

Aus dem Institut für Infektionsmedizin, Abteilung Virologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchung zur Funktion der EBV-kodierten micro RNAs
miR-BHRF1-2 und miR-BHRF1-3**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Theoretischen Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2011

vorgelegt von Petra Fluck

geb. am 22.01.1980 in Rodalben

Die experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden am Lehrstuhl/ Institut für Infektionsmedizin, Abteilung Virologie der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg/ Saar durchgeführt.

Erstgutachter: Prof. Dr. F. Grässer

Zweitgutachter: Prof. Dr. K. Röhmer

Tag der Disputation:

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Nikolaus Müller-Lantzsch danke ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis.

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

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

Bei Herrn Dipl. Biol. Thorsten Pfuhl und Herrn Dipl. Biol. Alfredo Mamiani möchte ich mich besonders für die Vermittlung molekularbiologischer Arbeitsmethoden, ihre Hilfsbereitschaft und Betreuung bedanken.

Im Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. vet. med. Claudia Ehse für die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

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

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

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

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

Ein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt meiner Familie, die mir die Möglichkeit zu diesem Studium gab und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen

Verzeichnis der Tabellen

1. Einleitung	12
1.1 Das Epstein-Barr Virus (EBV)	12
1.2 Die EBV-Infektion und EBV-assoziierte Krankheiten	13
1.2.1 Die Infektiöse Mononukleose	14
1.2.2 Das Nasopharyngealkarzinom	15
1.2.3 Das Burkitt-Lymphom	15
1.2.4 Das Hodgkin-Lymphom	16
1.2.5 Immunoblastische B-Zell-Lymphome Immundefizienter	16
1.2.6 T-Zell-Lymphome	17
1.2.7 Orale Haarleukoplakie (OHL)	17
1.3 Das EBV-Genom	18
1.4 Der Replikationszyklus des Epstein-Barr Virus	19
1.4.1 Die lytische Infektion	20
1.4.2 Die latente Infektion	21
1.5 micro RNAs (miRNAs)	22
1.5.1 Die Entdeckung der microRNAs	22
1.5.2 Die Genomische Organisation und Expression von micro RNAs	24
1.5.3 Die Biogenese der microRNAs	25
1.5.4 Wirkungsmechanismus und Funktion der microRNAs	27
1.6 Die EBV-kodierten microRNAs und ihre Zielgene	29
1.6.1 Die fünf 2004 entdeckten EBV-microRNAs	29
1.6.2 Die neuentdeckten EBV-microRNAs	32
1.7 BamH1F-Region und BFLF2	35
1.8 Zielsetzung der Arbeit	38
2. Material	39
2.1 Chemikalien, Membranen und Filter	39
2.2 Puffer und Lösungen	40
2.3 Enzyme	42

2.4. Größen- und Molekulargewichtsmarker	43
2.4.1 DNA-Größenmarker	43
2.4.2 Protein-Molekulargewichtsmarker	43
2.5 Antikörper	44
2.5.2 Sekundärantikörper	44
2.6 Zelllinien	45
2.7 Bakterienstämme	45
2.8 Nähr- und Kulturmedien	46
2.8.1 Nährmedien zur Bakterienanzucht	46
2.8.2 Kulturmedien zur Anzucht von Säugerzellen	46
2.9 Vektoren	47
2.9.1 pGEM TM -T Vektor	47
2.9.2 pGEX-4T-1 Vektor	48
2.9.3 pSG5 Vektor	49
2.9.4 pCEP4 Vektor	50
2.9.5 pEGFP-C1 Vektor	50
2.9.6 pGL3-Promotor Vektor	51
2.9.7 Effektorplasmide	52
2.10 Synthetische Oligonukleotide	54
2.11 Computersoftware	57
2.12 Verwendete Laborgeräte	57
3. Methoden	59
3.1 Methoden der Bakterienkultur	59
3.1.1 Aufzucht und Lagerung von Bakterien	59
3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien	59
3.1.3 Transformation kompetenter Bakterien	61
3.1.4 Blue/White Screening	61
3.2 Kultur von eukaryotischen Zellen	62
3.2.1 Kultur von B-Zellen in Suspension	62
3.2.2 Kultur von Monolayerzellen	62
3.2.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit Nanofectin TM	63
3.2.4 Bestimmung der Zellzahl mit dem Zellanalysegerät CASY TM	63
3.2.5 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	64
3.3 DNA-Techniken	65

3.3.1 Analytische Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipräparation, „Boiling-Präp“)	65
3.3.2 Präparative Plasmidaufreinigung (Nucleobond™ -Methode)	65
3.3.3 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolisieren	67
3.3.4 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	68
3.3.5 Photometrische Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von Nukleinsäuren	69
3.3.6 Annealing einzelsträngiger Oligonukleotide	69
3.3.7 Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA	70
3.3.8 Herstellung der Agarosegele	71
3.3.9 Glasmilch-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen oder Lösungen	71
3.4 Enzymatische Modifikation von DNA	72
3.4.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)	72
3.4.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA-Enden	73
3.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten	74
3.4.4 Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde	75
3.5 Die Polymerase-Kettenreaktion	75
3.6 Der Luciferase-Reportergen-Assay	78
3.7 RNA-Techniken	79
3.7.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen	79
3.7.2 Gelelektrophorese einzelsträngiger RNA	80
3.7.3 Umschreibung von RNA in cDNA	80
3.7.4 Northern-Blot	81
3.8 Proteintechniken	82
3.8.1 Herstellung von 2 x Sample-Buffer-Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen	82
3.8.2 Bestimmung der Konzentration von Proteinextrakten	83
3.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	84
3.8.4 Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels	85
3.8.5 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	86
3.8.6 Western Blot (Immunoblot)	86
3.8.6.1 Proteintransfer	86
3.8.6.2 Immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen	87
3.8.6.3 Entfernung gebundener Antikörper nach ECL™ -Färbung („Stripping“)	88
3.8.7 Nachweis der Proteinlokalisierung durch Immunfluoreszenzen	88

3.9 Herstellung von Antigen für die Immunisierung von Versuchstieren	89
3.9.1 Induktion der rekombinanten Proteinexpression in Bakterien	89
3.9.2 Präparative Proteinaufbereitung mit Hilfe von SDS-PAGE	90
3.8.3 Lyse von induzierten Bakterien nach IPTG-Induktion	91
4. Ergebnisse	93
4.1 Herstellung eines BFLF2-Antigens zur Immunisierung von Ratten und somit zur Herstellung monoklonaler Antikörper	93
4.1.1 Klonierung von GST-BFLF2-HA	94
4.1.2 Expression des Fusionsproteins GST-BFLF2-HA-Proteins in Bakterien	95
4.1.3 Anreicherung und Aufreinigung von GST-BFLF2-HA	97
4.2 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen BFLF2	100
4.2.1 Herstellung eines pSG5-BFLF2-HA Konstruktes	100
4.2.2 Untersuchung der BFLF2-Antikörper auf Antigen-Spezifität	101
4.3 Subzelluläre Lokalisation von BFLF2	105
4.4 Verifizierung der vorhergesagten Ziel-mRNAs der EBV-kodierten microRNAs miR-BHRF1-2 und miR-BHRF1-3	109
4.4.1 Klonierung der EBV microRNAs miR-BHRF1-2 und 1-3 in den Expressionsvektor pCEP4	109
4.4.2 Klonierung der 3'UTR von BFLF2	111
4.4.3 Regulierung der BFLF2-Expression durch die miR-BHRF1-2 und 1-3 im pCEP4-Vektor	113
4.4.4 Klonierung der EBV microRNAs miR-BHRF1-2 und 1-3 in den Expressionsvektor pSG5	115
4.4.5 Klonierung der für die BFLF2-3'UTR unspezifischen miR-BHRF1-1 und miR-155	117
4.4.6 Expression der microRNAs miR-BHRF1-1, 1-2 und 1-3	118
4.4.7 Regulierung der BFLF2-Expression durch die miR-BHRF1-2 und 1-3 im pSG5-Vektor	120
4.4.8 Durchführung des Luciferase-Reportergen-Assays mit der für die BFLF2-3'UTR unspezifischen microRNA miR-BHRF1-1 im pSG5-Vektor	123
4.4.9 Durchführung des Luciferase-Reportergen-Assays mit der für die BFLF2-3'UTR unspezifischen microRNA miR-155 im pSG5-Vektor	125
5. Diskussion	127

5.1 Herstellung des GST-BFLF2-Konstruktes und Expression des Fusionsproteins in Bakterien	128
5.2 Eukaryotische Expression des BFLF2-Proteins mit C-terminalem HA-„Tag“	129
5.3 Nachweis von endogenem BFLF2 in B-Zellen	129
5.4 Subzelluläre Lokalisation von BFLF2	130
5.5 Herstellung der miR-BHRF1 und miR-155 Effektorstrukture und Expression der microRNAs in eukaryotischen Zellen	131
5.6 Herstellung des BFLF2-Luciferase-Reportergenkonstruktes	132
5.7 Regulation der BFLF2-3'UTR durch die miR-BHRF1-2 und 1-3	132
5.8 Ausblick	134
6. Zusammenfassung	135
7. Literaturverzeichnis	137

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: EBV-Virionen (Elektronenmikroskopische Darstellung)	16
Abbildung 2: Schematische Darstellung des EBV-Episoms	22
Abbildung 3: Struktur der Vorläufer der lin-4 und let-7 miRNAs	26
Abbildung 4: Modell der miRNA Biogenese (Kim 2005)	29
Abbildung 5: Posttranskriptionelle Regulierung durch microRNAs (Bartel 2004)	31
Abbildung 6: EBV-kodierte miRNAs	33
Abbildung 7: Lokalisierung der EBV miRNAs im EBV-Genom	34
Abbildung 8: Die genomische Lokalisation der BART-microRNAs (Cullen et al., 2006)	35
Abbildung 9: Die Lokalisation der 2009 bekannten miRNAs (Pratt et al. 2009)	
Abbildung 10: Schematische Übersicht über die genomische Lokalisation der EBVmiRNAs (Seto et al.2010)	
Abbildung 11: Schematische Zeichnung der genomischen Lokalisation der BamH1F-Region im EBV-Genom	35
Abbildung 12: Vektorkarte des pGEM TM -T	47
Abbildung 13: Vektorkarte des pGEX-4T-1 Vektors	48
Abbildung 14: Vektorkarte des pSG5 Vektors	49
Abbildung 15: Vektorkarte des pCEP4 Vektors	50
Abbildung 16: Vektorkarte des pEGFP-C1 Vektors	51
Abbildung 17: Vektorkarte des pGL3-Promoter Vektors	52
Abbildung 18: Amplifikation von BFLF2-HA und Klonierung von BFLF2-HA in pGEX	95
Abbildung 19: Induktion des GST-BFLF2-HA-Fusionsproteins: Coomassie- Gel	96
Abbildung 20: Induktion des GST-BFLF2-HA-Fusionsproteins: Western Blot	97
Abbildung 21: Aufreinigung des GST-BFLF2-HA-Fusionsproteins: Coomassie-Gel	99
Abbildung 22: Aufreinigung des GST-BFLF2-HA-Fusionsproteins: Western Blot	99
Abbildung 23: Klonierung desBFLF2-HA Expressionsvektors	101
Abbildung 24: Nachweis von BFLF2-HA im Western-Blot	102
Abbildung 25: Nachweis von endogenem BFLF2 durch ausgewählte BFLF2-Antikörper im Western Blot	103
Abbildung 26: Nachweis von BFLF2 im Western Blot durch die BFLF2-Antikörper 3F3 und 7H11	104
Abbildung 27: Immunfluoreszenz zur subzellulären Lokalisation von BFLF2	108
Reihe 1 der Abb. 27: Positivkontrolle mit dem HA-spezifischen Antikörper 3F10 in einer Verdünnung von 1:100	106

