. H. (2010). MicroRNA expression in Sezary syndrome: identification, function, and diagnostic potential. *Blood*.

Barbato, C., Arisi, I., Frizzo, M. E., Brandi, R., Da Sacco, L., and Masotti, A. (2009). Computational challenges in miRNA target predictions: to be or not to be a true target? *J Biomed Biotechnol* **2009**, 803069.

- Baron, B. W., Anastasi, J., Thirman, M. J., Furukawa, Y., Fears, S., Kim, D. C., Simone, F., Birkenbach, M., Montag, A., Sadhu, A., Zeleznik-Le, N., and McKeithan, T. W. (2002). The human programmed cell death-2 (PDCD2) gene is a target of BCL6 repression: implications for a role of BCL6 in the down-regulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5), 2860-5.
- Baron, B. W., Zeleznik-Le, N., Baron, M. J., Theisler, C., Huo, D., Krasowski, M. D., Thirman, M. J., Baron, R. M., and Baron, J. M. (2007). Repression of the PDCD2 gene by BCL6 and the implications for the pathogenesis of human B and T cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(18), 7449-54.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**(2), 281-97.
- Bartel, D. P., and Chen, C. Z. (2004). Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet* **5**(5), 396-400.
- Barth, S., Pfuhl, T., Mamiani, A., Ehses, C., Roemer, K., Kremmer, E., Jaker, C., Hock, J., Meister, G., and Grasser, F. A. (2008). Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res* **36**(2), 666-75.
- Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., and Filipowicz, W. (2006). Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**, 513-21.
- Bi, Y., Liu, G., and Yang, R. (2009). MicroRNAs: novel regulators during the immune response. *J Cell Physiol* **218**(3), 467-72.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6), 1513-23.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., and Falkow, S. (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.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**(3), 761-71.
- Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S., and Brabletz, T. (2008). A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* **9**(6), 582-9.
- Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* **46**(197), 218-23.
- Busson, P., Braham, K., Ganem, G., Thomas, F., Grausz, D., Lipinski, M., Wakasugi, H., and Tursz, T. (1987). Epstein-Barr virus-containing epithelial cells from

nasopharyngeal carcinoma produce interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(17), 6262-6.

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.

Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., and Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24), 15524-9.

Calin, G. A., Liu, C. G., Sevignani, C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Cimmino, A., Zupo, S., Dono, M., Dell'Aquila, M. L., Alder, H., Rassenti, L., Kipps, T. J., Bullrich, F., Negrini, M., and Croce, C. M. (2004a). MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(32), 11755-60.

Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., and Croce, C. M. (2004b). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9), 2999-3004.

Cameron, J. E., Yin, Q., Fewell, C., Lacey, M., McBride, J., Wang, X., Lin, Z., Schaefer, B. C., and Flemington, E. K. (2008). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *J Virol* **82**(4), 1946-58.

Carbone, A., Gaidano, G., Gloghini, A., Pastore, C., Saglio, G., Tirelli, U., Dalla-Favera, R., and Falini, B. (1997). BCL-6 protein expression in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas: inverse relationship with Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 expression. *Am J Pathol* **150**(1), 155-65.

Carbone, A., Gloghini, A., and Dotti, G. (2008). EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. *Oncologist* **13**(5), 577-85.

Cartron, P. F., Bellot, G., Oliver, L., Grandier-Vazeille, X., Manon, S., and Vallette, F. M. (2008). Bax inserts into the mitochondrial outer membrane by different mechanisms. *FEBS Lett* **582**(20), 3045-51.

Cascio, S., D'Andrea, A., Ferla, R., Surmacz, E., Gulotta, E., Amodeo, V., Bazan, V., Gebbia, N., and Russo, A. (2010). miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1alpha and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells. *J Cell Physiol*.

Chaconas, G., and van de Sande, J. H. (1980). 5'-32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol* **65**(1), 75-85.

- Chan, J. A., Krichevsky, A. M., and Kosik, K. S. (2005). MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* **65**(14), 6029-33.
- Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., and Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* **303**(5654), 83-6.
- Chiang, A. K., Tao, Q., Srivastava, G., and Ho, F. C. (1996). Nasal NK- and T-cell lymphomas share the same type of Epstein-Barr virus latency as nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin's disease. *Int J Cancer* **68**(3), 285-90.
- Chow, C., Liu, A. Y., Chan, W. S., Lei, K. I., Chan, W. Y., and Lo, A. W. (2005). AKT plays a role in the survival of the tumor cells of extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Haematologica* **90**(2), 274-5.
- Choy, E. Y., Siu, K. L., Kok, K. H., Lung, R. W., Tsang, C. M., To, K. F., Kwong, D. L., Tsao, S. W., and Jin, D. Y. (2008). An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J Exp Med* **205**(11), 2551-60.
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C. G., Kipps, T. J., Negrini, M., and Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(39), 13944-9.
- Coppo, P., Gouilleux-Gruart, V., Huang, Y., Bouhlal, H., Bouamar, H., Bouchet, S., Perrot, C., Vieillard, V., Dartigues, P., Gaulard, P., Agbalika, F., Douay, L., Lassoued, K., and Gorin, N. C. (2009). STAT3 transcription factor is constitutively activated and is oncogenic in nasal-type NK/T-cell lymphoma. *Leukemia* **23**(9), 1667-78.
- Cosmopoulos, K., Pegtel, M., Hawkins, J., Moffett, H., Novina, C., Middeldorp, J., and Thorley-Lawson, D. A. (2009). Comprehensive profiling of Epstein-Barr virus microRNAs in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* **83**(5), 2357-67.
- Costinean, S., Zanesi, N., Pekarsky, Y., Tili, E., Volinia, S., Heerema, N., and Croce, C. M. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(18), 7024-9.
- Creighton, C. J., Nagaraja, A. K., Hanash, S. M., Matzuk, M. M., and Gunaratne, P. H. (2008). A bioinformatics tool for linking gene expression profiling results with public databases of microRNA target predictions. *Rna* **14**(11), 2290-6.
- Delecluse, H. J., Feederle, R., O'Sullivan, B., and Taniere, P. (2007). Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist. *J Clin Pathol* **60**(12), 1358-64.
- Ding, J., Huang, S., Wu, S., Zhao, Y., Liang, L., Yan, M., Ge, C., Yao, J., Chen, T., Wan, D., Wang, H., Gu, J., Yao, M., Li, J., Tu, H., and He, X. (2010). Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDI A. *Nat Cell Biol* **12**(4), 390-9.
- Doench, J. G., and Sharp, P. A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* **18**(5), 504-11.

Dolken, L., Malterer, G., Erhard, F., Kothe, S., Friedel, C. C., Suffert, G., Marcinowski, L., Motsch, N., Barth, S., Beitzinger, M., Lieber, D., Bailer, S. M., Hoffmann, R., Ruzsics, Z., Kremmer, E., Pfeffer, S., Zimmer, R., Koszinowski, U. H., Grasser, F., Meister, G., and Haas, J. Systematic analysis of viral and cellular microRNA targets in cells latently infected with human gamma-herpesviruses by RISC immunoprecipitation assay. *Cell Host Microbe* **7**(4), 324-34.

Dolken, L., Malterer, G., Erhard, F., Kothe, S., Friedel, C. C., Suffert, G., Marcinowski, L., Motsch, N., Barth, S., Beitzinger, M., Lieber, D., Bailer, S. M., Hoffmann, R., Ruzsics, Z., Kremmer, E., Pfeffer, S., Zimmer, R., Koszinowski, U. H., Grasser, F., Meister, G., and Haas, J. (2010). Systematic analysis of viral and cellular microRNA targets in cells latently infected with human gamma-herpesviruses by RISC immunoprecipitation assay. *Cell Host Microbe* **7**(4), 324-34.

Douvdevani, A., Huleihel, M., Zoller, M., Segal, S., and Apte, R. N. (1992). Reduced tumorigenicity of fibrosarcomas which constitutively generate IL-1 alpha either spontaneously or following IL-1 alpha gene transfer. *Int J Cancer* **51**(5), 822-30.

Drillenburger, P., and Pals, S. T. (2000). Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood* **95**(6), 1900-10.

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.

Edwards, R. H., Marquitz, A. R., and Raab-Traub, N. (2008). Epstein-Barr virus BART microRNAs are produced from a large intron prior to splicing. *J Virol* **82**(18), 9094-106.

Eis, P. S., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, M. F., Lund, E., and Dahlberg, J. E. (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(10), 3627-32.

Eliopoulos, A. G., Dawson, C. W., Mosialos, G., Floettmann, J. E., Rowe, M., Armitage, R. J., Dawson, J., Zapata, J. M., Kerr, D. J., Wakelam, M. J., Reed, J. C., Kieff, E., and Young, L. S. (1996). CD40-induced growth inhibition in epithelial cells is mimicked by Epstein-Barr Virus-encoded LMP1: involvement of TRAF3 as a common mediator. *Oncogene* **13**(10), 2243-54.

Engels, B. M., and Hutvagner, G. (2006). Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* **25**(46), 6163-9.

Epstein, M. A., Achong, B. G., and Barr, Y. M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **15**, 702-3.

Esquela-Kerscher, A., and Slack, F. J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**(4), 259-69.

Fabian, M. R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* **79**, 351-79.

Feng, M., and Yu, Q. (2010). miR-449 regulates CDK-Rb-E2F1 through an auto-regulatory feedback circuit. *Cell Cycle* **9**(2), 213-4.

- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* **9**(2), 102-14.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**(6669), 806-11.
- Fleisch, F., Reinhart, W. H., Brand, B., and Berger, C. (2005). Epstein-Barr virus DNA in serum in a HIV-infected patient during development and treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Swiss Med Wkly* **135**(17-18), 263-5.
- Gao, C., Zhang, Z., Liu, W., Xiao, S., Gu, W., and Lu, H. Reduced microRNA-218 expression is associated with high nuclear factor kappa B activation in gastric cancer. *Cancer* **116**(1), 41-9.
- Gao, Y. F., Yu, L., Wei, W., Li, J. B., Luo, Q. L., and Shen, J. L. (2008). Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by artificial microRNA. *World J Gastroenterol* **14**(29), 4684-9.
- Gatto, G., Rossi, A., Rossi, D., Kroening, S., Bonatti, S., and Mallardo, M. (2008). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 trans-activates miR-155 transcription through the NF-kappaB pathway. *Nucleic Acids Res* **36**(20), 6608-19.
- Ghosh, T., Soni, K., Scaria, V., Halimani, M., Bhattacharjee, C., and Pillai, B. (2008). MicroRNA-mediated up-regulation of an alternatively polyadenylated variant of the mouse cytoplasmic {beta}-actin gene. *Nucleic Acids Res* **36**(19), 6318-32.
- Godlewski, J., Nowicki, M. O., Bronisz, A., Williams, S., Otsuki, A., Nuovo, G., Raychaudhury, A., Newton, H. B., Chiocca, E. A., and Lawler, S. (2008). Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res* **68**(22), 9125-30.
- Gong, J. H., Maki, G., and Klingemann, H. G. (1994). Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* **8**(4), 652-8.
- Gregory, P. A., Bert, A. G., Paterson, E. L., Barry, S. C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M. A., Khew-Goodall, Y., and Goodall, G. J. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* **10**(5), 593-601.
- 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.
- Guo, J., Miao, Y., Xiao, B., Huan, R., Jiang, Z., Meng, D., and Wang, Y. (2009). Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues. *J Gastroenterol Hepatol* **24**(4), 652-7.
- Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**(5441), 950-2.
- 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.
- Harabuchi, Y., Takahara, M., Kishibe, K., Moriai, S., Nagato, T., and Ishii, H. (2009). Nasal natural killer (NK)/T-cell lymphoma: clinical, histological, virological, and genetic features. *Int J Clin Oncol* **14**(3), 181-90.
- Harabuchi, Y., Yamanaka, N., Kataura, A., Imai, S., Kinoshita, T., Mizuno, F., and Osato, T. (1990). Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. *Lancet* **335**(8682), 128-30.
- He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Hannon, G. J., and Hammond, S. M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**(7043), 828-33.
- Henle, G., Henle, W., and Diehl, V. (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes- $\gamma$  type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **59**(1), 94-101.
- Herman, J. G. (2002). Hypermethylation pathways to colorectal cancer. Implications for prevention and detection. *Gastroenterol Clin North Am* **31**(4), 945-58.
- Heslop, H. E. (2005). Biology and treatment of Epstein-Barr virus-associated non-Hodgkin lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 260-6.
- Hinuma, Y., and Grace, J. T., Jr. (1967). Cloning of immunoglobulin-producing human leukemic and lymphoma cells in long-term cultures. *Proc Soc Exp Biol Med* **124**(1), 107-11.
- Hossain, A., Kuo, M. T., and Saunders, G. F. (2006). Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol* **26**(21), 8191-201.
- Huang, B., Zhao, J., Lei, Z., Shen, S., Li, D., Shen, G. X., Zhang, G. M., and Feng, Z. H. (2009). miR-142-3p restricts cAMP production in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO Rep* **10**(2), 180-5.
- Huang, Y., de Reynies, A., de Leval, L., Ghazi, B., Martin-Garcia, N., Travert, M., Bosq, J., Briere, J., Petit, B., Thomas, E., Coppo, P., Marafioti, T., Emile, J. F., Delfau-Larue, M. H., Schmitt, C., and Gaulard, P. (2010). Gene expression profiling



identifies emerging oncogenic pathways operating in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Blood* **115**(6), 1226-37.

Huang, Y. T., Sheen, T. S., Chen, C. L., Lu, J., Chang, Y., Chen, J. Y., and Tsai, C. H. (1999). Profile of cytokine expression in nasopharyngeal carcinomas: a distinct expression of interleukin 1 in tumor and CD4+ T cells. *Cancer Res* **59**(7), 1599-605.

Hurteau, G. J., Carlson, J. A., Spivack, S. D., and Brock, G. J. (2007). Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. *Cancer Res* **67**(17), 7972-6.

Huse, J. T., Brennan, C., Hambardzumyan, D., Wee, B., Pena, J., Rouhanifard, S. H., Sohn-Lee, C., le Sage, C., Agami, R., Tuschl, T., and Holland, E. C. (2009). The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev* **23**(11), 1327-37.

Hutvagner, G., and Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**(5589), 2056-60.

Hyjek, E., Chadburn, A., Liu, Y. F., Cesarman, E., and Knowles, D. M. (2001). BCL-6 protein is expressed in precursor T-cell lymphoblastic lymphoma and in prenatal and postnatal thymus. *Blood* **97**(1), 270-6.

Inomata, M., Tagawa, H., Guo, Y. M., Kameoka, Y., Takahashi, N., and Sawada, K. (2009). MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood* **113**(2), 396-402.

Isobe, Y., Sugimoto, K., Yang, L., Tamayose, K., Egashira, M., Kaneko, T., Takada, K., and Oshimi, K. (2004). Epstein-Barr virus infection of human natural killer cell lines and peripheral blood natural killer cells. *Cancer Res* **64**(6), 2167-74.

Ito, R., Kitadai, Y., Kyo, E., Yokozaki, H., Yasui, W., Yamashita, U., Nikai, H., and Tahara, E. (1993). Interleukin 1 alpha acts as an autocrine growth stimulator for human gastric carcinoma cells. *Cancer Res* **53**(17), 4102-6.

Jacob, M. C., Favre, M., and Bensa, J. C. (1991). Membrane cell permeabilization with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. *Cytometry* **12**(6), 550-8.

Jaffe, E. S. (2002). Lymphoid lesions of the head and neck: a model of lymphocyte homing and lymphomagenesis. *Mod Pathol* **15**(3), 255-63.

Jaffe, E. S., Krenacs, L., and Raffeld, M. (2003). Classification of cytotoxic T-cell and natural killer cell lymphomas. *Semin Hematol* **40**(3), 175-84.

Jeon, Y. K., Park, C. H., Kim, K. Y., Li, Y. C., Kim, J., Kim, Y. A., Paik, J. H., Park, B. K., Kim, C. W., and Kim, Y. N. (2007). The heat-shock protein 90 inhibitor, geldanamycin, induces apoptotic cell death in Epstein-Barr virus-positive NK/T-cell lymphoma by Akt down-regulation. *J Pathol* **213**(2), 170-9.

Jun, S. M., Hong, Y. S., Seo, J. S., Ko, Y. H., Yang, C. W., and Lee, S. K. (2008). Viral microRNA profile in Epstein-Barr virus-associated peripheral T cell lymphoma. *Br J Haematol* **142**(2), 320-3.

- Kagami, Y., Nakamura, S., Suzuki, R., Iida, S., Yatabe, Y., Okada, Y., Kobayashi, T., Tsurumi, T., Seto, M., Ogura, M., Taguchi, O., and Morishima, Y. (1998). Establishment of an IL-2-dependent cell line derived from 'nasal-type' NK/T-cell lymphoma of CD2+, sCD3-, CD3epsilon+, CD56+ phenotype and associated with the Epstein-Barr virus. *Br J Haematol* **103**(3), 669-77.
- Kanegane, H., Wado, T., Nunogami, K., Seki, H., Taniguchi, N., and Tosato, G. (1996). Chronic persistent Epstein-Barr virus infection of natural killer cells and B cells associated with granular lymphocytes expansion. *Br J Haematol* **95**(1), 116-22.
- Karakas, B., Weeraratna, A., Abukhdeir, A., Blair, B. G., Konishi, H., Arena, S., Becker, K., Wood, W., 3rd, Argani, P., De Marzo, A. M., Bachman, K. E., and Park, B. H. (2006). Interleukin-1 alpha mediates the growth proliferative effects of transforming growth factor-beta in p21 null MCF-10A human mammary epithelial cells. *Oncogene* **25**(40), 5561-9.
- Kawakami, Y., Nagai, N., Ota, S., Ohama, K., and Yamashita, U. (1997). Interleukin-1 as an autocrine stimulator in the growth of human ovarian cancer cells. *Hiroshima J Med Sci* **46**(1), 51-9.
- Kenney, S. (2006). Theodore E. Woodward Award: development of novel, EBV-targeted therapies for EBV-positive tumors. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **117**, 55-73; discussion 73-4.
- Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J., and Plasterk, R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* **15**(20), 2654-9.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**(2), 209-16.
- Kim do, N., Chae, H. S., Oh, S. T., Kang, J. H., Park, C. H., Park, W. S., Takada, K., Lee, J. M., Lee, W. K., and Lee, S. K. (2007). Expression of viral microRNAs in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *J Virol* **81**(2), 1033-6.
- Korpai, M., Lee, E. S., Hu, G., and Kang, Y. (2008). The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* **283**(22), 14910-4.
- Kraus, R. J., Perrigoue, J. G., and Mertz, J. E. (2003). ZEB negatively regulates the lytic-switch BZLF1 gene promoter of Epstein-Barr virus. *J Virol* **77**(1), 199-207.
- Kuchenbauer, F., Morin, R. D., Argiropoulos, B., Petriv, O. I., Griffith, M., Heuser, M., Yung, E., Piper, J., Delaney, A., Prabhu, A. L., Zhao, Y., McDonald, H., Zeng, T., Hirst, M., Hansen, C. L., Marra, M. A., and Humphries, R. K. (2008). In-depth characterization of the microRNA transcriptome in a leukemia progression model. *Genome Res* **18**(11), 1787-97.
- Kuehbacher, A., Urbich, C., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2007). Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* **101**(1), 59-68.