Reihe 2 der Abb. 27: Positivkontrolle mit dem BFLF2-spezifischen Antikörper C1 von Gonella et al. in einer Verdünnung von 1:20	106
Reihe 3 der Abb. 27: Immunfluoreszenz mit dem BFLF2-spezifischen Antikörper 3F3 in einer Verdünnung von 1:10	107
Reihe 4 der Abb. 27: Immunfluoreszenz mit dem BFLF2-spezifischen Antikörper 7H11 in einer Verdünnung von 1:10	107
Abbildung 28: Probe-PCR zur Kontrolle, ob ein Insert in pCEP4 vorliegt und zur Überprüfung der Orientierung des Inserts	110
Abbildung 29: PCR-Amplifikation von BFLF2-3'UTR	112
Abbildung 30: Orientierungsverdau der pGL3-BFLF2-3'UTR-Konstrukte	112
Abbildung 31: a) Regulation der BFLF2-3'UTR durch BHRF1-2 und BHRF1-3 (in pCEP4)	114
b) Regulation der BFLF2-3'UTR durch BHRF1-2 und BHRF1-3 (in pCEP4)	115
Abbildung 32: PCR-Amplifikation von miR-BHRF1-2 und 1-3	116
Abbildung 33: Klonierung von pSG5-BHRF1-2+3 (Spur 1-20) und pGEM- BHRF1-2+3 (Spur a-d)	117
Abbildung 34: Orientierungsverdau der pSG5-BHRF1-2+3 Klone	117
Abbildung 35: Orientierungsverdau des pSG5-miR155-Konstrukts	118
Abbildung 36: Northern Blot zum Nachweis der miR-BHRF1-1, 1-2 und 1-3	119
Abbildung 37: a) Regulation der BFLF2-3'UTR durch BHRF1-2 und BHRF1-3 (in pSG5)	121
b) Regulation der BFLF2-3'UTR durch BHRF1-2 und BHRF1-3 (in pSG5)	122
Abbildung 38: a) Keine Regulation der BFLF2-3'UTR durch BHRF1-1	123
b) Keine Regulation der BFLF2-3'UTR durch BHRF1-1	124
Abbildung 39: a) Keine Regulation der BFLF2-3'UTR durch miR-155	125
b) Keine Regulation der BFLF2-3'UTR durch miR-155	126

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Pipettierschema eines 50 μ l-Standard-PCR-Ansatzes	77
Tabelle 2: Schema eines verwendeten PCR-Standardprogramms	78
Tabelle 3: Komponenten für ein 10%iges Polyacrylamidgel	85

1. Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr Virus (EBV)

Der englische Chirurg Dennis Burkitt beschrieb in den fünfziger Jahren erstmals klinische und epidemiologische Eigenschaften eines in Ost- und Zentralafrika primär bei Kindern endemisch auftretenden Lymphoms (Burkitt, 1958). Auf Grund der auffälligen geographischen Verteilung in Malaria- und Gelbfiebergebieten postulierte er die Beteiligung eines infektiösen Agens an der Genese der später nach ihm benannten Burkitt-Lymphome. Anthony Epstein, Yvonne Barr und Budd Achong gelang im Jahre 1964 bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Ultradünnschnitten von *in vitro* kultivierten Burkitt-Lymphomzellen der Nachweis eines Herpes Virus (Epstein et al., 1964). Nach seinen Entdeckern wurde das Virus als Epstein-Barr Virus bezeichnet, es ist aber auch als Humanes Herpesvirus 4 bekannt. In Abbildung 1 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme von EBV-Partikeln dargestellt. Im Jahre 1967 konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das Epstein-Barr Virus die Fähigkeit besitzt, *in vitro* B-Lymphozyten zu immortalisieren (Henle et al., 1967; Pope et al., 1968).

Das Virus wird auf Grund morphologischer und biologischer Merkmale der Gattung der *Lymphocryptoviridae* innerhalb der Familie der γ - *Herpesviridae* zugeordnet. Die Lymphocryptoviren haben ein enges Wirtsspektrum, sie infizieren nur Altwelt-Primaten.

Das Epstein-Barr Virus ist der einzige humanpathogene Vertreter dieser Gruppe. Es zeigt den typischen herpesviralen Aufbau, besitzt ein 172 kbp großes, lineares, doppelsträngiges DNA-Genom und ist von einem Nukleokapsid mit einem Durchmesser von 100-110 nm umgeben. Das ikosaedrische Nukleokapsid besteht aus 162 Kapsomeren und wird von einer Lipidmembran (envelope) mit zahlreichen nach außen gerichteten Glycoproteinen umschlossen (Roizman, 1990). Zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran liegt das Tegument – eine oft asymmetrisch verteilte, amorphe Proteinschicht variabler Stärke (Rickinson and Kieff, 1996).

Auf Grund signifikanter Unterschiede in den primären Aminosäuresequenzen der EBV-Kernantigene (Epstein-Barr Virus Nuclear Antigens) EBNA 2, EBNA 3A, EBNA 3 und EBNA 3C und der daraus folgenden verschiedenen zytotoxischen T-Zellantworten,

unterscheidet man zwischen den EBV-Typen 1 und 2 (Sample et al., 1990). EBV-Typ 1 weist gegenüber EBV-Typ 2 *in vitro* eine deutlich höhere Transformationseffizienz auf (Rickinson et al., 1987) und ist in Industrienationen vorherrschend, während das Verhältnis der beiden Typen in afrikanischen Ländern sowie in China ausgeglichen ist (Rowe et al., 1989; Zimmer et al., 1986).

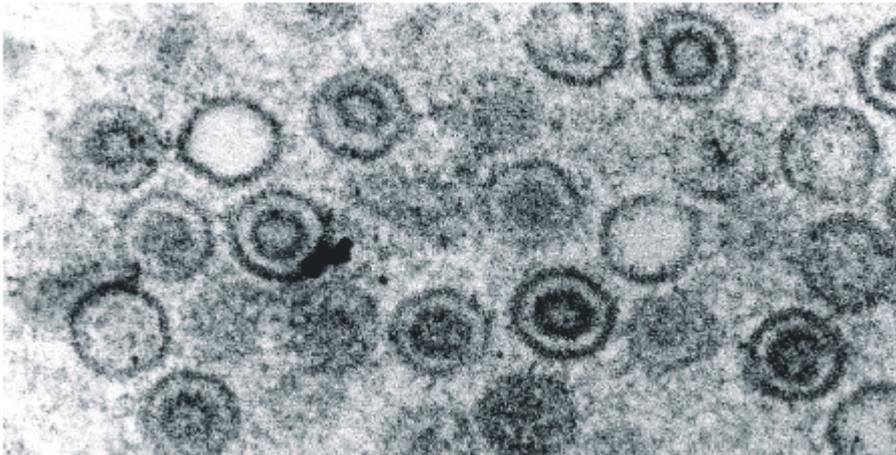


Abb. 1: EBV-Virionen (Elektronenmikroskopische Darstellung)

Elektronenmikroskopische Darstellung von Epstein-Barr Virionen in einer Biopsie von oraler Haarleukoplakie, negativ-gefärbt [H.R.Gelderblom (Sugihara, Reupke et al. 1990)]

1.2 Die EBV-Infektion und EBV-assoziierte Krankheiten

Das Epstein-Barr Virus zählt zu den am häufigsten auftretenden Viren des Menschen. Es ist ubiquitär verbreitet und 95% der Adults sind EBV-seropositiv, das heißt sie weisen IgG-Antikörper gegen Hüllmembran oder Kapsidproteine auf (Henle et al., 1968; Gerber et al., 1972). Die Übertragung des EBV erfolgt horizontal durch die Speichelflüssigkeit (Golden et al., 1973). Es gelangt durch rezeptorvermittelte Endozytose in die primäre Zielzelle, wobei es zur Wechselwirkung zwischen dem Glykoproteinkomplex pg220/350 auf der Virushüllmembran und dem C3d-Komplementrezeptor CD21 (CR2) auf der Oberfläche der Zielzelle kommt. Das CD21-Antigen wird von unreifen B-Lymphozyten in hoher Dichte präsentiert, so dass ruhende B-Lymphozyten der Schleimhaut des Mund- und Rachenraumes als primäre Zielzellen in Betracht kommen (Niedobitek et al., 1997). Es besteht auch die Möglichkeit, dass undifferenzierte Epithelzellen des Nasen-Rachenraumes sowie der

Zungenoberfläche, in denen eine produktive lytische Vermehrung des Virus erfolgt (Greenspan et al., 1985; Morgan et al., 1979; Sixbey et al., 1984), als primäre Zielzellen der Virusinfektion anzusehen sind, da auch sie geringe Mengen an CD21 exprimieren. Nach erfolgter Primärinfektion ist das EBV - wie alle Herpesviren - in der Lage, lebenslang im Wirt zu persistieren. Hierbei dienen latent infizierte, ruhende, CD23-negative Memory B-Zellen als Virusreservoir (Babcock et al., 1998; Gratama et al., 1988 Miyashita et al., 1995). Der Zeitpunkt der Primärinfektion ist stark abhängig von dem Lebensstandard und den hygienischen Bedingungen (Evans 1982). In Entwicklungsländern - wie Afrika - und in China erfolgt die Primärinfektion meistens asymptomatisch in den ersten drei Lebensjahren. In Industrienationen geschieht dies häufig später und führt in etwa 50% der Fälle im frühen Erwachsenenalter zum Krankheitsbild der Infektiösen Mononukleose (Henle et al., 1968). Darüber hinaus wurde das EBV als erstes humanpathogenes Virus kausal mit der Entstehung verschiedener maligner lymphoproliferativer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. In jüngster Vergangenheit besteht außerdem der Verdacht, dass EBV mit einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel Multipler Sklerose, systemischem Lupus erythematodes und der rheumatoiden Arthritis in Verbindung zu bringen ist (Toussiroit et al., 2008; Bagert et al., 2009; Pohl et al., 2009). Des Weiteren ist es in der Lage, *in vitro* primäre B-Zellen mit hoher Effektivität zu immortalisieren, das heißt ein permanentes Zellwachstum zu induzieren und aufrecht zu erhalten. Außerdem können latent infizierte periphere B-Zellen in Zellkultur spontan zu lymphoblastoiden Zelllinien (lymphoblastoid cell lines, LCLs) auswachsen. Da es bis jetzt nicht gelang, ein Tiermodell zu etablieren, ist die Viruserforschung auf die etablierten lymphoblastoiden Zelllinien angewiesen.

1.2.1 Die Infektiöse Mononukleose

Die Infektiöse Mononukleose (IM), auch bekannt als Pfeiffersches Drüsenfieber, ist eine benigne, selbstlimitierende, lymphoproliferative Erkrankung. Die klinischen Symptome äußern sich grippeähnlich in Fieber, Tonsilitis, Schwellung von Lymphknoten, Milz und Leber und sind durch die Immunantwort des gesunden Menschen auf die infizierten, proliferierenden B-Zellen und die starke Virusproduktion verursacht. In der akuten Phase der IM ist das Auftreten von bis zu 50% atypischer T-Lymphozyten sowie eine Erhöhung der Zahl infizierter B-Lymphozyten um den Faktor 5000 auf 0,05% aller zirkulierenden B-Zellen (im Vergleich zu klinisch unauffälligen Virusträgern) charakteristisch (Rocchie et al., 1977).

1.2.2 Das Nasopharyngealkarzinom

Das Nasopharyngealkarzinom (NPC) ist ein undifferenzierter maligner Tumor der Epithelzellen des Nasenrachenraumes. Der Tumor zeigt eine weltweite Verbreitung, jedoch tritt er in Südostasien mit einer hundertfach erhöhten Inzidenz auf. Es erkranken hauptsächlich Männer im Alter von 40 bis 50 Jahren mit etwa 20 Erkrankungen pro 10^5 Personen und pro Jahr in China und Südostasien. NPC ist somit die häufigste Tumorerkrankung bei Männern in diesem Gebiet. Bei Frauen gilt NPC in dieser Region als zweithäufigste Tumorerkrankung (Clifford et al., 1970). In allen Biopsien undifferenzierter NPCs konnte EBV-DNA nachgewiesen werden (Zur Hausen et al., 1970; Nonoyama et al., 1973) und die Patienten weisen einen hohen IgA-Antikörpertiter gegen das Virus-Kapsidantigen (Hadar et al., 1986; Henle et al., 1976) auf, was auf eine starke Korrelation zwischen EBV und der Tumorentstehung des NPC hinweist. Jedoch sind auch andere Faktoren wie Lebens- und Umweltbedingungen sowie genetische Prädispositionen für die Tumorigenese relevant, was durch die regional unterschiedliche Inzidenz verdeutlicht wird (Henderson et al., 1976; Hirayama et al., 1981; Ito et al., 1983). In 65% aller Fälle lassen sich neben der Expression von EBNA1 auch die mRNA des latenten Membranproteins LMP1 nachweisen (Raab-Traub et al., 1983; Fahraeus et al., 1988; Smith et al., 1992), so dass sich das Expressionsmuster der viralen Gene in NPC-Zellen dem Latenztyp II zuordnen lässt.

1.2.3 Das Burkitt-Lymphom

Das Burkitt-Lymphom (BL) ist ein schnell wachsendes, malignes, wenig differenziertes B-Zelllymphom monoklonalen Ursprungs. Es tritt in Afrika und an den Küsten Neu-Guineas - den *Plasmodium falciparum*-Malariagebieten - endemisch auf mit bis zu 10 Fällen pro 10^5 Personen und pro Jahr. Betroffen sind hier vor allem Kinder im Alter von 7 bis 9 Jahren. Die endemische Form der Erkrankung manifestiert sich hauptsächlich in Tumoren des Kiefer- und Gesichtsbereichs oder des Abdomens. In 96% dieser BL-Biopsien ist EBV-DNA nachweisbar (Geser et al., 1983) und die Patienten zeigen hohe Antikörpertiter gegen EBV. Die in den USA und in Europa beschriebene sporadische Form des BL unterscheidet sich bezüglich des Zeitpunktes des Auftretens und des Verlaufs von der endemischen Form. Hauptsächlich

erkrankt sind hierbei Erwachsene wobei das Knochenmark mitbeteiligt ist. Diese Form weist lediglich eine 20-60%ige Assoziation mit EBV auf, wodurch ein kausaler Zusammenhang zwischen Virusinfektion und BL-Tumorigenese fraglich erscheint (Geser et al., 1983; Lindahl et al., 1974). Eine weitere Immundefizienz-assoziierte BL-Form wurde im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild AIDS beschrieben. Allen Formen des BL sind charakteristische Chromosomentranslokationen gemeinsam. EBV-positive BL exprimieren nur EBNA1 und die EBER1- und EBER2-Transkripte (EBV encoded small RNAs) (Rowe et al., 1987) -sie werden daher dem Latenztyp I zugeordnet.

1.2.4 Das Hodgkin-Lymphom

Das Hodgkin Lymphom (Morbus Hodgkin, Hodgkin`s Disease, HD) ist ein weltweit verbreiteter maligner Tumor des Lymphsystems. HD stellt eine der häufigsten Lymphomerkkrankungen der westlichen Industrienationen dar, wobei vor allem Personen im Alter von 25-30 Jahren sowie um das 45. Lebensjahr betroffen sind. Charakteristisch für HD ist das Vorkommen großer, aneuploider, maligner Reed-Sternberg-Zellen (RS cells), die etwa 1% der Tumormasse ausmachen. In 60% aller HD-Fälle kann EBV-DNA in Biopsien nachgewiesen werden (Deacon et al., 1993; Knecht et al., 1991; Uccini et al., 1990), so dass auch hier von einem kausalen Zusammenhang ausgegangen werden kann. Das Expressionsmuster der viralen Gene ist dem Latenztyp II zuzuordnen, da neben EBNA1 (Grässer et al., 1994) in 40-50% der Reed-Sternberg-Zellen auch das latente Membranprotein LMP1 nachgewiesen werden kann (Pallesen et al., 1991; Herbst et al., 1991). Trotz des EBV-Nachweises ist dessen Rolle in der Genese dieser Erkrankung noch ungeklärt.

1.2.5 Immunoblastische B-Zell-Lymphome Immundefizienter

Bei immunologisch gesunden EBV-Trägern wird eine unkontrollierte Proliferation EBV-infizierter immortalisierter B-Zellen durch das zelluläre Immunsystem verhindert. Bei immundefizienten Patienten kann es im Zuge einer EBV-Primärinfektion oder einer EBV-Reaktivierung zur Ausbildung von polyklonalen B-Zell-Lymphomen kommen. Hierbei spielt die Ursache für die Immundefizienz keine Rolle und kann somit sowohl in einer genetisch

bedingten Immunsuppression, in einer HIV-Infektion als auch in einer durch Medikamente verursachten Immunsuppression auf Grund einer Organ- oder Gewebetransplantation liegen. Diese B-Zell-Lymphome können als *in vivo*-Äquivalente lymphoblastoider Zelllinien angesehen werden (Hanto et al., 1981). Einen Sonderfall stellt das XLPS dar, was für X-linked Lymphoproliferative Syndrome steht. Hierbei sind zu 80% Männer betroffen. Die Patienten zeigen keine generalisierte Immundefizienz und erscheinen klinisch unauffällig, jedoch kommt es im Zuge einer EBV-Infektion zu einer massiven Infiltration der Lunge, der Leber, der Nieren und des Knochenmarks mit CD8-positiven T-Zellen, Makrophagen und EBV-infizierten B-Zellen. Dies führt in den meisten Fällen zu Organversagen, und etwa 30% der Patienten entwickeln zusätzlich polyklonale B-Zell Lymphome (Purtilo et al., 1981). Dieser Erkrankung könnte eine gestörte Funktion der natürlichen Killerzellen oder der Bildung EBV-spezifischer cytotoxischer T-Zellen zu Grunde liegen.

1.2.6 T-Zell-Lymphome

Der Nachweis des EBV-Genoms sowie die virale Genexpression in T-Zell-Lymphomen könnten auf eine mögliche Korrelation zwischen dem EBV und der Genese dieser Tumore hinweisen (Jones et al., 1988; Minarovits et al., 1994; Kikuta et al., 1988). T-Zellen exprimieren unter bestimmten Umständen das Oberflächenantigen CD21, das den primären EBV-Rezeptor darstellt. Sie sind somit theoretisch einer EBV-Infektion zugänglich. *In vitro* gelang die Infektion der T-Zelllinie MT-2, die viel CD21 exprimiert (Yoshiyama et al., 1995). Das Expressionsmuster der viralen Gene von infizierten T-Zellen ähnelt dem latent infizierter NPC-Zellen, allerdings werden in T-Zell-Lymphomen neben EBNA1 und LMP1 in einigen Zellen auch EBNA2 in geringem Maße exprimiert (Minarovits et al., 1994).

1.2.7 Orale Haarleukoplakie (OHL)

Bei HIV-Patienten mit starken immunologischen Störungen zeigen sich neben den zuvor beschriebenen EBV-assoziierten B-Zell-Lymphomen auch die für das Krankheitsbild AIDS typischen Läsionen am Zungenrand, die als orale Leukoplakie bezeichnet werden. Auf Grund

der Immundefizienz kommt es in den infizierten Epithelzellen zur unkontrollierten EBV-Replikation und Virusproduktion (Greenspan et al., 1985).

1.3 Das EBV-Genom

Das EBV-Genom war das erste vollständig klonierte und sequenzierte Herpesvirusgenom (Skare et al., 1980; Arrand et al., 1981; Polack et al., 1984). Es liegt im Nukleokapsid des Virions als lineare, doppelsträngige DNA mit einer Größe von 172 kbp vor (Baer et al., 1984). Im Zellkern infizierter Zellen findet man es dagegen entweder als kovalent geschlossenes, episomal replizierendes Molekül (Lindahl et al., 1976) oder die DNA ist in das Wirtsgenom integriert (Henderson et al., 1983). Der GC-Gehalt des Genoms beträgt etwa 60% (Hayward et al., 1977; Pritchett et al., 1975). Die Kopienzahl des Virusgenoms ist zelllinienabhängig und liegt zwischen 2 und 200. Abbildung 2 zeigt das episodale Genom von EBV exemplarisch am Beispiel des „M-ABA“-Stammes. An den Genomenden befinden sich die „terminal repeats“ (TR), etwa 500 bp lange repetitive Sequenzen (Kintner et al., 1979), über welche nach der Infektion die Zirkularisierung des Genoms erfolgt. Vier interne 3,1 kbp lange Sequenzwiederholungen (internal repeats, IR 1-4) unterteilen das Genom in fünf singuläre Bereiche (unique sequences, U 1-5). Zwei weitere konservierte etwa 1 kbp lange direct repeat-Elemente in den Endbereichen von U 2 und U 5, die als rechte und linke Duplikation bezeichnet werden (DL und DR), fungieren als Initiationsstellen für die Genomreplikation während des lytischen Vermehrungszyklus (oriLyt) (Hammerschmidt et al., 1988; Hudewentz et al., 1982). Der Replikationsursprung für die episodale Genomvermehrung während der Latenz (oriP) befindet sich hingegen in der U1-Region (Yates et al., 1984; Rawlins et al., 1985). Die Genomlänge der Epstein-Barr Viren ist wegen der spezifischen Anzahl der verschiedenen Wiederholungseinheiten und der unterschiedlichen Deletionen in einzelnen EBV-Zelllinien ausgesprochen heterogen.

kommt es in einigen dieser Zellen zum lytischen Zyklus, der sich durch eine massive Bildung von Virionen auszeichnet und in der Lyse der Zelle resultiert. Der Prozentsatz der Zellen, die in den lytischen Zyklus übergehen, kann durch verschiedene exogene Stimuli - wie beispielsweise dem Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) oder durch alpha-Immunglobulin-Behandlung - um etwa 10-20% gesteigert werden (Bauer et al., 1982; zur Hausen et al., 1978). Prinzipiell unterscheiden sich lytische und latente Phase in den jeweils aktiven Replikationsursprüngen *oriLyt* und *oriP* sowie hinsichtlich der Expressionsmuster der viralen Proteine.

1.4.1 Die lytische Infektion

Nach der Induktion des lytischen Zyklus zeigt die Wirtszelle die für die Herpesvirus-Replikation typischen cytopathischen Veränderungen. Es erfolgt keine Synthese von Wirtsmakromolekülen mehr (Gergely et al., 1971), das zelluläre Chromatin konzentriert sich am Kernrand, während im Kernzentrum virale DNA synthetisiert wird. Die Nukleokapside werden im Cytoplasma zusammengebaut und in den Zellkern transportiert, in dem die Verpackung der viralen DNA stattfindet. Die Behüllung erfolgt an der inneren Kernmembran. Nach dem Absterben der Wirtszelle kommt es zur Freisetzung der Viruspartikel. Die virale Genexpression erfolgt in einer zeitlich streng regulierten Kaskade. Zu Beginn kommt es zur Transkription der Immediate Early-Gene BZLF-1 und BRLF-1 sowie der Bildung ihrer Genprodukte, den Proteinen Z und R. Das Z-Protein stellt einen Transkriptionsfaktor mit Homologien zu AP1 beziehungsweise der *c-fos/c-jun*-Familie dar (Countryman et al., 1985; Chevallier-Greco et al., 1989; Farrell et al., 1989; Takada et al., 1986), welches den Übergang von der latenten in die lytische Phase vermittelt. Die Transkription von BZLF-1 kann sowohl über den BZLF-1-Promotor als auch über den BRLF-1-Promotor (RP) erfolgen, welcher nach TPA-Induktion durch den zellulären Transkriptionsfaktor Zif268 aktiviert werden kann (Zalani et al., 1995). Die Bindung des Z-Proteins an AP1-ähnliche Sequenzen im Zellkern führt zu einer deutlich verstärkten Transkription von BZLF-1 und BRLF-1 (Chevallier-Greco et al., 1986; Chevallier-Greco et al., 1989; Chavrier et al., 1989; Hardwick et al., 1988). Durch Z und R werden die Promotoren der frühen Gene BHLF-1, BHRF-1 und BALF-2 transaktiviert, was in der Aktivierung des viralen Genoms und der Stilllegung des Wirtsgenoms resultiert. Im Weiteren sind Z und R auch für die Induktion der Expression der späten Antigene gp350, gp200 und m-VCA verantwortlich (Feederle et al., 2000), wobei dies

bei R meist durch Bindung an Enhancer-Elemente stromaufwärts der Erkennsequenz des Z-Proteins geschieht (Chevallier-Greco et al., 1989; Chevallier-Greco et al., 1986). Das Z-Protein bindet auch an regulatorische Sequenzen von oriLyt, wobei es unabhängig von seiner Transaktivierungsfähigkeit als „origin binding protein“ fungiert (Schepers et al., 1993). Unter den frühen lytischen Genen versteht man unter anderem die DNA-Polymerase BALF-5, das DNA-Bindungsprotein BALF-2, die dUTPase BLLF-3, die Ribonukleotidreduktase BORF-2 und BARF-1, die Thymidinkinase BXLf-1 und die alkalische Exonuklease BGLF-5 (Kieff, 1996). Nach der Replikation der viralen DNA erfolgt die Expression der späten lytischen Gene, welche hauptsächlich für virale Strukturproteine, wie das Tegumentprotein BNRF-1 (p143), BLLF-1a und b (gp350/220), BXLf-2 (gp85), BALF-4 (gp15) und das Kapsidprotein BcLF-1 (p150) kodieren (Beisel et al., 1985; Kieff et al., 1996).