- Kumar, M. S., Lu, J., Mercer, K. L., Golub, T. R., and Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* **39**(5), 673-7.
- Kushner, S. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with coli-derived plasmids. In "Genetic Engineering" (B. Nicosia, Ed.). Elsevier, Amsterdam.
- Kutok, J. L., and Wang, F. (2006). Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* **1**, 375-404.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259), 680-5.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**(5543), 853-8.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* **12**(9), 735-9.
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N. D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foa, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., Muller, R. U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D. B., Choksi, R., De Vita, G., Frezzetti, D., Trompeter, H. I., Hornung, V., Teng, G., Hartmann, G., Palkovits, M., Di Lauro, R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C. E., Nagle, J. W., Ju, J., Papavasiliou, F. N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M. J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J. J., Sander, C., Zavolan, M., and Tuschl, T. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* **129**(7), 1401-14.
- 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.
- Lee, R. C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**(5543), 862-4.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**(5), 843-54.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* **23**(20), 4051-60.
- 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, A. M., Varghese, S., Xu, H., and Alexander, H. R. (2006). Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Transl Med* **4**, 48.

- 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.
- Lin, J., and Cullen, B. R. (2007). Analysis of the interaction of primate retroviruses with the human RNA interference machinery. *J Virol* **81**(22), 12218-26.
- Lin, Z., Wang, X., Fewell, C., Cameron, J., Yin, Q., and Flemington, E. K. (2010). Differential expression of the miR-200 family microRNAs in epithelial and B-cells and regulation of Epstein-Barr virus reactivation by the miR-200 family member, miR-429. *J Virol*.
- Liu, J., Rivas, F. V., Wohlschlegel, J., Yates, J. R., 3rd, Parker, R., and Hannon, G. J. (2005). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* **7**(12), 1261-6.
- Lize, M., Pilarski, S., and Dobbelstein, M. (2010). E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* **17**(3), 452-8.
- Lo, A. K., To, K. F., Lo, K. W., Lung, R. W., Hui, J. W., Liao, G., and Hayward, S. D. (2007). Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(41), 16164-9.
- Lopez, M., Oettgen, P., Akbarali, Y., Dendorfer, U., and Libermann, T. A. (1994). ERP, a new member of the ets transcription factor/oncoprotein family: cloning, characterization, and differential expression during B-lymphocyte development. *Mol Cell Biol* **14**(5), 3292-309.
- Lu, F., Weidmer, A., Liu, C. G., Volinia, S., Croce, C. M., and Lieberman, P. M. (2008). Epstein-Barr virus-induced miR-155 attenuates NF-kappaB signaling and stabilizes latent virus persistence. *J Virol* **82**(21), 10436-43.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., and Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**(7043), 834-8.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**(5654), 95-8.
- Lung, R. W., Tong, J. H., Sung, Y. M., Leung, P. S., Ng, D. C., Chau, S. L., Chan, A. W., Ng, E. K., Lo, K. W., and To, K. F. (2009). Modulation of LMP2A expression by a newly identified Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART22. *Neoplasia* **11**(11), 1174-84.
- Lytle, J. R., Yario, T. A., and Steitz, J. A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(23), 9667-72.
- Maniatis, T., Sambrook J. and Fritsch E.F. (1989). "Molecular Cloning, a laboratory manual ", 2nd ed. Laboratory Press 1-3, Cold Spring Harbor.

- Mazda, O., and Kishida, T. (2009). Molecular therapeutics of cancer by means of electroporation-based transfer of siRNAs and EBV-based expression vectors. *Front Biosci (Elite Ed)* **1**, 316-31.
- Meijer, C. J., Jiwa, N. M., Dukers, D. F., Oudejans, J. J., de Bruin, P. C., Walboomers, J. M., and van den Brule, A. J. (1996). Epstein-Barr virus and human T-cell lymphomas. *Semin Cancer Biol* **7**(4), 191-6.
- Melisi, D., Niu, J., Chang, Z., Xia, Q., Peng, B., Ishiyama, S., Evans, D. B., and Chiao, P. J. (2009). Secreted interleukin-1alpha induces a metastatic phenotype in pancreatic cancer by sustaining a constitutive activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Cancer Res* **7**(5), 624-33.
- Mendell, J. T. (2008). miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* **133**(2), 217-22.
- Meneses-Garcia, A., Betancourt, A. M., Abarca, J. H., Montes, A. B., Roa, L. S., and Ruiz-Godoy, L. (2008). Expression of the metalloproteases MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-11, TIMP-1 and TIMP-2 in angiocentric midfacial lymphomas. *World J Surg Oncol* **6**, 114.
- Mori, T., Okamoto, S., Kuramochi, S., and Ikeda, Y. (2000). An adult patient with hypersensitivity to mosquito bites developing mantle cell lymphoma. *Int J Hematol* **71**(3), 259-62.
- Moriai, S., Takahara, M., Ogino, T., Nagato, T., Kishibe, K., Ishii, H., Katayama, A., Shimizu, N., and Harabuchi, Y. (2009). Production of interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 and its role as an autocrine invasion factor in nasal natural killer/T-cell lymphoma cells. *Clin Cancer Res* **15**(22), 6771-9.
- Motsch, N., Pfuhl, T., Mrazek, J., Barth, S., and Grasser, F. A. (2007). Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol* **4**(3), 131-7.
- Mrazek, J., Kreutmayer, S. B., Grasser, F. A., Polacek, N., and Huttenhofer, A. (2007). Subtractive hybridization identifies novel differentially expressed ncRNA species in EBV-infected human B cells. *Nucleic Acids Res* **35**(10), e73.
- Nachmani, D., Stern-Ginossar, N., Sarid, R., and Mandelboim, O. (2009). Diverse herpesvirus microRNAs target the stress-induced immune ligand MICB to escape recognition by natural killer cells. *Cell Host Microbe* **5**(4), 376-85.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**(4), 279-289.
- Nava, V. E., and Jaffe, E. S. (2005). The pathology of NK-cell lymphomas and leukemias. *Adv Anat Pathol* **12**(1), 27-34.
- Navarro, A., Gaya, A., Martinez, A., Urbano-Ispizua, A., Pons, A., Balague, O., Gel, B., Abrisqueta, P., Lopez-Guillermo, A., Artells, R., Montserrat, E., and Monzo, M. (2008). MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* **111**(5), 2825-32.

- Neilson, J. R., Zheng, G. X., Burge, C. B., and Sharp, P. A. (2007). Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev* **21**(5), 578-89.
- Nemerow, G. R., Wolfert, R., McNaughton, M. E., and Cooper, N. R. (1985). Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2). *J Virol* **55**(2), 347-51.
- Newman, M. A., and Hammond, S. M. (2010). Emerging paradigms of regulated microRNA processing. *Genes Dev* **24**(11), 1086-92.
- Newman, M. A., Thomson, J. M., and Hammond, S. M. (2008). Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *Rna* **14**(8), 1539-49.
- Niu, J., Li, Z., Peng, B., and Chiao, P. J. (2004). Identification of an autoregulatory feedback pathway involving interleukin-1alpha in induction of constitutive NF-kappaB activation in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* **279**(16), 16452-62.
- Noonan, E. J., Place, R. F., Pookot, D., Basak, S., Whitson, J. M., Hirata, H., Giardina, C., and Dahiya, R. (2009). miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. *Oncogene* **28**(14), 1714-24.
- Nozaki, S., Sledge, G. W., Jr., and Nakshatri, H. (2000). Cancer cell-derived interleukin 1alpha contributes to autocrine and paracrine induction of pro-metastatic genes in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **275**(1), 60-2.
- Olsen, P. H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* **216**(2), 671-80.
- Omoto, S., Ito, M., Tsutsumi, Y., Ichikawa, Y., Okuyama, H., Brisibe, E. A., Saksena, N. K., and Fujii, Y. R. (2004). HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA. *Retrovirology* **1**, 44.
- Oshimi, K. (2007). Progress in understanding and managing natural killer-cell malignancies. *Br J Haematol* **139**(4), 532-44.
- Pall, G. S., and Hamilton, A. J. (2008). Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat Protoc* **3**(6), 1077-84.
- Papadopoulou, V., Postigo, A., Sanchez-Tillo, E., Porter, A. C., and Wagner, S. D. (2010). ZEB1 and CtBP form a repressive complex at a distal promoter element of the BCL6 locus. *Biochem J* **427**(3), 541-50.
- Park, S. M., Gaur, A. B., Lengyel, E., and Peter, M. E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* **22**(7), 894-907.
- 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.
- Pekarsky, Y., Santanam, U., Cimmino, A., Palamarchuk, A., Efanov, A., Maximov, V., Volinia, S., Alder, H., Liu, C. G., Rassenti, L., Calin, G. A., Hagan, J. P., Kipps, T., and Croce, C. M. (2006). Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* **66**(24), 11590-3.
- 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.
- Phan, R. T., and Dalla-Favera, R. (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* **432**(7017), 635-9.
- Poirier, S., Ohshima, H., de-The, G., Hubert, A., Bourgade, M. C., and Bartsch, H. (1987). Volatile nitrosamine levels in common foods from Tunisia, south China and Greenland, high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Int J Cancer* **39**(3), 293-6.
- Pratt, Z. L., Kuzembayeva, M., Sengupta, S., and Sugden, B. (2009). The microRNAs of Epstein-Barr Virus are expressed at dramatically differing levels among cell lines. *Virology* **386**(2), 387-97.
- Rajewsky, N. (2006). L(ou)sy miRNA targets? *Nat Struct Mol Biol* **13**(9), 754-5.
- Ree, H. J., Kadin, M. E., Kikuchi, M., Ko, Y. H., Suzumiya, J., and Go, J. H. (1999). Bcl-6 expression in reactive follicular hyperplasia, follicular lymphoma, and angioimmunoblastic T-cell lymphoma with hyperplastic germinal centers: heterogeneity of intrafollicular T-cells and their altered distribution in the pathogenesis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Hum Pathol* **30**(4), 403-11.
- 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.
- 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.
- Rossi, S., Shimizu, M., Barbarotto, E., Nicoloso, M. S., Dimitri, F., Sampath, D., Fabbri, M., Lerner, S., Barron, L. L., Rassenti, L. Z., Jiang, L., Xiao, L., Hu, J., Secchiero, P., Zauli, G., Volinia, S., Negrini, M., Wierda, W., Kipps, T. J., Plunkett, W., Coombes, K. R., Abruzzo, L. V., Keating, M. J., and Calin, G. A. (2010). microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood*.
- Rudiger, T., Zettl, A., Adam, P., Bonzheim, I., Geissinger, E., and Muller-Hermelink, H. K. (2007). [Peripheral NK/T-cell lymphoma]. *Pathologe* **28**(1), 55-8.
- Saito, Y., and Jones, P. A. (2006). Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle* **5**(19), 2220-2.