Die für das Eindringen des Virus in die Wirtszelle wichtigen Glykoproteine gp220 und gp350 gehören zu den späten Membranantigenen (Tanner et al., 1988) und sind für die Entwicklung von Impfstoffen von Bedeutung (Müller-Lantzsch, 1985; Epstein et al., 1985).

1.4.2 Die latente Infektion

Mit dem Begriff „Latenz“ wird die symptomlose Persistenz des Erregers im Wirtsorganismus beziehungsweise die Persistenz des viralen Genoms in der Wirtszelle, ohne dass es zur lytischen Replikation kommt, in der Zellkultur beschrieben. Während in lytisch infizierten Zellen 90% der viralen Gene aktiv sind, werden in latent infizierten Zellen *in vitro* nur elf virale Gene exprimiert. Sechs dieser Gene kodieren für Kernproteine, die als sogenannte Epstein-Barr Virus nukleäre Antigene (EBNAs) -1, -2, -3A, -3B, -3C und LP („leader protein“) bezeichnet werden. Zwei von ihnen kodieren für kleine nicht polyadenylierte RNAs (EBV-encoded small RNAs, EBER-1, -2) und drei von ihnen für die latenten Membranproteine LMP-1, -2a und -2b. Man unterscheidet anhand der Expression der latenten Genprodukte hauptsächlich drei Latenztypen. Beim Latenztyp I werden neben EBNA-1 lediglich die Transkripte EBER-1 und EBER-2 produziert (Rowe et al., 1987). Dies ist der einzige Latenztyp, der keine zytotoxische T-Zellantwort induziert (Trivedi et al., 1991). Beim Latenztyp II werden EBNA-1, LMP-1, -2A und -2B exprimiert. Dieser Latenztyp ist charakteristisch für Nasopharyngealkarzinome und Hodgkin-Lymphome (Raab-Traub et al., 1983; Fahraeus et al., 1988; Young et al., 1988). Der Latenztyp III, der insbesondere *in vitro* bei lymphoblastoiden Zelllinien und in polyklonalen B-Zell-Lymphomen unter

Immunsuppression auftritt, zeigt alle elf latenten Genprodukte. Die Existenz eines weiteren Latenztyps (Typ 0), bei welchem lediglich LMP-2A und die EBER-Transkripte produziert werden, wird diskutiert (Miyashita et al., 1997).

1.5 *micro RNAs (miRNAs)*

Micro RNAs sind endogene 19-25 Nukleotiden (nt) lange RNAs, die wichtige regulatorische Funktionen im Stoffwechsel von Pflanzen und Tieren innehaben (Ambros, Bartel et al., 2003; Bartel 2004; Cullen 2004) - hierzu zählen Embryonalentwicklung, Hormonsekretion, Metabolismus, Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose (Baehrecke et al., 2003; Mattick et al., 2005; Xu et al., 2004). Sie spielen außerdem eine wichtige Rolle in der Pathologie verschiedener Krankheiten. Im Weiteren können miRNAs sowohl als Tumorsuppressoren als auch als Onkogene wirken (Chan et al., 2005; Cimmino et al., 2005; Esquela-Kirscher et al., 2006; Kluiver et al., 2005). Die Einflussnahme der mi RNAs geschieht durch Schneiden der Ziel-mRNAs oder durch translationale Repression. Der Ursprung der micro RNAs befindet sich in zellulären oder viralen, genomischen Loci. Sie werden aus Transkripten prozessiert, die lokale Haarnadel-Strukturen ausbilden, wobei stets ein Intermediat gebildet wird, das eine Duplex aus miRNA und der dazu nahezu komplementären, sogenannten miRNA* bildet. In verwandten Organismen zeigt sich fast immer eine Konservierung der miRNA-Sequenz. Im Folgenden wird auf die Entdeckung, die genomische Organisation und Expression, die Biogenese sowie auf Mechanismus und Funktion der microRNAs genauer eingegangen.

1.5.1 Die Entdeckung der microRNAs

Im Jahr 1993 fand man heraus, dass *lin-4* - ein Gen, das die zeitliche Regulation des Übergangs vom ersten zum zweiten Larvalstadium bei *C. elegans* steuert - nicht wie vermutet für ein Protein (Lee, Feinbaum et al., 1993), sondern für zwei kleine RNAs von 21 nt und 61 nt Länge kodiert. Für die größere RNA wurde eine stem-loop Struktur vorhergesagt, welche als Vorläufer für die kleinere RNA dienen sollte. Diese *lin-4* RNAs wiesen Komplementarität zu mehreren Abschnitten der 3'UTR des *lin-14* Gens auf. Frühere Experimente hatten gezeigt,

dass der komplementäre Bereich der 3'UTR die Repression von *lin-14* durch das *lin-4* Genprodukt vermittelt (Wightman, Burglin et al., 1991). Die Expression der microRNAs führt zu einer Reduktion der LIN-14 Proteinmenge, während die *lin-14* mRNA-Menge konstant bleibt. Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde ein Modell aufgestellt, nach dem diese neu entdeckten kleinen RNAs an die komplementären Stellen innerhalb der 3'UTR binden, um eine translationale Repression zu vermitteln. Daher gilt die kürzere *lin-4* RNA als Gründer einer neuen, in großer Zahl vorkommenden Klasse regulatorischer RNAs, die den Namen „micro RNAs“ oder „miRNAs“ erhalten haben (Lagos-Quintana, Rauhut et al., 2001; Lau, Lim et al., 2001; Lee and Ambros 2001). Erst sieben Jahre nach der Entdeckung der *lin-4* RNAs wurde eine weitere 22 nt lange RNA identifiziert, die vom Gen *let-7* kodiert wird und ebenfalls eine regulatorische Funktion bei der Larvalentwicklung von *C. elegans* besitzt (Slack, Basson et al., 2000; Reinhart und Bartel 2002). Die *let-7* RNA ist evolutionär konserviert, sie konnte im Menschen, in *Drosophila* und in elf weiteren bilateralen Tieren nachgewiesen werden (Pasquinelli, Reinhart et al., 2000). In Abbildung 3 sind die *lin-4* und *let-7* microRNAs zu sehen. Mit Hilfe der Klonierung kleiner RNAs konnten im Laufe der Zeit immer mehr microRNA kodierende Gene im Genom von Säugetieren, Fischen, Würmern und Fliegen nachgewiesen werden (Lagos-Quintana, Rauhut et al., 2002; Mourelatos et al., 2003; Houbaviy, Murray et al., 2003; Lim, Glasner et al., 2003; Lim, Lau et al., 2003), welche teilweise hochkonserviert auch zwischen weit entfernten Spezies vorliegen. Zu über einem Drittel aller microRNA-Gene von *C. elegans* konnte ein Homolog im Menschen gefunden werden (Lim, Glasner et al., 2003).



Abb. 3: Struktur der Vorläufer der lin-4 und let-7 miRNAs

Vorläufer (pre-miRNAs) der microRNAs lin-4 und let-7. Die reifen miRNAs sind rot dargestellt. Entnommen aus: Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2002

1.5.2 Die Genomische Organisation und Expression von micro RNAs

Da die meisten microRNA-Gene in großer Distanz (größer 1kb) zu anderen Genen im Genom liegen, werden sie vermutlich als eigene unabhängige Transkriptionseinheiten exprimiert (Lagos-Quintana, Rauhut et al., 2001; Lau, Lim et al., 2001; Lee and Ambros 2001). Ungefähr ein Viertel der humanen microRNA-Gene liegen meist in gleicher, seltener in entgegengesetzter Orientierung in Introns anderer Gene. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese microRNA-Gene aus den Introns prozessiert werden und keinen eigenen Promotor besitzen, ähnlich wie bei den snoRNAs (small nucleolar RNAs) (Aravin, Lagos-Quintana et al., 2003; Lagos-Quintana, Rauhut et al., 2003; Lai, Tomancak et al., 2003; Lim, Glasner et al., 2003). Man geht davon aus, dass ein Protein exprimiert und gleichzeitig eine microRNA aus dem Intron gebildet wird, die ein anderes - zum Beispiel ein dem synthetisierten Protein entgegenwirkendes Protein - herunterreguliert. MicroRNA-Gene können auch Gencluster bilden, und die hierbei gebildeten microRNAs gehen aus einem multicistronischen Primärtranskript hervor (Lagos-Quintana, Rauhut et al., 2001; Lau, Lim et al., 2001). MicroRNA-Gencluster kommen jedoch bei Menschen und Würmern selten vor (Lim, Glasner et al., 2003; Lim, Lau et al., 2003), wohingegen über die Hälfte aller Drosophila microRNA-

Gene als Cluster vorliegen (Aravin, Lagos-Quintana et al., 2003). Solche organisierte microRNAs regulieren oft Proteine, die in engem Zusammenhang stehen oder ähnliche Funktionen erfüllen (Lagos-Quintana, Rauhut et al., 2001; Lau, Lim et al., 2001). Auf Grund neuerer Untersuchungen kann man die microRNA-Gene in drei Gruppen aufteilen: exonische microRNAs in nicht-kodierenden Transkriptionseinheiten, intronische microRNAs in nicht-kodierenden Transkriptionseinheiten und intronische microRNAs in Protein-kodierenden Transkriptionseinheiten (Rodriguez, Griffiths-Jones et al., 2004). Die microRNAs zeigen ein vielfältiges Expressionsmuster, angefangen von der stadiumspezifischen Expression von *lin-4* und *let-7* Homologen und Orthologen während der Entwicklung (Pasquinelli, Reinhart et al., 2000; Lau, Lim et al., 2001; Lagos-Quintana, Rauhut et al., 2002; Bashirullah, Pasquinelli et al., 2003; Glasner et al., 2003) bis hin zur zelltypspezifischen Expression von miR-1 im Säugerherz und miR-122 in der Leber (Lagos-Quintana, Rauhut et al., 2002). Es ist davon auszugehen, dass jeder Zelltyp zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Entwicklung ein spezifisches microRNA-Expressionsprofil aufweist. Die Menge an microRNA-Molekülen pro Zelle variiert sehr stark; so reicht sie bei *C. elegans* von etwa 800 Molekülen pro Zelle bis zu 50.000 pro Zelle (Lim, Lau et al., 2003). MicroRNAs gehören zu einer der größten Genfamilien und machen etwa 1% der exprimierten Gene höherer Eukaryoten aus (Bartel 2004). Mit Hilfe von Computerprogrammen wurde die Anzahl von microRNA-Genen für das menschliche Genom auf 200 – 255 geschätzt (Lim, Glasner et al., 2003), jedoch liegt die Anzahl der heute bekannten schon weit über diesem Wert.