- Sample, J., Brooks, L., Sample, C., Young, L., Rowe, M., Gregory, C., Rickinson, A., and Kieff, E. (1991). Restricted Epstein-Barr virus protein expression in Burkitt lymphoma is due to a different Epstein-Barr nuclear antigen 1 transcriptional initiation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(14), 6343-7.
- Scala, G., Quinto, I., Ruocco, M. R., Arcucci, A., Mallardo, M., Caretto, P., Forni, G., and Venuta, S. (1990). Expression of an exogenous interleukin 6 gene in human Epstein Barr virus B cells confers growth advantage and in vivo tumorigenicity. *J Exp Med* **172**(1), 61-8.
- Schaefer, B. C., Strominger, J. L., and Speck, S. H. (1995). Redefining the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-1 gene promoter and transcription initiation site in group I Burkitt lymphoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(23), 10565-9.
- Schaefer, B. C., Strominger, J. L., and Speck, S. H. (1997). Host-cell-determined methylation of specific Epstein-Barr virus promoters regulates the choice between distinct viral latency programs. *Mol Cell Biol* **17**(1), 364-77.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**(2), 199-208.
- Sconocchia, G., Titus, J. A., and Segal, D. M. (1994). CD44 is a cytotoxic triggering molecule in human peripheral blood NK cells. *J Immunol* **153**(12), 5473-81.
- Selcuklu, S. D., Donoghue, M. T., and Spillane, C. (2009). miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 4), 918-25.
- Sempere, L. F., Liu, X., and Dmitrovsky, E. (2009). Tumor-suppressive microRNAs in Lung cancer: diagnostic and therapeutic opportunities. *ScientificWorldJournal* **9**, 626-8.
- Sen, C. K., Gordillo, G. M., Khanna, S., and Roy, S. (2009). Micromanaging vascular biology: tiny microRNAs play big band. *J Vasc Res* **46**(6), 527-40.
- 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.
- Shaffer, A. L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E. P., and Staudt, L. M. (2000). BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* **13**(2), 199-212.
- Shein, H. M., and Enders, J. F. (1962). Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**, 1164-72.
- Shi, L., Cheng, Z., Zhang, J., Li, R., Zhao, P., Fu, Z., and You, Y. (2008). hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res* **1236**, 185-93.
- Shi, R., and Chiang, V. L. (2005). Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques* **39**(4), 519-25.



- Shinozaki, A., Sakatani, T., Ushiku, T., Hino, R., Isogai, M., Ishikawa, S., Uozaki, H., Takada, K., and Fukayama, M. Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma. *Cancer Res* **70**(11), 4719-27.
- Shinozaki, A., Sakatani, T., Ushiku, T., Hino, R., Isogai, M., Ishikawa, S., Uozaki, H., Takada, K., and Fukayama, M. (2010). Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma. *Cancer Res* **70**(11), 4719-27.
- Skalsky, R. L., and Cullen, B. R. (2010). Viruses, microRNAs, and Host Interactions. *Annu Rev Microbiol*.
- Skalsky, R. L., Hu, J., and Renne, R. (2007). Analysis of viral cis elements conferring Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus episome partitioning and maintenance. *J Virol* **81**(18), 9825-37.
- Smith, S. D., Shatsky, M., Cohen, P. S., Warnke, R., Link, M. P., and Glader, B. E. (1984). Monoclonal antibody and enzymatic profiles of human malignant T-lymphoid cells and derived cell lines. *Cancer Res* **44**(12 Pt 1), 5657-60.
- Song, G., and Wang, L. (2008). MiR-433 and miR-127 arise from independent overlapping primary transcripts encoded by the miR-433-127 locus. *PLoS One* **3**(10), e3574.
- Subramanian, S., and Steer, C. J. (2010). MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. *J Cell Physiol* **223**(2), 289-98.
- Sugimoto, K. J., Kawamata, N., Sakajiri, S., and Oshimi, K. (2002). Molecular analysis of oncogenes, ras family genes (N-ras, K-ras, H-ras), myc family genes (c-myc, N-myc) and mdm2 in natural killer cell neoplasms. *Jpn J Cancer Res* **93**(11), 1270-7.
- Sullivan, C. S. (2008). New roles for large and small viral RNAs in evading host defences. *Nat Rev Genet* **9**(7), 503-7.
- Sung, S. S., and Walters, J. A. (1991). Increased cyclic AMP levels enhance IL-1 alpha and IL-1 beta mRNA expression and protein production in human myelomonocytic cell lines and monocytes. *J Clin Invest* **88**(6), 1915-23.
- Suzuki, H. I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* **460**(7254), 529-33.
- Suzumiya, J., Takeshita, M., Kimura, N., Kikuchi, M., Uchida, T., Hisano, S., Eura, Y., Kozuru, M., Nomura, Y., Tomita, K., and et al. (1994). Expression of adult and fetal natural killer cell markers in sinonasal lymphomas. *Blood* **83**(8), 2255-60.
- Swaminathan, S. (2008). Noncoding RNAs produced by oncogenic human herpesviruses. *J Cell Physiol* **216**(2), 321-6.
- Szczyrba, J., Loprich, E., Wach, S., Jung, V., Unteregger, G., Barth, S., Grobholz, R., Wieland, W., Stohr, R., Hartmann, A., Wullich, B., and Grasser, F. (2010). The MicroRNA Profile of Prostate Carcinoma Obtained by Deep Sequencing. *Mol Cancer Res*.

- Szremska, A. P., Kenner, L., Weisz, E., Ott, R. G., Passegue, E., Artwohl, M., Freissmuth, M., Stoxreiter, R., Theussl, H. C., Parzer, S. B., Moriggl, R., Wagner, E. F., and Sexl, V. (2003). JunB inhibits proliferation and transformation in B-lymphoid cells. *Blood* **102**(12), 4159-65.
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., and Takahashi, T. (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* **64**(11), 3753-6.
- Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., and Kieff, E. (1987). Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* **50**(2), 203-13.
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A. M., Lim, B., and Rigoutsos, I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* **455**(7216), 1124-8.
- Thompson, M. P., and Kurzrock, R. (2004). Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* **10**(3), 803-21.
- Thomson, J. M., Newman, M., Parker, J. S., Morin-Kensicki, E. M., Wright, T., and Hammond, S. M. (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* **20**(16), 2202-7.
- Thorley-Lawson, D. A. (2001). Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* **1**(1), 75-82.
- Thorley-Lawson, D. A. (2005). EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol* **116**(2), 251-61; quiz 262.
- Tie, J., Pan, Y., Zhao, L., Wu, K., Liu, J., Sun, S., Guo, X., Wang, B., Gang, Y., Zhang, Y., Li, Q., Qiao, T., Zhao, Q., Nie, Y., and Fan, D. MiR-218 inhibits invasion and metastasis of gastric cancer by targeting the Robo1 receptor. *PLoS Genet* **6**(3), e1000879.
- Tie, J., Pan, Y., Zhao, L., Wu, K., Liu, J., Sun, S., Guo, X., Wang, B., Gang, Y., Zhang, Y., Li, Q., Qiao, T., Zhao, Q., Nie, Y., and Fan, D. (2010). MiR-218 inhibits invasion and metastasis of gastric cancer by targeting the Robo1 receptor. *PLoS Genet* **6**(3), e1000879.
- Tili, E., Michaille, J. J., Gandhi, V., Plunkett, W., Sampath, D., and Calin, G. A. (2007). miRNAs and their potential for use against cancer and other diseases. *Future Oncol* **3**(5), 521-37.
- Ting, A. H., Suzuki, H., Cope, L., Schuebel, K. E., Lee, B. H., Toyota, M., Imai, K., Shinomura, Y., Tokino, T., and Baylin, S. B. (2008). A requirement for DICER to maintain full promoter CpG island hypermethylation in human cancer cells. *Cancer Res* **68**(8), 2570-5.
- Tsoukas, C. D., and Lambris, J. D. (1993). Expression of EBV/C3d receptors on T cells: biological significance. *Immunol Today* **14**(2), 56-9.