1.5.3 Die Biogenese der microRNAs

Wie genau die reife microRNA prozessiert wird, ist zur Zeit noch nicht vollständig erforscht. Die einzelnen Schritte der Biogenese der microRNAs sind in Abbildung 4 zusammengefasst. Die primären Transkripte werden als primary microRNA (pri-miRNA) bezeichnet (Lee, Jeon et al., 2002), bestehen meist aus mehreren Kilobasen und besitzen eine lokale Haarnadel-Struktur. Sie zeigen den typischen Poly-A-Schwanz am 3'Ende sowie ein 7-Methylguanosin-Cap am 5'Ende. Noch im Kern wird die entstandene pri-miRNA prozessiert, wobei die RNA Endonuklease III Droscha ein 60 – 70 nt langes stem-loop Intermediat ausschneidet, das als microRNA precursor oder kurz als pre-miRNA bezeichnet wird (Lee, Jeon et al., 2002; Zeng and Cullen 2003). Dieser Schnitt durch Droscha erfolgt ungefähr zwei helikale Windungen (ungefähr 22nt lang) vom terminalen loop entfernt (Zeng, Yi et al., 2005) und es entsteht eine

pre-miRNA mit einem 5'Phosphatende und einem 2 nt 3'Überhang (Basyuk, Suavet et al., 2003; Lee, Ahn et al., 2003). Zusammen mit dem Co-Faktor DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) Protein bildet Drosha einen ungefähr 650 kDa großen Komplex, der als Microprozessor complex bezeichnet wird (Gregory, Yan et al., 2004; Han, Lee et al., 2004). Es ist im Moment noch unbekannt, wie dieser Komplex sein Substrat, die pri-microRNAs, erkennt. Der microRNA-Vorläufer wird aktiv durch Ran-GTP und den Export-Faktor Exportin-5 aus dem Kern in das Cytoplasma transportiert (Lund, Guttinger et al., 2004) und dort durch eine weitere Endonuklease III, dem sogenannten Dicer (DCR) etwa zwei helikale Windungen nach der ersten Base des Doppelstrangs geschnitten (Lee, Ahn et al., 2003). Auch hier wird ein 5'Phosphatende und ein 2 nt 3'Überhang erzeugt. Nach der Spaltung durch Dicer liegt nun eine siRNA-ähnliche Duplex-Struktur vor, die aus der reifen miRNA und einem dazu nahezu komplementären, als microRNA* bezeichneten Strang besteht (Lau, Lim et al., 2001). Dicer interagiert mit dem ds-RNA-Bindeprotein TRBP, wodurch das miRNA-Duplex entwunden und einzelsträngig wird. Dies beginnt an dem Ende mit der geringeren thermodynamischen Stabilität. Abhängig davon bildet der miRNA-Strang mit dem 5'Terminus an seinem Ende die reife miRNA, die auch als guide miRNA bezeichnet wird. Der weitere Prozessierungsweg ähnelt stark dem Pathway der RNAi, und es sind zum großen Teil identische Proteine daran beteiligt. Die einzelsträngige miRNA wird in einen Ribonukleoproteinkomplex, der als miRNP (miRNA-containing ribonucleoprotein complex), miRonaute oder miRISC (miRNA-containing RNA-induced silencing complex) bezeichnet wird, eingebaut. Beim Menschen besteht dieser aus den Proteinen eIF2C2, einem humanen Argonaut Homolog sowie der Helikase Gemin3 und Gemin4 (Mourelatos, Dostie et al., 2002). Die Komplexbildung von miRNA und RISC wird durch DCR initiiert und erfolgt stufenweise über einen RISC-loading complex (RLC), dessen genauer Aufbau noch unbekannt ist. Viele bisher durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, dass die Regulation der miRNA-Biogenese unter der Kontrolle von Entwicklungs- und Gewebe-spezifischen Signalwegen steht (Lagos-Quintana, Rauhut et al., 2002; Aravin, Lagos-Quintana et al., 2003; Krichevsky, King et al., 2003; Sempere, Sokol et al., 2003; Barad, Meiri et al., 2004; Calin, Liu et al., 2004; Miska, Alvarez-Saavedra et al., 2004; Schmittgen, Jiang et al., 2004; Sempere, Freemantle et al., 2004). Es ist zur Zeit noch unklar, wie und auf welchen Stufen der Biogenese diese Regulation vollzogen wird.

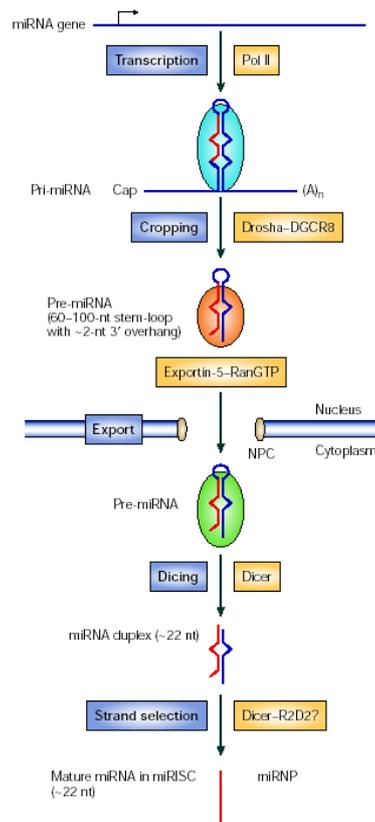


Abb. 4: Modell der miRNA Biogenese (Kim 2005)

Die pri-miRNA wird im Kern prozessiert; Drosha schneidet ein 60-70 nt langes stem-loop Intermediat (=pre-miRNA) heraus. Zusammen mit DGCR8 bildet Drosha den Microprozessor complex. Der microRNA-Vorläufer wird aus dem Kern in das Cytoplasma transportiert. Durch Dicer-Spaltung entsteht die miRNA und die miRNA*. Die miRNA wird stufenweise über einen RISC-loading complex in den RISC eingebaut.

1.5.4 Wirkungsmechanismus und Funktion der microRNAs

Die posttranskriptionelle Runterregulierung der Genexpression durch den miRNP kann auf zwei verschiedenen Wegen ablaufen: Zum einen durch Spaltung und Degradierung der mRNA und zum anderen durch translationale Repression. Welcher Mechanismus abläuft, ist abhängig vom Ausmaß der Sequenzkomplementarität von miRNA und mRNA. Beide Mechanismen sind in Abbildung 5 dargestellt. Liegt eine vollständige Sequenzkomplementarität zwischen 3'UTR- Bereichen der mRNA und der miRNA vor, kommt es zur Spaltung der Ziel-mRNA. Dies ist identisch mit dem Mechanismus, der bei siRNAs beobachtet wird. Hierbei erfolgt die Spaltung der mRNA zwischen Position zehn und elf vom 5' Ende der miRNA, unabhängig von der Länge der miRNA (Elbashir, Martinez et al., 2001; Hutvagner and Zamore 2002). Die microRNA wird dabei nicht verändert und kann

daher weitere Ziel-mRNAs binden und zu deren Spaltung führen (Hutvagner and Zamore 2002). Bei ungenügender Komplementarität zwischen miRNA und 3'UTR-Bereichen der mRNA erfolgt eine translationale Repression. Dies bedeutet, dass die Proteinmenge bei gleichbleibender mRNA-Menge abnimmt, während sich das Polysomenprofil nicht ändert (Olsen and Ambros 1999; Seggerson, Tang et al., 2002). Eine kooperative Wirkung von mehreren RISCs scheint wahrscheinlich, da häufig mehrere zu den miRNAs komplementäre Bereiche in den 3'UTRs der mRNAs von Metazoen vorhanden sind (Reinhart, Slack et al., 2000; Abrahante, Daul et al., 2003; Lin, Johnson et al., 2003). Daher liegt die Vermutung nahe, dass bei den microRNA-vermittelten Runterregulierungen wie bei anderen biologischen Systemen eine kombinatorische Kontrolle üblich ist. In der Erkennung der Ziel-mRNA spielt die Komplementarität zum 5' Bereich der miRNA eine besondere Rolle (Wightman, Ha et al., 1993). Man fand zwischen mRNAs von Invertebraten und orthologen mRNAs anderer Spezies eine Konservierung von Basenpaaren der Zielsequenz, die zur Position 2-8 der miRNA komplementär sind. Die Wirkungsmechanismen der miRNAs und der sogenannten small interfering RNAs (siRNAs) zeigen Parallelen. Auch die siRNAs werden von der RNase Dicer aus langen doppelsträngigen RNAs prozessiert und danach als 21 bis 28 nt lange einzelsträngige RNAs in den siRISC eingebaut. Dieser Komplex vermittelt die mRNA-Degradation in tierischen Zellen (Okamura et al., 2008).

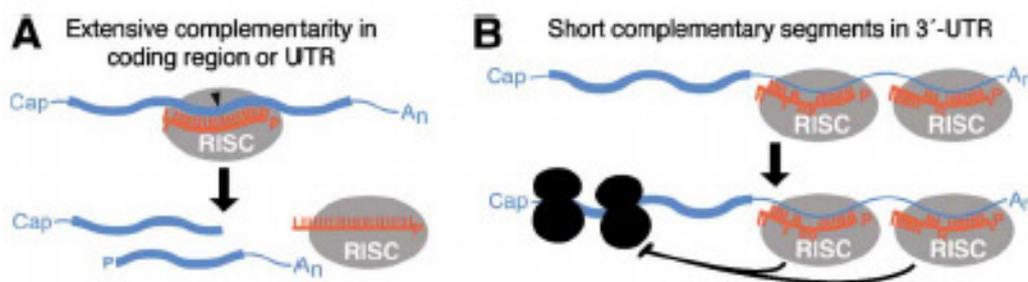


Abb. 5: Posttranskriptionelle Regulierung durch microRNAs (Bartel 2004)

- A) mRNA-Spaltung, vermittelt durch miRNA: bei hoher Komplementarität zwischen miRNA und Target
- B) translationale Repression, vermittelt durch miRNA: wenn Komplementarität nur in kurzen Sequenzen vorliegt

MicroRNAs wirken als negative Regulatoren auf der posttranskriptionellen Ebene. Um die Ziel-mRNAs der microRNAs zu identifizieren, wurden Computer-gestützte Methoden

entwickelt (Enright, John et al., 2003; Lewis, Shih et al., 2003; Stark, Brennecke et al., 2003), die nach multiplen, konservierten Regionen der 3'UTR mit Komplementarität zu den microRNAs suchen. Dies gestaltet sich bei Säugetieren schwierig, da nur wenige mRNAs mit vollständiger Komplementarität vorkommen und dadurch die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse steigt. Da die Konservierung als Kriterium für die Identifikation benutzt wird, kann diese zur Validierung der Ergebnisse nicht mehr genutzt werden. Probleme treten auf, wenn eine angemessene Komplementarität vorliegt, die mRNAs jedoch nicht konserviert sind. Neben der Stabilität der Basenpaarungen stellt sich hier die Frage nach einer weiteren möglichen Determinante für die Spezifität. Es besteht die Möglichkeit, dass Proteine oder mRNA-Sekundärstrukturen einen wesentlichen Einfluss auf die Zugänglichkeit der 3'UTR durch miRNPs ausüben. Nach neuesten Erkenntnissen wurde für den Menschen vorhergesagt, dass über ein Drittel aller Gene potentielle Ziele für miRNAs darstellen (Lewis, Burge et al., 2005). Die Ziel-mRNAs für einige zelluläre miRNAs wurden schon ermittelt.

1.6 Die EBV-kodierten microRNAs und ihre Zielgene

1.6.1 Die fünf 2004 entdeckten EBV-microRNAs

Im Jahre 2004 wurden die ersten viralen microRNAs nachgewiesen (Pfeffer, Zavolan et al., 2004). Kleine RNA-Spezies wurden aus einer Burkitt-Lymphom Zelllinie, die latent mit EBV infiziert wurde, kloniert und fünf verschiedene EBV-kodierte microRNAs wurden identifiziert (Pfeffer, Zavolan et al., 2004), deren stem-loop Strukturen in Abbildung 6 zu sehen sind. Die EBV-kodierten microRNAs sind, wie in Abbildung 7 dargestellt, in zwei Clustern auf dem EBV-Genom angeordnet. Das erste Cluster liegt innerhalb des BHRF-1-Gens (BamH1 fragment H rightward open reading frame 1), welches für ein virales Homolog des zellulären anti-apoptotischen Bcl-2 Proteins kodiert. Die miR-BHRF1-1 liegt in der 5'UTR, die miR-BHRF1-2 und 1-3 liegen in der 3'UTR des Gens und werden in antisense zu diesem transkribiert. Das zweite Cluster - welches von den beiden anderen EBV-kodierten miRNAs, miR-BART1 und miR-BART2 gebildet wird - liegt in Introns des Gens BART (BamH 1-A region rightward transcript), dessen Funktion noch unbekannt ist. Die Expression der BART miRNAs konnte in allen latenten Zuständen nachgewiesen werden, allerdings wurde eine zehnfach höhere Expression in einer B95-8 Zelllinie des Krallenaffen gefunden, da diese

einen höheren Anteil lytisch infizierter Zellen besitzt (Pfeffer, Zavalon et al., 2004). Die Expression der BHRF1- miRNAs ist dagegen abhängig vom Latenzstadium: sie werden im Latenzstadium II und III stets exprimiert, aber im Latenzstadium I nur in etwa 50% der Fälle (Pfeffer, Zavalon et al., 2004). Auf Grund von Computeranalysen wurden für die neuentdeckten miRNAs mögliche Ziel-mRNAs vorhergesagt. Die meisten dieser Ziele besitzen mehrere Bindestellen für die EBV-microRNAs, und etwa 50% besitzen zusätzliche Bindestellen für zelluläre miRNAs. Unter die Ziele fallen Regulatoren der Zellproliferation und der Apoptose, B-Zell-spezifische Chemokine und Cytokine sowie Transkriptionsfaktoren und Komponenten von Signaltransduktionswegen. Die miR-BART2 induziert die mRNA-Spaltung der viralen DNA-Polymerase BALF5 (Barth et al., 2008). Die miR-BART2 wird antisense zum BALF5 -Transkript abgelesen und weist somit eine perfekte Komplementarität zur BALF5-3'UTR auf. Außerdem wurde bei früheren Studien eine verkürzte BALF5 mRNA charakterisiert, deren 3'-Ende genau mit der vorhergesagten Schnittstelle übereinstimmt (Furnari, Adams et al., 1993). Für die microRNAs miR-BHRF1-2 und miR-BHRF1-3 wurde als Ziel-mRNA die 3'UTR von BFLF2 vorhergesagt, die mehrere potentielle Bindungsstellen für diese beiden microRNAs besitzt. Die beiden microRNAs sind auf dem BFLF2-Gegenstrang kodiert. Das BFLF2-Protein wird früh während der lytischen Infektion exprimiert. Es ist zusammen mit dem BFRF1-Genprodukt an der Umhüllung der Viruskapside an der Kernmembran beteiligt (Gonella, Farina et al., 2005).