- Tsuchiyama, J., Yoshino, T., Mori, M., Kondoh, E., Oka, T., Akagi, T., Hiraki, A., Nakayama, H., Shibuya, A., Ma, Y., Kawabata, T., Okada, S., and Harada, M. (1998). Characterization of a novel human natural killer-cell line (NK-YS) established from natural killer cell lymphoma/leukemia associated with Epstein-Barr virus infection. *Blood* **92**(4), 1374-83.
- Umbach, J. L., and Cullen, B. R. (2009). The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes Dev* **23**(10), 1151-64.
- van Rietschoten, J. G., Verzijlbergen, K. F., Gringhuis, S. I., van der Pouw Kraan, T. C., Bayley, J. P., Wierenga, E. A., Jones, P. A., Kooter, J. M., and Verweij, C. L. (2006). Differentially methylated alleles in a distinct region of the human interleukin-1alpha promoter are associated with allele-specific expression of IL-1alpha in CD4+ T cells. *Blood* **108**(7), 2143-9.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**(5858), 1931-4.
- Vaysberg, M., Hatton, O., Lambert, S. L., Snow, A. L., Wong, B., Krams, S. M., and Martinez, O. M. (2008). Tumor-derived variants of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induce sustained Erk activation and c-Fos. *J Biol Chem* **283**(52), 36573-85.
- Visone, R., and Croce, C. M. (2009). MiRNAs and cancer. *Am J Pathol* **174**(4), 1131-8.
- Visone, R., Pallante, P., Vecchione, A., Cirombella, R., Ferracin, M., Ferraro, A., Volinia, S., Coluzzi, S., Leone, V., Borbone, E., Liu, C. G., Petrocca, F., Troncione, G., Calin, G. A., Scarpa, A., Colato, C., Tallini, G., Santoro, M., Croce, C. M., and Fusco, A. (2007). Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. *Oncogene* **26**(54), 7590-5.
- Viswanathan, S. R., Daley, G. Q., and Gregory, R. I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* **320**(5872), 97-100.
- Voronov, E., Weinstein, Y., Benharroch, D., Cagnano, E., Ofir, R., Dobkin, M., White, R. M., Zoller, M., Barak, V., Segal, S., and Apte, R. N. (1999). Antitumor and immunotherapeutic effects of activated invasive T lymphoma cells that display short-term interleukin 1alpha expression. *Cancer Res* **59**(5), 1029-35.
- Walden, T. B., Timmons, J. A., Keller, P., Nedergaard, J., and Cannon, B. (2009). Distinct expression of muscle-specific microRNAs (myomirs) in brown adipocytes. *J Cell Physiol* **218**(2), 444-9.
- Walz, N., Christalla, T., Tessmer, U., and Grundhoff, A. (2010). A global analysis of evolutionary conservation among known and predicted gammaherpesvirus microRNAs. *J Virol* **84**(2), 716-28.
- Wang, S., Bian, C., Yang, Z., Bo, Y., Li, J., Zeng, L., Zhou, H., and Zhao, R. C. (2009). miR-145 inhibits breast cancer cell growth through RTKN. *Int J Oncol* **34**(5), 1461-6.

- Wienholds, E., and Plasterk, R. H. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* **579**(26), 5911-22.
- 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, H., Neilson, J. R., Kumar, P., Manocha, M., Shankar, P., Sharp, P. A., and Manjunath, N. (2007). miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One* **2**(10), e1020.
- Xia, T., O'Hara, A., Araujo, I., Barreto, J., Carvalho, E., Sapucaia, J. B., Ramos, J. C., Luz, E., Pedroso, C., Manrique, M., Toomey, N. L., Brites, C., Dittmer, D. P., and Harrington, W. J., Jr. (2008). EBV microRNAs in primary lymphomas and targeting of CXCL-11 by *ebv-mir-BHRF1-3*. *Cancer Res* **68**(5), 1436-42.
- Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D. P., Patterson, H. C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J. M., Kutok, J. L., and Rajewsky, K. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* **9**(4), 405-14.
- Xing, L., and Kieff, E. (2007). Epstein-Barr virus BHRF1 micro- and stable RNAs during latency III and after induction of replication. *J Virol* **81**(18), 9967-75.
- Xu, T., Zhu, Y., Xiong, Y., Ge, Y. Y., Yun, J. P., and Zhuang, S. M. (2009). MicroRNA-195 suppresses tumorigenicity and regulates G1/S transition of human hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* **50**(1), 113-21.
- Xu, Z. G., Iwatsuki, K., Oyama, N., Ohtsuka, M., Satoh, M., Kikuchi, S., Akiba, H., and Kaneko, F. (2001). The latency pattern of Epstein-Barr virus infection and viral IL-10 expression in cutaneous natural killer/T-cell lymphomas. *Br J Cancer* **84**(7), 920-5.
- Yang, H., Kong, W., He, L., Zhao, J. J., O'Donnell, J. D., Wang, J., Wenham, R. M., Coppola, D., Kruk, P. A., Nicosia, S. V., and Cheng, J. Q. (2008). MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res* **68**(2), 425-33.
- Yao, J., Liang, L., Huang, S., Ding, J., Tan, N., Zhao, Y., Yan, M., Ge, C., Zhang, Z., Chen, T., Wan, D., Yao, M., Li, J., Gu, J., and He, X. (2010). MicroRNA-30d promotes tumor invasion and metastasis by targeting Galphai2 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **51**(3), 846-56.
- Yates, J. L., Warren, N., and Sugden, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* **313**(6005), 812-5.
- 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.
- Young, L. S., and Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* **4**(10), 757-68.

- Yu, D., Rao, S., Tsai, L. M., Lee, S. K., He, Y., Sutcliffe, E. L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., Ellyard, J. I., Parish, I. A., Ma, C. S., Li, Q. J., Parish, C. R., Mackay, C. R., and Vinuesa, C. G. (2009). The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* **31**(3), 457-68.
- Yu, J., Wang, F., Yang, G. H., Wang, F. L., Ma, Y. N., Du, Z. W., and Zhang, J. W. (2006). Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **349**(1), 59-68.
- Zanette, D. L., Rivadavia, F., Molfetta, G. A., Barbuzano, F. G., Proto-Siqueira, R., Silva-Jr, W. A., Falcao, R. P., and Zago, M. A. (2007). miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res* **40**(11), 1435-40.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., and Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* **302**(1), 1-12.
- Zhang, H., and Chen, Y. (2009). New insight into the role of miRNAs in leukemia. *Sci China C Life Sci* **52**(3), 224-31.
- Zhang, Y., Chao, T., Li, R., Liu, W., Chen, Y., Yan, X., Gong, Y., Yin, B., Liu, W., Qiang, B., Zhao, J., Yuan, J., and Peng, X. (2009). MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a. *J Mol Med* **87**(1), 43-51.
- Zhang, Y., Ohyashiki, J. H., Takaku, T., Shimizu, N., and Ohyashiki, K. (2006). Transcriptional profiling of Epstein-Barr virus (EBV) genes and host cellular genes in nasal NK/T-cell lymphoma and chronic active EBV infection. *Br J Cancer* **94**(4), 599-608.
- Zhao, J. J., Lin, J., Lwin, T., Yang, H., Guo, J., Kong, W., Dessureault, S., Moscinski, L. C., Rezania, D., Dalton, W. S., Sotomayor, E., Tao, J., and Cheng, J. Q. (2010). microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood* **115**(13), 2630-9.
- Zhou, M., Liu, Z., Zhao, Y., Ding, Y., Liu, H., Xi, Y., Xiong, W., Li, G., Lu, J., Fodstad, O., Riker, A. I., and Tan, M. (2010). MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1). *J Biol Chem*.
- Zhu, H., Wu, H., Liu, X., Li, B., Chen, Y., Ren, X., Liu, C. G., and Yang, J. M. (2009a). Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy* **5**(6), 816-23.
- Zhu, J. Y., Pfuhl, T., Motsch, N., Barth, S., Nicholls, J., Grasser, F., and Meister, G. (2009b). Identification of novel Epstein-Barr virus microRNA genes from nasopharyngeal carcinomas. *J Virol* **83**(7), 3333-41.
- Zunino, A., Degan, P., Vigo, T., and Abbondandolo, A. (2001). Hydrogen peroxide: effects on DNA, chromosomes, cell cycle and apoptosis induction in Fanconi's anemia cell lines. *Mutagenesis* **16**(3), 283-8.

---

Zur Hausen, H. (1967). Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *J Virol* **1**(6), 1174-85.

## 9. Anhang

### 9.1. Tabellen

Tabelle 20: Expression der EBV-kodierten miRNAs in NK/T-Zell Lymphomen

miRNA	Gesamtzahl	rel. Expression [%]	
		EBV+ n=44419	EBV miRNA n=1013
ebv-miR-BART7	241	0,54	23,79
ebv-miR-BART5	108	0,24	10,66
ebv-miR-BART11-5p	63	0,14	6,22
ebv-miR-BART1-5p	49	0,11	4,84
ebv-miR-BART19-3p	48	0,11	4,74
ebv-miR-BART14	37	0,08	3,65
ebv-miR-BART16	37	0,08	3,65
ebv-miR-BART22	34	0,08	3,36
ebv-miR-BART9	34	0,08	3,36
ebv-miR-BART2-5p	31	0,07	3,06
ebv-miR-BART13	30	0,07	2,96
ebv-miR-BART17-5p	29	0,07	2,86
ebv-miR-BART1-3p	28	0,06	2,76
ebv-miR-BART11-3p	26	0,06	2,57
ebv-miR-BART4	26	0,06	2,57
ebv-miR-BART10	25	0,06	2,47
ebv-miR-BART17-3p	24	0,05	2,37
ebv-miR-BART3	18	0,04	1,78
ebv-miR-BART8*	18	0,04	1,78
ebv-miR-BART6-5p	17	0,04	1,68
ebv-miR-BART6-3p	15	0,03	1,48
ebv-miR-BART8	10	0,02	0,99
ebv-miR-BART3*	9	0,02	0,89
ebv-miR-BART4*	8	0,02	0,79
ebv-miR-BART12	7	0,02	0,69
ebv-miR-BART20-3p	7	0,02	0,69
ebv-miR-BART21-3p	7	0,02	0,69
ebv-miR-BART21-5p	6	0,01	0,59
ebv-miR-BART19-5p	5	0,01	0,49
ebv-miR-BART2-3p	5	0,01	0,49
ebv-miR-BART20-5p	3	0,01	0,30
ebv-miR-BART15	2	0,00	0,20
ebv-miR-BART18-5p	2	0,00	0,20
ebv-miR-BART9*	2	0,00	0,20
ebv-miR-BART14*	1	0,00	0,10
ebv-miR-BART7*	1	0,00	0,10
ebv-miR-BHRF1-1	0	0,00	0,00
ebv-miR-BHRF1-2	0	0,00	0,00
ebv-miR-BHRF1-2*	0	0,00	0,00
ebv-miR-BHRF1-3	0	0,00	0,00