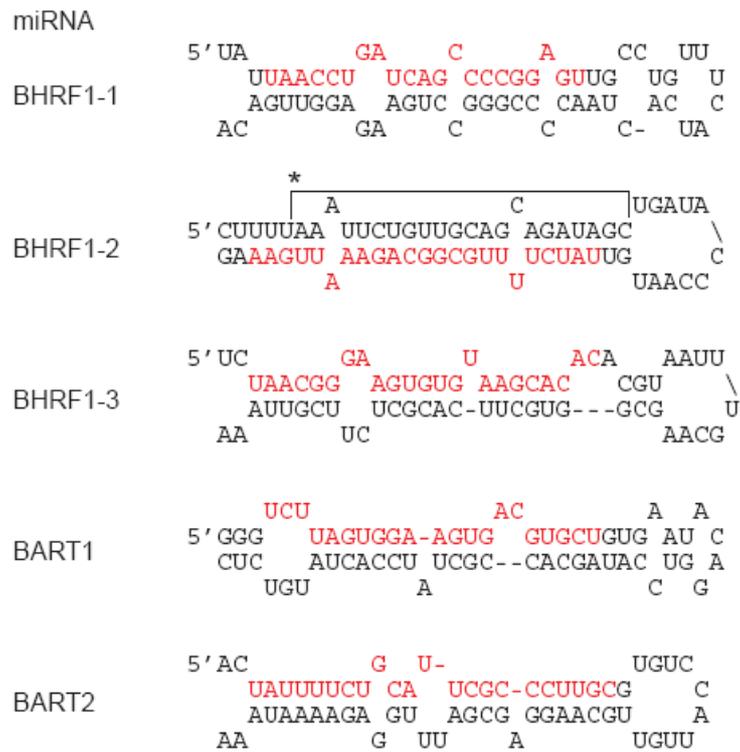


Abb. 6: EBV-kodierte miRNAs

Stem-loop Strukturen der fünf EBV-kodierten pre-miRNAs. Die reifen miRNAs sind in rot hervorgehoben (Pfeffer, Zavolan et al. 2004).

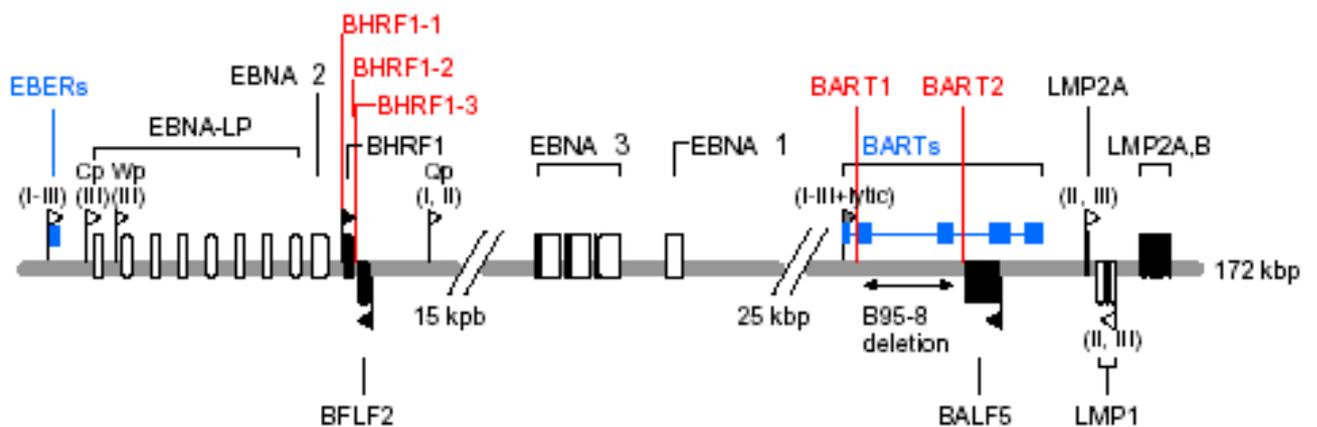


Abb. 7: Lokalisierung der EBV miRNAs im EBV-Genom

Latente Gene sind als weiße, lytische Gene als schwarze Kästchen dargestellt. Nicht-kodierende RNAs sind in blau eingezeichnet, neu entdeckte miRNAs rot markiert. Die Promotoren des latenten Zyklus sind als weiße, die Promotoren des lytischen Zyklus als schwarze, und die Promotoren, die in allen Zyklen aktiv sind, als graue Pfeile gekennzeichnet (Pfeffer, Zavolan et al. 2004).

1.6.2 Die neuentdeckten EBV-microRNAs

Wie oben beschrieben, identifizierten Pfeffer et al., 2004 fünf EBV-kodierte microRNAs. Diese microRNAs wurden aus der humanen BL-Zelllinie BL41/95 isoliert und kloniert, welche mit dem EBV-Isolat B95-8 latent infiziert sind. Das B95-8-Isolat zeigt im Gegensatz zum EBV-Wildtyp eine beinahe 12kbp große Deletion, die einen großen Teil des EBV-BART-Gens beinhaltet. 2006 gelang es Cullen et al. in der PEL-Zelllinie BC-1, die sowohl latent mit KSHV als auch latent mit Wildtyp-EBV infiziert ist, 14 neue EBV microRNAs innerhalb des BART-Gens zu identifizieren. Die miR-BART5 bis miR-BART14 sind in der oben beschriebenen Deletion von B95-8 lokalisiert, während die microRNAs miR-BART3 und 4 außerhalb der B95-8-Deletion liegen und möglicherweise von Pfeffer et al. auf Grund ihrer geringen Expression nicht identifiziert wurden. Die Abbildung 8 zeigt die genomische Lokalisation der BART-microRNAs.

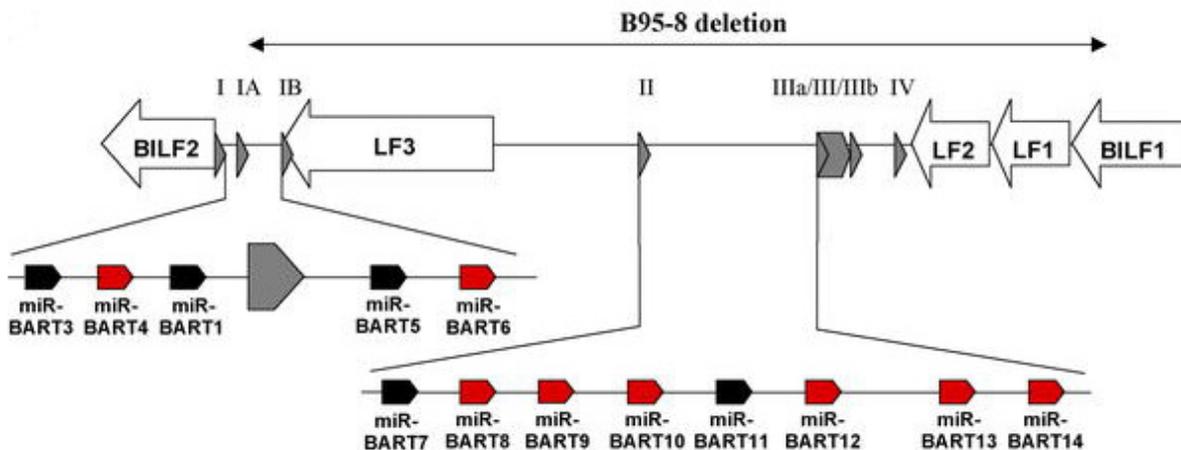


Abb. 8: Die genomische Lokalisation der BART-microRNAs (Cullen et al., 2006)

Schematische Darstellung des Segments des EBV-Genoms von 137490 bis 152641. Gezeigt sind die EBV-Gene, die auf dem antisense Strang lokalisiert sind sowie die BART mRNA Exons des sense Strangs. Im Weiteren ist die Deletion des B95-8-Isolats eingezeichnet. Nicht dargestellt ist die miR-BART2, die im Gegensatz zu den anderen auf dem 3'-Strang lokalisiert ist zwischen Position 152747 und 152768.

Bis heute ist bekannt, dass die EBV miRNAs von zwei Transkripten prozessiert werden – zunächst vom BHRF1-Gen und dann vom BART-Gen aus. 2009 ging man davon aus, dass das BART-Gen für 28 miRNAs, die in zwei verschiedenen Clustern liegen, und das BHRF1-Gen für die bekannten 3 miRNAs kodiert. Das BART-Cluster 1 beinhaltet 11 miRNAs von 8 pre-miRNAs in einer 1 kb Region liegend, während das BART-Cluster 2 für 15 miRNAs von

11 pre-miRNAs in einer 3kb Region kodiert. BART2 liegt in der Nähe des Genomende und kodiert für zwei reife miRNAs (Cai et al., 2006; Grundhoff et al., 2006; Landgraf et al., 2007).

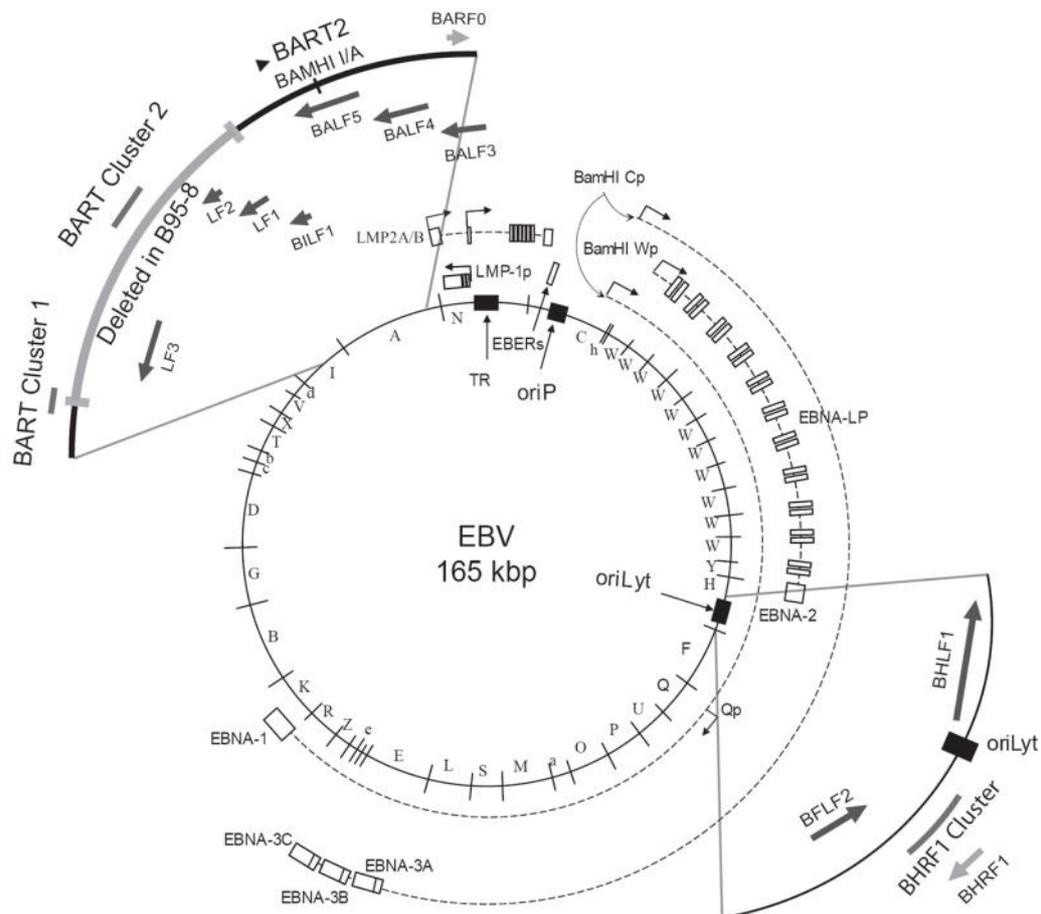


Abb. 9: Die Lokalisation der 2009 bekannten miRNAs (Pratt et al. 2009)

Die EBV miRNAs werden von zwei verschiedenen Transkripten aus prozessiert. Das BHRF1-Gen kodiert in der 5'UTR für die miR-BHRF1-1 und in der 3'UTR für die miR-BHRF1-2 und 1-3. Das BART-Gen kodiert für 28 miRNAs, die in zwei verschiedenen Clustern liegen.