Tabelle 21: Expression zellulärer miRNAs in den untersuchten cDNA-Banken

miRNA	Gesamtzahl	rel.miRNA Expression [%]	Gesamtzahl	rel.miRNA Expression [%]	Gesamtzahl	rel.miRNA Expression [%]
	Thymus n=31961		EBV- n=29837		EBV+ n=44419	
hsa-let-7a	38	0,12	97	0,33	202	0,45
hsa-let-7a*	13	0,04	3	0,01	10	0,02
hsa-let-7a-2*	3	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-let-7b	34	0,11	32	0,11	125	0,28
hsa-let-7b*	1	0,00	0	0,00	6	0,01
hsa-let-7c	18	0,06	12	0,04	41	0,09
hsa-let-7c-3p	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-let-7d	8	0,03	20	0,07	21	0,05
hsa-let-7d*	6	0,02	4	0,01	11	0,02
hsa-let-7e	2	0,01	4	0,01	9	0,02
hsa-let-7e*	2	0,01	1	0,00	0	0,00
hsa-let-7f	18	0,06	122	0,41	169	0,38
hsa-let-7f-1*	4	0,01	1	0,00	4	0,01
hsa-let-7f-2*	5	0,02	6	0,02	6	0,01
hsa-let-7g	62	0,19	131	0,44	273	0,61
hsa-let-7g*	16	0,05	8	0,03	8	0,02
hsa-let-7i	22	0,07	19	0,06	45	0,10
hsa-let-7i*	25	0,08	22	0,07	22	0,05
hsa-miR-1	1	0,00	2	0,01	2	0,00
hsa-miR-100	145	0,45	4	0,01	27	0,06
hsa-miR-100*	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-101	344	1,08	291	0,98	298	0,67
hsa-miR-101*	1	0,00	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-103+107	902	2,82	738	2,47	825	1,86
hsa-miR-103-5p	22	0,07	12	0,04	17	0,04
hsa-miR-106a+17	1081	3,38	1090	3,65	514	1,16
hsa-miR-106a*	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-106b	706	2,21	528	1,77	374	0,84
hsa-miR-106b*	7	0,02	7	0,02	10	0,02
hsa-miR-107-5p	3	0,01	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-10a	6	0,02	6	0,02	0	0,00
hsa-miR-10b	38	0,12	5	0,02	15	0,03
hsa-miR-10b*	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-1185-3p	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-1248	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-1248a-3p	0	0,00	0	0,00	4	0,01
hsa-miR-1249	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-125a-3p	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-125a-5p	67	0,21	19	0,06	108	0,24
hsa-miR-125b	464	1,45	25	0,08	253	0,57
hsa-miR-125b*	5	0,02	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-125b-1*	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-125b-2	0	0,00	0	0,00	4	0,01
hsa-miR-125b-2*	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-126	1129	3,53	482	1,62	880	1,98
hsa-miR-126*	142	0,44	113	0,38	316	0,71
hsa-miR-1261	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-1268	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-1271	3	0,01	0	0,00	0	0,00



hsa-miR-1273	0	0,00	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-127-3p	10	0,03	2	0,01	0	0,00
hsa-miR-1274b	4	0,01	0	0,00	12	0,03
hsa-miR-1275	0	0,00	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-127-5p	6	0,02	3	0,01	0	0,00
hsa-miR-1277-5p	0	0,00	3	0,01	0	0,00
hsa-miR-1280	28	0,09	14	0,05	109	0,25
hsa-miR-128a+128b	274	0,86	79	0,26	33	0,07
hsa-miR-1301	6	0,02	5	0,02	0	0,00
hsa-miR-1307	7	0,02	3	0,01	4	0,01
hsa-miR-1308	0	0,00	4	0,01	0	0,00
hsa-miR-130a	103	0,32	53	0,18	122	0,27
hsa-miR-130b	13	0,04	17	0,06	16	0,04
hsa-miR-130b*	1	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-132	26	0,08	4	0,01	9	0,02
hsa-miR-132*	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-133a+133b	20	0,06	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-134	13	0,04	0	0,00	5	0,01
hsa-miR-135a	4	0,01	2	0,01	59	0,13
hsa-miR-135b	3	0,01	27	0,09	16	0,04
hsa-miR-135b*	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-136	3	0,01	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-136*	13	0,04	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-137	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-138	1	0,00	5	0,02	9	0,02
hsa-miR-138-1*	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-139-5p	31	0,10	20	0,07	26	0,06
hsa-miR-140-3p	52	0,16	76	0,25	137	0,31
hsa-miR-140-5p	44	0,14	20	0,07	57	0,13
hsa-miR-141	114	0,36	2	0,01	94	0,21
hsa-miR-141*	2	0,01	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-142-3p	748	2,34	1522	5,10	860	1,94
hsa-miR-142-5p	285	0,89	1199	4,02	909	2,05
hsa-miR-143	170	0,53	28	0,09	320	0,72
hsa-miR-143*	1	0,00	2	0,01	2	0,00
hsa-miR-144	8	0,03	7	0,02	5	0,01
hsa-miR-145	164	0,51	63	0,21	1028	2,31
hsa-miR-145*	7	0,02	0	0,00	3	0,01
hsa-miR-146a+146b-5p	221	0,69	552	1,85	176	0,40
hsa-miR-146b-3p	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-148a	85	0,27	33	0,11	205	0,46
hsa-miR-148a*	2	0,01	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-148b	24	0,08	11	0,04	8	0,02
hsa-miR-148b*	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-149	17	0,05	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-150	74	0,23	238	0,80	324	0,73
hsa-miR-150*	3	0,01	1	0,00	6	0,01
hsa-miR-151-3p	46	0,14	17	0,06	46	0,10
hsa-miR-151-5p	399	1,25	82	0,27	315	0,71
hsa-miR-152	101	0,32	38	0,13	54	0,12
hsa-miR-153	0	0,00	15	0,05	2	0,00
hsa-miR-153-2-5p	0	0,00	4	0,01	0	0,00
hsa-miR-154	6	0,02	2	0,01	1	0,00
hsa-miR-154*	2	0,01	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-155	67	0,21	374	1,25	636	1,43

hsa-miR-155*	0	0,00	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-15a	1268	3,97	1024	3,43	1315	2,96
hsa-miR-15a*	9	0,03	6	0,02	5	0,01
hsa-miR-15b	889	2,78	690	2,31	810	1,82
hsa-miR-15b*	3	0,01	3	0,01	0	0,00
hsa-miR-16	2266	7,09	3607	12,09	4036	9,09
hsa-miR-16-1*	1	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-16-2	0	0,00	0	0,00	4	0,01
hsa-miR-16-2*	24	0,08	15	0,05	13	0,03
hsa-miR-163	0	0,00	0	0,00	4	0,01
hsa-miR-17*	107	0,33	92	0,31	37	0,08
hsa-miR-181a	405	1,27	265	0,89	116	0,26
hsa-miR-181a*	2	0,01	6	0,02	0	0,00
hsa-miR-181a-2*	1	0,00	4	0,01	0	0,00
hsa-miR-181b	186	0,58	121	0,41	38	0,09
hsa-miR-181c	4	0,01	2	0,01	3	0,01
hsa-miR-181c*	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-181d	5	0,02	2	0,01	3	0,01
hsa-miR-182	53	0,17	4	0,01	7	0,02
hsa-miR-183	22	0,07	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-184	0	0,00	0	0,00	4	0,01
hsa-miR-185	58	0,18	89	0,30	8	0,02
hsa-miR-185*	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-186	37	0,12	18	0,06	36	0,08
hsa-miR-187	2	0,01	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-188-3p	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-188-5p	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-18a+b	43	0,13	54	0,18	16	0,04
hsa-miR-18a*	1	0,00	2	0,01	2	0,00
hsa-miR-190	73	0,23	21	0,07	23	0,05
hsa-miR-190b	3	0,01	4	0,01	9	0,02
hsa-miR-191	407	1,27	258	0,86	295	0,66
hsa-miR-192	15	0,05	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-192*	2	0,01	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-193a-3p	7	0,02	5	0,02	10	0,02
hsa-miR-193a-5p	1	0,00	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-193b	16	0,05	4	0,01	18	0,04
hsa-miR-193b*	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-194	22	0,07	8	0,03	12	0,03
hsa-miR-195	416	1,30	196	0,66	886	1,99
hsa-miR-196a	0	0,00	10	0,03	0	0,00
hsa-miR-196b	5	0,02	3	0,01	0	0,00
hsa-miR-196b*	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-197	2	0,01	0	0,00	6	0,01
hsa-miR-199a-3+199b-3p	1223	3,83	1328	4,45	1814	4,08
hsa-miR-199a-5p	242	0,76	268	0,90	419	0,94
hsa-miR-199b-5p	82	0,26	7	0,02	97	0,22
hsa-miR-19a	27	0,08	34	0,11	23	0,05
hsa-miR-19b	378	1,18	261	0,87	196	0,44
hsa-miR-19b*	0	0,00	2	0,01	0	0,00
hsa-miR-19b-2*	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-200a	84	0,26	0	0,00	40	0,09
hsa-miR-200a*	4	0,01	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-200b	692	2,17	0	0,00	525	1,18
hsa-miR-200b*	7	0,02	0	0,00	5	0,01