2010 sind bereits 25 pre-miRNAs und daraus resultierende 4 BHRF1-miRNAs sowie 40 BART-miRNAs bekannt.

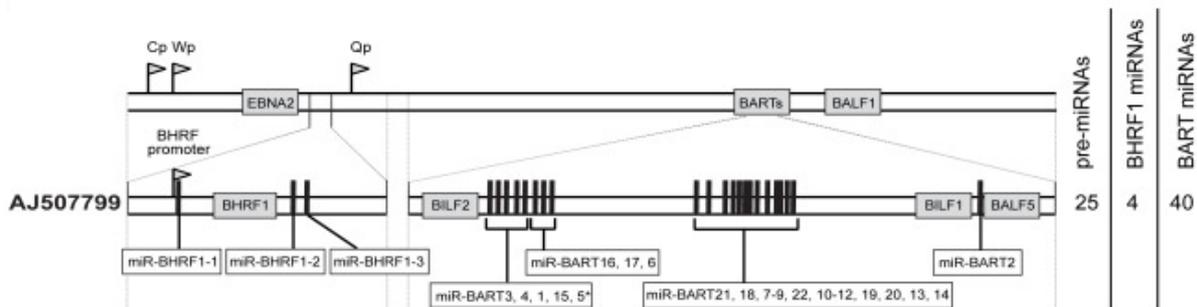


Abb. 10: Schematische Übersicht über die genomische Lokalisation der EBV-miRNAs (Seto et al. 2010)

Hier sind nun die bis 2010 bekannten 40 reifen BART-miRNAs sowie die 4 reifen BHRF1-miRNAs, prozessiert aus 25 pre-miRNAs, abgebildet.

Die Expression der EBV miRNAs ist sehr unterschiedlich. Wie schon oben erwähnt, können die BART miRNAs in allen latenten Zuständen nachgewiesen werden, allerdings wurde eine zehnfach höhere Expression in einer B95-8 Zelllinie des Krallenaffen gefunden, da diese einen höheren Anteil lytisch infizierter Zellen besitzt (Pfeffer, Zavalon et al., 2004). Die Expression der BHRF1- miRNAs ist dagegen abhängig vom Latenzstadium: sie werden im Latenzstadium II und III stets exprimiert, aber im Latenzstadium I nur in etwa 50% der Fälle (Pfeffer, Zavalon et al., 2004). Die Menge der exprimierten BART miRNAs in den verschiedenen EBV-Zelllinien ist sehr unterschiedlich, allerdings ist die Rangfolge ihres Auftretens gleich (Pratt et al., 2009).

EBV ist assoziiert mit 6-16 Prozent der Magenkarzinome weltweit. In diesen sogenannten EBV-assoziierten Magenkarzinomen ist in nahezu allen Tumorzellen EBV vorzufinden. Es konnte gezeigt werden, dass die BART miRNAs in den EBV- assoziierten Magenkarzinomzelllinien exprimiert werden, während die BHRF1 miRNAs nicht zu finden waren (Kim et al., 2006). Im Weiteren ist EBV in allen Nasopharyngealkarzinomzellen auffindbar. Auch hier konnten nur die BART miRNAs gefunden werden, während die BHRF1 miRNAs nicht exprimiert werden (Zhu et al., 2009). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Pathogenese beider Karzinome unabhängig von den BHRF1 miRNA-Expression ist

oder sogar nur in Abwesenheit von den BHRF1- miRNAs abläuft. Auch heute ist noch wenig bekannt über die Funktion der einzelnen miRNAs beziehungsweise über die Funktion eines ganzen Clusters. Durch Versuche mit EBV-Mutanten, die eine Deletion in der 3'UTR von BFLF2 enthalten und somit weder miR-BHRF1-2 noch miR-BHRF1-3 bilden können, konnte Seto et al. zeigen, dass diese Zellen häufiger in Apoptose übergehen. Das zeigt, dass diese beiden miRNAs Apoptose verhindern und die Zellproliferation anregen.

1.7 BamH1F-Region und BFLF2

Die BamH1F-Region, in der sich BFLF2 befindet, wird während der lytischen Replikation transkribiert. In Abbildung 11 ist eine schematische Zeichnung der genomischen Lokalisation der BamH1F-Region im EBV-Genom dargestellt. Diese Region ist innerhalb der Herpesviren stark konserviert.

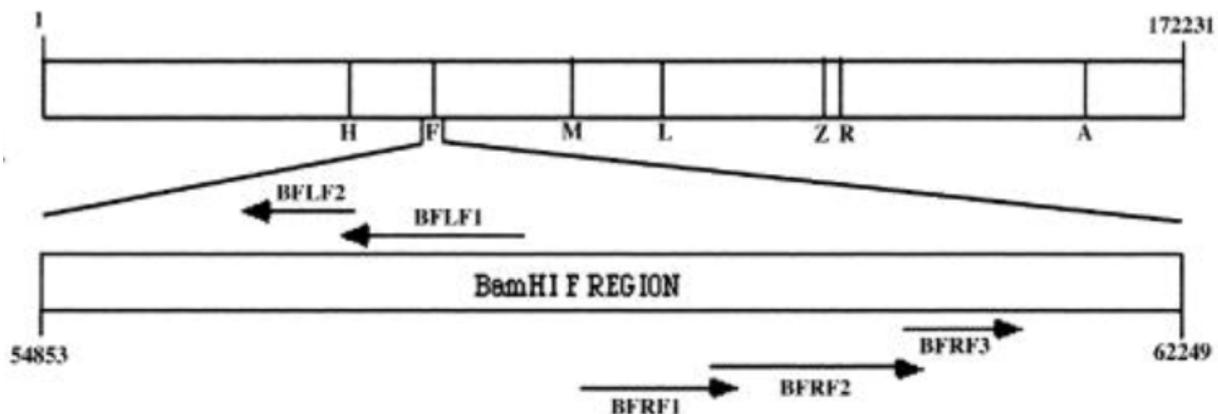


Abb. 11: Schematische Zeichnung der genomischen Lokalisation der BamH1F-Region im EBV-Genom

(Gonella, Farina et al., 2005)

Mit Hilfe von Computeranalysen wurden zwei linke (BFLF1 und BFLF2) und drei rechte Open Reading Frames (BFRF1, BFRF2 und BFRF3) postuliert. Das BFRF1-Gen ist das EBV-Positionshomolog zu UL34 vom Herpes-Simplex Virus Typ 1 und vom Pseudotollwut-Virus. Es wird früh im lytischen Zyklus exprimiert und ist wie sein Homolog in der Kernmembran lokalisiert, vorzugsweise in Gebieten, wo die Knospung der Kernkapside stattfindet (Farina et al., 2000). BFRF1 ist beteiligt an dem Transport reifer Virionen durch

die Kernmembran und stellt als strukturelle Komponente der viralen Partikel ein Schlüsselprotein für die EBV-Reifung dar (Farina et al., 2000).

Der Übergang von der Latenz in den lytischen Zyklus kann durch verschiedene pleiotrope Stimuli wie zum Beispiel Phorbol ester oder Sodium butyrate angeregt werden. Aber auch die beiden Transaktivatoren BZLF1 und BRLF1, die beide zu den immediate-early Genen gehören, können den Übergang bewirken. BRLF1 codiert für Rta (Farina et al., 2004). Die Transfektion von ZEBRA, dessen Expression durch BZLF1 angeregt wird (Countryman, Miller et al., 1985), stimuliert die BFRF1-Expression, außerdem wurde sowohl eine ZEBRA- als auch eine Rta-empfindliche BFRF1-Promotorregion gefunden (Granato, Farina et al., 2006), was auf eine Beteiligung von BFRF1 beim Übergang von Latenz zu lytischem Zyklus hinweist.

Die Replikation und der Nukleokapsidaufbau der Herpesvirus DNA findet im Nukleus statt. Um in den Extrazellularraum zu gelangen, müssen Herpesviren mehrere zelluläre Membranen überwinden. Zwei Herpesvirusproteine, die Genprodukte von UL34 und UL31, spielen eine wichtige Rolle bei der primären Virusentwicklung, welche charakterisiert ist durch den Durchgang durch die innere Kernmembran (Mettenleiter, 2002). Beide gemeinsam sind an der Kernumhüllung, die den ersten Schritt der viralen Reifung darstellt, beteiligt. UL34 und UL31 sind bei verschiedenen humanen und tierischen Herpesviren, wie zum Beispiel Herpesvirus simplex Typ 1 (HSV-1), Pseudotollwutvirus (PrV), murines Cytomegalovirus und equines Herpesvirus Typ 1 (Fuchs, Klupp et al., 2002; Granzow, Wieland et al., 1997; Klupp, Granzow et al., 2000; Muranyi, Haas et al., 2002; Neubauer, Rudolph et al., 2002; Reynolds, Ryckman et al., 2001; Shiba, Daikoku et al., 2000; Yamauchi, Shiba et al., 2001) konserviert. EBV besitzt als UL31-Homolog BFLF2. Auch hierbei handelt es sich um ein frühes Transkript, das in einer Vielzahl von Zelllinien nach Aktivierung des lytischen Zyklus nachgewiesen werden konnte (Gonella, Farina et al., 2004). Wie auch bei UL31, handelt es sich um ein Phosphoprotein (Gonella, Farina et al., 2004). BFLF2 stellt einen Baustein von intrazellulären Virionen dar, der in ausgereiften extrazellulären Virionen nicht mehr nachweisbar ist. Ähnlich wie bei ihren Homologen UL34 und UL31 interagieren auch BFLF2 und BFRF1 (Gonella, Farina et al., 2004). Die beiden Proteine colokalisieren an der Kernmembran sowohl nach Cotransfektion als auch in EBV-infizierten Zellen. In Versuchen mit EBV-positiven Zellen, die auf Grund einer Mutation kein BFRF1 exprimieren, konnte gezeigt werden, dass die BFLF2-Expression hier wesentlich geringer ist als bei Wildtypzellen. BFLF2 liegt ohne BFRF1 diffus im Kern verteilt vor, während es bei BFRF1-Präsenz zusammen mit diesem Protein in der Kernmembran colokalisiert vorliegt. Dies entspricht

auch den Ergebnissen, die durch Immunoblot-Analysen bei HSV-1 und den zu den oben genannten Proteinen Homologen UL34 und UL31 gefunden werden konnten (Ye, Roizman et al., 2000). Mit Hilfe von Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass BFRF1 zur Verdopplung der Kernmembran führt, was auch beim Ablauf der Herpesvirusreplikation auftritt. Obwohl BFLF2 alleine keine offensichtlichen Veränderungen verursacht, führen die beiden Proteine zusammen zur Bildung von Ausstülpungen der verdoppelten Kernmembran. Die Funktion des BFRF1-BFLF2-Komplexes ist immer noch unbekannt, jedoch ergeben sich durch seine intrazelluläre Lokalisation sowie durch Homologien zu anderen Herpesviren Hinweise auf die Funktion. Die durch BFRF1 induzierte Verdopplung der Kernmembran deutet darauf hin, dass der BFRF1-BFLF2-Komplex entweder direkt oder durch Bindung an weitere Kernproteine - wie zum Beispiel emerin, LAP2 oder MAN1 - an der Brückenbindung zwischen Kernmembran und Lamina im Prozess der Kernmembranwiederorganisation beteiligt ist. Muranyi et al. zeigte, dass M50/p35 und M53/p38, welche die Homologe zu BFRF1 und BFLF2 im Maus Cytomegalovirus darstellen, copräzipitieren und außerdem konnte er beobachten, dass das BFRF1-Homolog zu den oben beschriebenen Veränderungen der Kernmembran führt, während das BFLF2-Homolog diesen Effekt sowohl qualitativ als auch quantitativ moduliert (Muranyi, Haas, Wagner et al., 2002).