hsa-miR-200c	282	0,88	9	0,03	458	1,03
hsa-miR-200c*	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-202*	0	0,00	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-203	36	0,11	0	0,00	43	0,10
hsa-miR-204	37	0,12	0	0,00	30	0,07
hsa-miR-205	476	1,49	0	0,00	123	0,28
hsa-miR-205*	10	0,03	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-206	13	0,04	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-208b	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-20a	857	2,68	974	3,26	698	1,57
hsa-miR-20a*	4	0,01	3	0,01	1	0,00
hsa-miR-20b	131	0,41	242	0,81	32	0,07
hsa-miR-20b*	0	0,00	5	0,02	0	0,00
hsa-miR-21	470	1,47	2676	8,97	2605	5,86
hsa-miR-21*	9	0,03	31	0,10	16	0,04
hsa-miR-210	8	0,03	3	0,01	17	0,04
hsa-miR-212	5	0,02	3	0,01	0	0,00
hsa-miR-214	16	0,05	27	0,09	48	0,11
hsa-miR-214*	2	0,01	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-216a	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-218	160	0,50	14	0,05	27	0,06
hsa-miR-219-5p	3	0,01	6	0,02	2	0,00
hsa-miR-22	315	0,99	126	0,42	234	0,53
hsa-miR-22*	41	0,13	17	0,06	42	0,09
hsa-miR-221	336	1,05	324	1,09	409	0,92
hsa-miR-221*	1	0,00	8	0,03	13	0,03
hsa-miR-2210	0	0,00	0	0,00	4	0,01
hsa-miR-222	71	0,22	90	0,30	154	0,35
hsa-miR-223	199	0,62	209	0,70	260	0,59
hsa-miR-223*	2	0,01	1	0,00	19	0,04
hsa-miR-224	7	0,02	6	0,02	6	0,01
hsa-miR-23b+23a	1444	4,52	1389	4,66	3209	7,22
hsa-miR-23b*	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-24	290	0,91	226	0,76	455	1,02
hsa-miR-24-1*	0	0,00	0	0,00	3	0,01
hsa-miR-24-2*	7	0,02	0	0,00	3	0,01
hsa-miR-25	404	1,26	287	0,96	244	0,55
hsa-miR-26a	621	1,94	819	2,74	2006	4,52
hsa-miR-26a-1*	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-26b	268	0,84	652	2,19	1289	2,90
hsa-miR-26b*	1	0,00	0	0,00	4	0,01
hsa-miR-27a	1096	3,43	1309	4,39	2224	5,01
hsa-miR-27b	585	1,83	288	0,97	1468	3,30
hsa-miR-27b*	1	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-28-3p	37	0,12	24	0,08	46	0,10
hsa-miR-28-5p	81	0,25	58	0,19	100	0,23
hsa-miR-29a	281	0,88	234	0,78	670	1,51
hsa-miR-29a*	5	0,02	1	0,00	6	0,01
hsa-miR-29b	58	0,18	65	0,22	256	0,58
hsa-miR-29b-1*	0	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-29b-2*	2	0,01	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-29c	324	1,01	90	0,30	537	1,21
hsa-miR-29c*	3	0,01	2	0,01	2	0,00
hsa-miR-301a	22	0,07	24	0,08	20	0,05
hsa-miR-30a	31	0,10	14	0,05	108	0,24
hsa-miR-30a*	13	0,04	1	0,00	18	0,04

hsa-miR-30b	327	1,02	194	0,65	375	0,84
hsa-miR-30c	173	0,54	138	0,46	238	0,54
hsa-miR-30c-2*	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-30d	70	0,22	34	0,11	135	0,30
hsa-miR-30d*	6	0,02	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-30e	213	0,67	104	0,35	195	0,44
hsa-miR-30e*	42	0,13	38	0,13	52	0,12
hsa-miR-31	7	0,02	4	0,01	21	0,05
hsa-miR-31*	9	0,03	0	0,00	12	0,03
hsa-miR-32	16	0,05	47	0,16	65	0,15
hsa-miR-32*	0	0,00	4	0,01	2	0,00
hsa-miR-320	413	1,29	130	0,44	275	0,62
hsa-miR-323-3p	5	0,02	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-324-3p	23	0,07	7	0,02	14	0,03
hsa-miR-324-5p	15	0,05	5	0,02	7	0,02
hsa-miR-326	1	0,00	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-328	4	0,01	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-329	4	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-330-3p	1	0,00	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-331	2	0,01	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-331-3p	0	0,00	7	0,02	6	0,01
hsa-miR-335	21	0,07	6	0,02	11	0,02
hsa-miR-335*	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-337-3p	13	0,04	0	0,00	6	0,01
hsa-miR-337-5p	6	0,02	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-338-3p	3	0,01	0	0,00	6	0,01
hsa-miR-338-5p	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-339-3p	6	0,02	0	0,00	7	0,02
hsa-miR-339-5p	0	0,00	1	0,00	7	0,02
hsa-miR-33a	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-33a*	2	0,01	2	0,01	1	0,00
hsa-miR-340	8	0,03	7	0,02	12	0,03
hsa-miR-340*	1	0,00	2	0,01	2	0,00
hsa-miR-342-3p	192	0,60	90	0,30	143	0,32
hsa-miR-342-5p	1	0,00	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-345	21	0,07	21	0,07	18	0,04
hsa-miR-34a	46	0,14	171	0,57	197	0,44
hsa-miR-34a*	0	0,00	9	0,03	7	0,02
hsa-miR-34b	0	0,00	0	0,00	8	0,02
hsa-miR-34b*	3	0,01	2	0,01	29	0,07
hsa-miR-34c-3p	0	0,00	1	0,00	11	0,02
hsa-miR-34c-5p	2	0,01	4	0,01	64	0,14
hsa-miR-361-3p	2	0,01	11	0,04	14	0,03
hsa-miR-361-5p	61	0,19	105	0,35	99	0,22
hsa-miR-362-3p	13	0,04	19	0,06	11	0,02
hsa-miR-362-5p	8	0,03	3	0,01	6	0,01
hsa-miR-363	45	0,14	59	0,20	6	0,01
hsa-miR-365	38	0,12	5	0,02	19	0,04
hsa-miR-367	0	0,00	0	0,00	9	0,02
hsa-miR-369-3p	13	0,04	3	0,01	7	0,02
hsa-miR-369-5p	1	0,00	0	0,00	4	0,01
hsa-miR-370	1	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-374a	30	0,09	85	0,28	94	0,21
hsa-miR-374a*	0	0,00	2	0,01	1	0,00
hsa-miR-374b	91	0,28	148	0,50	169	0,38
hsa-miR-374b*	0	0,00	2	0,01	0	0,00

hsa-miR-375	5	0,02	0	0,00	12	0,03
hsa-miR-376a	41	0,13	0	0,00	8	0,02
hsa-miR-376a*	4	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-376a-2	3	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-376b	2	0,01	2	0,01	4	0,01
hsa-miR-376c	92	0,29	3	0,01	17	0,04
hsa-miR-377	9	0,03	1	0,00	3	0,01
hsa-miR-378	89	0,28	19	0,06	20	0,05
hsa-miR-378*	10	0,03	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-379*	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-381	6	0,02	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-382	6	0,02	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-382-3p	0	0,00	2	0,01	1	0,00
hsa-miR-383	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-409-3p	3	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-410	14	0,04	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-411	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-421	4	0,01	10	0,03	7	0,02
hsa-miR-423-3p	35	0,11	13	0,04	31	0,07
hsa-miR-423-5p	16	0,05	3	0,01	12	0,03
hsa-miR-424	802	2,51	200	0,67	123	0,28
hsa-miR-424*	1	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-425	141	0,44	50	0,17	89	0,20
hsa-miR-425*	4	0,01	3	0,01	4	0,01
hsa-miR-429	47	0,15	0	0,00	29	0,07
hsa-miR-431	4	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-432	9	0,03	0	0,00	3	0,01
hsa-miR-433	1	0,00	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-449a+449b	0	0,00	0	0,00	95	0,21
hsa-miR-449c	0	0,00	0	0,00	8	0,02
hsa-miR-450a	17	0,05	3	0,01	1	0,00
hsa-miR-451	101	0,32	56	0,19	28	0,06
hsa-miR-452	5	0,02	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-454	6	0,02	9	0,03	29	0,07
hsa-miR-455-3p	245	0,77	45	0,15	48	0,11
hsa-miR-455-5p	37	0,12	3	0,01	5	0,01
hsa-miR-483-3p	4	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-483-5p	1	0,00	0	0,00	4	0,01
hsa-miR-484	86	0,27	37	0,12	34	0,08
hsa-miR-485-5p	3	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-486-3p	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-486-5p	5	0,02	1	0,00	5	0,01
hsa-miR-487a	5	0,02	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-487b	22	0,07	4	0,01	1	0,00
hsa-miR-488	2	0,01	1	0,00	12	0,03
hsa-miR-491-3p	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-493	9	0,03	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-493*	9	0,03	2	0,01	0	0,00
hsa-miR-494	4	0,01	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-495	10	0,03	4	0,01	1	0,00
hsa-miR-497	395	1,24	131	0,44	362	0,81
hsa-miR-497*	0	0,00	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-499-3p	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-499-5p	4	0,01	3	0,01	3	0,01
hsa-miR-500	3	0,01	1	0,00	4	0,01
hsa-miR-501-3p	1	0,00	0	0,00	0	0,00

hsa-miR-501-5p	2	0,01	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-502-3p	10	0,03	11	0,04	8	0,02
hsa-miR-502-5p	2	0,01	2	0,01	0	0,00
hsa-miR-503	7	0,02	4	0,01	1	0,00
hsa-miR-505	8	0,03	4	0,01	7	0,02
hsa-miR-509-3-5p+509-5p	0	0,00	3	0,01	0	0,00
hsa-miR-511	3	0,01	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-511-3p	0	0,00	10	0,03	4	0,01
hsa-miR-512-5p	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-513-5p	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-514	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-520a-5p	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-532-3p	9	0,03	0	0,00	5	0,01
hsa-miR-532-5p	31	0,10	16	0,05	19	0,04
hsa-miR-542-3p	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-543	3	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-545*	0	0,00	2	0,01	0	0,00
hsa-miR-548a-3p	0	0,00	2	0,01	3	0,01
hsa-miR-548d-5p	2	0,01	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-548h-3	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-551a	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-551b	1	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-566	3	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-570	2	0,01	2	0,01	0	0,00
hsa-miR-574-3p	10	0,03	5	0,02	19	0,04
hsa-miR-574-5p	7	0,02	1	0,00	9	0,02
hsa-miR-576-3p	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-576-5p	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-582-5p	7	0,02	0	0,00	14	0,03
hsa-miR-584	0	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-588	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-589	1	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-590-3p	7	0,02	16	0,05	51	0,11
hsa-miR-590-5p	6	0,02	5	0,02	5	0,01
hsa-miR-595	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-598	25	0,08	4	0,01	3	0,01
hsa-miR-599	4	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-610	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-616*	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-620	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-621	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-624*	1	0,00	0	0,00	5	0,01
hsa-miR-625	0	0,00	4	0,01	0	0,00
hsa-miR-625*	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-627	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-628-3p	0	0,00	3	0,01	0	0,00
hsa-miR-628-5p	2	0,01	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-629*	0	0,00	1	0,00	3	0,01
hsa-miR-643	1	0,00	4	0,01	0	0,00
hsa-miR-645	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-651	3	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-652	42	0,13	43	0,14	33	0,07
hsa-miR-654	6	0,02	0	0,00	2	0,00
hsa-miR-655	4	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-656	6	0,02	2	0,01	2	0,00

hsa-miR-660	7	0,02	6	0,02	7	0,02
hsa-miR-664	4	0,01	0	0,00	12	0,03
hsa-miR-671-3p	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-671-5p	16	0,05	2	0,01	7	0,02
hsa-miR-675	5	0,02	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-675b	0	0,00	2	0,01	0	0,00
hsa-miR-7	8	0,03	10	0,03	12	0,03
hsa-miR-708	27	0,08	2	0,01	22	0,05
hsa-miR-708*	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-7-1*	13	0,04	19	0,06	11	0,02
hsa-miR-720	3	0,01	0	0,00	15	0,03
hsa-miR-744	8	0,03	8	0,03	10	0,02
hsa-miR-766	9	0,03	4	0,01	9	0,02
hsa-miR-768-3p	8	0,03	0	0,00	25	0,06
hsa-miR-768-5p	0	0,00	0	0,00	4	0,01
hsa-miR-769-5p	6	0,02	1	0,00	3	0,01
hsa-miR-770-5p	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-874	6	0,02	1	0,00	9	0,02
hsa-miR-874 5p	1	0,00	0	0,00	4	0,01
hsa-miR-886-5p	0	0,00	2	0,01	1	0,00
hsa-miR-875-5p	3	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-886-5p	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-887	13	0,04	1	0,00	3	0,01
hsa-miR-888	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-889	4	0,01	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-891a	3	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-9	2	0,01	0	0,00	3	0,01
hsa-miR-9*	3	0,01	6	0,02	3	0,01
hsa-miR-92a	226	0,71	298	1,00	405	0,91
hsa-miR-92a-1*	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-92b	0	0,00	0	0,00	23	0,05
hsa-miR-93	197	0,62	182	0,61	152	0,34
hsa-miR-93*	2	0,01	10	0,03	2	0,00
hsa-miR-936	12	0,04	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-940	0	0,00	2	0,01	0	0,00
hsa-miR-941	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-942	5	0,02	2	0,01	3	0,01
hsa-miR-944	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-95	2	0,01	3	0,01	5	0,01
hsa-miR-96	19	0,06	4	0,01	3	0,01
hsa-miR-96*	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-98	3	0,01	4	0,01	2	0,00
hsa-miR-98-3p	1	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-99a	78	0,24	1	0,00	31	0,07
hsa-miR-99a*	7	0,02	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-99b	9	0,03	7	0,02	14	0,03
hsa-miR-99b*	1	0,00	0	0,00	0	0,00
pot.neu-miR-42	0	0,00	2	0,01	0	0,00
pot.neu-miR-27	0	0,00	2	0,01	0	0,00
pot.neu-miR-34	0	0,00	2	0,01	0	0,00

## 9.2. Publikationen

Teile dieser Arbeit und andere von mir bearbeitete Projekte wurden als folgende wissenschaftliche Artikel veröffentlicht:

**Motsch N\***, Imig J\*, Zhu J.Y, Barth S, Reineke T, Tinguely M, Meister G, Renner C\* and Grässer, F.A\*. MicroRNA profiling in EBV-associated NK/T-cell lymphoma. *Molecular cancer*, zur Veröffentlichung eingereicht

\* These authors contributed equally to this work.

Imig J\*, **Motsch N\***, Zhu J.Y, Barth S, Okoniewski M, Reineke T, Tinguely M, Faggioni A, Trivedi P, Meister G, Renner C\* and Grässer, F.A\*. MicroRNA profiling in EBV-associated B-cell lymphoma. *NucleicAcids Res*, zur Veröffentlichung eingereicht

\* These authors contributed equally to this work.

Dölken L, Malterer G, Erhard F, Kothe S, Friedel C, Suffert G, Marcinowski L, **Motsch N**, Barth S, Beitzinger M, Lieber D, Bailer S, Hoffmann R, Ruzsics Z, Kremmer E, Pfeffer S, Zimmer R, Koszinowski U, Grässer F, Meister G, Haas J. Systemic Analysis of Viral and Cellular miRNA Targets in Cells Latently Infected with Human  $\gamma$ -Herpesviruses through RISC Immunoprecipitation Assays. *Cell Host & Microbe* (2010)

Zhu JY, Pfuhl T, **Motsch N**, Barth S, Nicholls J, Grässer F, Meister G. Identification of novel Epstein-Barr virus microRNA genes from nasopharyngeal carcinomas. *J Virol* 2009 Apr; 83(7):3333-41

**Motsch N**, Pfuhl T, Mrazek J, Barth S, Grässer F.A. Epstein-Barr Virus- encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol* 2007 Nov; 4(3):131-7

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Juni 2010 auf dem Pezcoller Symposium „RNA and cancer“ präsentiert.



### 9.3. Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Friedrich Grässer, möchte ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Bereitstellung der interessanten Themen, für seine Hilfestellung sowie für sein Vertrauen hinsichtlich der eigenverantwortlichen Bearbeitung von Projekten danken.

Unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Gunter Meister und Prof. Dr. Christoph Renner danke ich für die gute Zusammenarbeit. Ich danke Jochen Imig für die gemeinsame Arbeit und Jiayun Zhu für die Bereitstellung der Makros, ohne die eine Analyse der Daten noch aufwendiger gewesen wäre.

Ganz herzlich danken möchte ich Frau Dr. Stephanie Barth für ihre Hilfsbereitschaft, ihre wertvollen Ratschläge und ihre Unterstützung. Besonderer Dank gilt auch Herrn Jarek Szczyrba für seine Unterstützung und seine Freundschaft, die den Laboralltag angenehmer gestaltet und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke auch meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Grässer für die angenehme Arbeitsatmosphäre, besonders Frau Ruth Nord und Herrn Dr. Thorsten Pfuhl für ihre Hilfsbereitschaft und ihre tatkräftige Unterstützung.

Allen anderen Mitarbeitern der Virologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre. Besonders hervorzuheben ist dabei Frau Barbara Best; sie konnte immer irgendwie weiterhelfen.

Herzlicher Dank gilt auch meinen Eltern und meinen Freunden, die mich immer unterstützt und aufgemuntert haben. Meine Eltern haben mir diese Arbeit durch die finanzielle Unterstützung während meines Studiums erst ermöglicht.

Einen wesentlichen, nicht-wissenschaftlichen Teil hat Marc Ketter zu dieser Arbeit beigetragen. Ich danke ihm von ganzem Herzen dafür, dass er unermüdlich an mich glaubt.

---

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name	Natalie Motsch
Geburtsdatum	09.03.1983 in Völklingen
Nationalität	deutsch

---

### Ausbildung

08/1990 - 06/2002	Warndt-Gymnasium (mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig) Abschluss: Abitur
10/2002 – 08/2007	Biologie-Studium mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes Abschluss: Diplom (Note: sehr gut)  Hauptfach: Virologie und Immunologie Nebenfach: Zellbiologie, Genetik  Thema der Diplom-Arbeit: „Funktionsanalyse Epstein- Barr-Virus kodierter und zellulärer microRNAs“
Seit 09/2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotion am Institut für Virologie der Universitätskliniken des Saarlandes

---

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Völklingen, Juli 2010

-----  
Natalie Motsch