Das BFLF2-Protein besitzt ein Molekulargewicht von circa 28 kDa.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

MicroRNAs sind 19-22 Nukleotide (nt) lange RNAs, die sowohl bei Tieren als auch bei Pflanzen wichtige regulatorische Funktionen im Stoffwechsel innehaben. Sie gelten als negative Regulatoren der Zelle, die auf Grund ihrer Komplementarität zu Bereichen der 3' untranslatierte Region (UTR) ihrer Ziel-mRNAs diese erkennen und so zur Inhibierung der Translation beziehungsweise zur Degradation der Ziel-mRNA führen (Bartel 2004). Die möglichen Ziel-mRNAs der EBV-kodierten microRNAs wurden mit Hilfe von Computerprogrammen vorhergesagt (Pfeffer, Zavolan et al., 2004). In dieser Arbeit ging es darum, die Regulierung von BFLF2 durch miR-BHRF1-2 und miR-BHRF1-3 *in vivo* zu verifizieren. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Kremmer (GSF, München) sollten zunächst monoklonale Antikörper gegen das EBV-Protein BFLF2 hergestellt werden. Mit deren Hilfe sollte in der Immunfluoreszenz die Lokalisation des BFLF2-Proteins in EBV-infizierten Zellen nachgewiesen und die Antikörper in Western Blot getestet werden. Im Weiteren wurden die beiden oben erwähnten microRNAs in die Expressionsvektoren pCEP4 und pSG5 inkloniert und deren Expression im Northern Blot nachgewiesen. Die vorhergesagte Zielsequenz dieser microRNAs, die 3'UTR von BFLF2, wurde in die 3'Position hinter den Luciferase ORF in den Luciferase-Vektor pGL3-Promotor (Promega) inkloniert. Die Auswirkung der microRNAs auf die Luciferase-Expression wurde ausgehend von dem Konstrukt mit Hilfe von Luciferase-Assays untersucht.

2. Material

2.1 Chemikalien, Membranen und Filter

Acrylamid	Serva (Heidelberg)
Agarose	Seakem (Rockland, USA)
Amidoschwarz	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumpersulfat	Serva
Ampicillin (Binotal TM)	Bayer (Leverkusen)
Bactoagar	DIFCO
Bisacrylamid	Serva
Bromphenolblau	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Chloroform	Roth
Coomassie Brilliant Blue TM R-250	Serva
Enhanced Chemoluminescence Western Blotting Detection System (ECL TM)	Amersham (Freiburg)
Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Ethidiumbromid	Sigma
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH
Gamma- ³² P-ATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytik
Glycin	Serva
Hybond N+ Membran	Amersham
Hyperfilm ECL TM	Amersham
Isopropanol	Roth
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Novagen
Magermilchpulver	Glücksklee (Hamburg)
3-Mercapto-1,2-Propandiol	Sigma
Natriumjodid	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schuell

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Nukleotide (dNTPs)	Boehringer (Mannheim)
PeqGOLD TriFast™	PeqLab
Ponceau S	Sigma
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
Röntgen-Fixier-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
SequaGel® Sequencing System	National Diagnostics
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva
Triton X-100	Serva
X-Gal (5-Brom-4Chlor-3-Indolyl-bD-Galaktopyranosid)	Sigma
Zellulosefilter Whatman™ #1	Herolab (Maidstone, USA)

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

2.2 Puffer und Lösungen

Amidoschwarz-Färbelösung	:	Isopropanol 25,0% (v/v) Essigsäure 10,0% (v/v) Amidoschwarz 0,1% (w/v)
Blaumarker	:	Bromphenolblau 0,25% (w/v) Glycerol 50% (v/v) EDTA 50mM
Blocking-Puffer	:	Magermilchpulver 5% (w/v) in PBS-Puffer
Bottomgel-Stock (für SDS-Gele)	:	Tris-HCl pH 8,8 1,5 M SDS 0,4% (w/v)

Coomassie-Blau-Lösung	:	Isopropanol 10% (v/v) Eisessig 25% (v/v) Coomassie-Blau 0,02% (v/v)
Entfärbelösung für Amidoschwarz und Coomassie-Blau	:	Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure 10% (v/v)
Ethidiumbromidlösung	:	Ethidiumbromid 10 mg/ml H ₂ O
Laufpuffer	:	Tris/HCl 0,025 M SDS 0,1% (w/v) Glycin 0,2 M
PBS	:	NaCl 140 mM KCl 25 mM MgCl ₂ 0,5 mM CaCl ₂ 1 mM NaKHPO ₄ 10 mM
2 x SDS-Probenpuffer (2x Sample-Buffer)	:	Tris HCl (pH6,8) 130 mM SDS 6% (w/v) 3-Mercapto-1,2-propandiol 10% (v/v) Glycerol 10% (w/v) Bromphenolblau 0,05% (w/v)
STET-Puffer	:	Tris (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0) 50 mM Triton X-100 0,5% (v/v) Saccharose 8% (w/v) Lysozym 0,5 mg/ml (Zugabe vor Gebrauch)

TAE-Puffer 50x	:	Tris 2 M Natriumacetat 25 mM EDTA 0,5 M ad pH 7,8 mit Essigsäure
TBE-Puffer 10x	:	Tris/Borat pH 8,3 0,89 M EDTA 0,25 M
TE-Puffer	:	Tris 10 mM EDTA 1 mM ad pH 7,6 mit Essigsäure
Transferpuffer	:	Tris/HCl 25 mM Glycin 192 mM Methanol 20% (v/v) SDS 0,05% (w/v)
Uppergel-Stock (für SDS-Gele)	:	Tris-HCl pH 6,8 0,5 M SDS 0,4% (w/v)

Zusätzliche Puffer werden bei der jeweiligen Methode genannt.

2.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP)	Boehringer (Mannheim)
Lysozym aus Hühnereiweiß	Boehringer (Mannheim)
Polynukleotidkinase (PNK)	New England Biolabs Inc. (NEB)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs Inc. (NEB)
RNAse A	Boehringer (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	Promega
Taq-Polymerase	Pharmacia Biotech oder Sigma
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes

Viralex Trypsin/EDTA

PAA Laboratories GmbH

2.4. Größen- und Molekulargewichtsmarker

2.4.1 DNA-Größenmarker

Zur Größenbestimmung doppelsträngiger, linearer DNA-Moleküle bei der Gelelektrophorese wurde die 1 kb plus DNA Ladder (New England Biolabs) mit folgenden Fragmentgrößen verwendet:

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

2.4.2 Protein-Molekulargewichtsmarker

Der LMW-Marker („Low molekular weight-Marker“) der Firma Pharmacia wurde zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen bei der SDS-PAGE eingesetzt und enthält folgende Proteine:

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

2.5 Antikörper

In Kooperation mit Frau Doktor Elisabeth Kremmer (GSF, München) wurden monoklonale Antikörper (Ratte, IgG), die gegen ein Epitop des EBV-kodierten Proteins BFLF2 gerichtet sind, hergestellt. Im Weiteren wurde von Frau Doktor Elisabeth Kremmer ein monoklonaler GST-spezifischer Antikörper 6G9-4-1, der gegen den GST-Proteinanteil gerichtet ist, verwendet. Von der Firma Roche Biochemicals wurde der Hämagglutinin (HA)-spezifische Antikörper 3F10 bezogen. Zum Nachweis gleicher Proteinmengen in den Extrakten wurde ein Antikörper, der gegen das beta-Actin gerichtet ist, benutzt (Sigma-Aldrich). Das beta-Actin wird von einem Haushaltsgen codiert und in eukaryotischen Zellen in gleichen Mengen exprimiert.

Die Einsetzung der Antikörper erfolgte in folgender Verdünnung:

<i>anti BFLF2:</i>	<i>1:10</i>
<i>anti BFLF2 C1 von Gonella, Farina et al., 2005:</i>	<i>1:20</i>
<i>anti GST 6G9-4-1:</i>	<i>1:100</i>
<i>anti HA 3F10:</i>	<i>1:100</i>
<i>anti beta Actin:</i>	<i>1:5000</i>

2.5.2 Sekundärantikörper

Die Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper anti-Ratte-pox (Kaninchen) und anti-Maus-pox (Ziege) wurden in der Regel in einer Verdünnung von 1:2500 eingesetzt.

2.6 Zelllinien

293T: Diese humane Nierenepithelzelllinie leitet sich von 293 Zellen ab. Sie wurden stabil mit einer temperatursensitiven Mutante des SV 40 T-Antigens transfiziert. Sie exprimieren konstitutiv das große T-Antigen des SV 40 Virus und zeigen eine hohe Transfizierbarkeit.

HeLa: Diese Zelllinie wurde aus einem zervikalen Adenokarzinom einer 31 Jahre alten Patientin etabliert (Scherer et al., 1971).

B95-8: Hierbei handelt es sich um eine EBV-positive lymphoblastoide Zelllinie aus in vitro EBV-TYP1-immortalisierten B-Zellen eines Krallenaffen (Miller et al., 1973).

Raji: Diese Zelllinie gehört zur nichttransformierenden EBV-Typ1-positiven Non-Producer BL-Zelllinie mit einer Deletion im EBNA 3C-Bereich und einer Burkitt-Lymphom typischen t (8; 14) Chromosomentranslokation (Epstein et al., 1966).

BL41: Hierbei handelt es sich um eine EBV-negative Burkitt-Lymphom B-Zelllinie, die aus dem Tumormaterial eines 8-jährigen Patienten mit Burkitt-Lymphom etabliert wurde (Lenoir, Vuillaume and Bonnardel, 1985).

2.7 Bakterienstämme

E.colipMosBlue: Diese Bakterien stammen aus dem „pMosBlueT-Vektor“ Kit der Firma Amersham und werden sowohl zur Vermehrung rekombinanter DNA als auch im Blue-White Screening bei der Klonierung rekombinanter DNA eingesetzt.

E.coliBL21/DE3: Dieser E.coli-Stamm wird für die Expression rekombinanter Bakterien eingesetzt, da er sich durch eine sehr hohe Expressionsrate auszeichnet (Studier and Moffatt, 1986).

2.8 Nähr- und Kulturmedien

2.8.1 Nährmedien zur Bakterienanzucht

Zur Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur wurde 2,5% (w/v) LB-Medium [(Luria Broth Base) (GIBCO)] angesetzt und autoklaviert. Um Bakterien auf Platten auszustreichen, wurden Petrischalen mit 3,75% (w/v) Luria's Agar (GIBCO) hergestellt und autoklaviert. Abhängig vom jeweiligen Resistenzgen wurde zur Selektion transformierter Bakterien entweder Ampicillin [0,1% (w/v)] oder Kanamycin [0,03% (m/v)] zu den Nährmedien hinzugegeben.

2.8.2 Kulturmedien zur Anzucht von Säugierzellen

DMEM: Das „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (Bio-Whittaker) wurde zur Kultivierung adhärenter Monolayer-Zellkulturen verwendet. Dieses Medium wurde jeweils mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) und einem „4er Antibiotikum“ - bestehend aus 40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat - ergänzt.

RPMI 1640: Das RPMI-Medium (Sarstedt) wurde für eukaryotische Zellen, die in Suspensionskultur wachsen, verwendet. Auch dieses Medium wurde hierzu mit 10% FKS sowie dem oben beschriebenen „4er Antibiotikum“ ergänzt.

2.9 Vektoren

2.9.1 pGEM™-T Vektor

Zur Klonierung von PCR-Produkten wird der pGEM™ T-Vektor der Firma Promega verwendet. Alle PCR-Amplifikate enthalten am 3' Ende ein Desoxyadenosin, so dass sie ohne vorherigen Restriktionsverdau in den mit überstehenden Desoxythymidinenden offenen Vektor inseriert werden können. Die Ligation von Produkten ohne überhängende Desoxyadenosinenden erfolgt über die Multiple-Cloning-Site (MCS), welche Erkennungssequenzen mehrerer Restriktionsenzyme enthält. In einem Blue-White-Screening wird der erfolgreiche Einbau des Inserts durch die Zerstörung des lacZ-Markergens angezeigt. Neben dem T7- und dem SP6-spezifischen Promotoren besitzt der pGEM™ -T Vektor auch zwei „ori´s“ (Origin of Replication). Der Bakterien-„ori“ verleiht ihm die Fähigkeit zur autonomen Replikation im prokaryotischen System, während der „ori“ aus dem filamentösen Phagen f1 ihm die Erzeugung von Einzelstrang-DNA ermöglicht. Durch sein Ampicillinresistenzgen kann der Vektor zur Selektion transformierter Bakterien eingesetzt werden. In Abbildung 12 ist die Vektorkarte dargestellt.

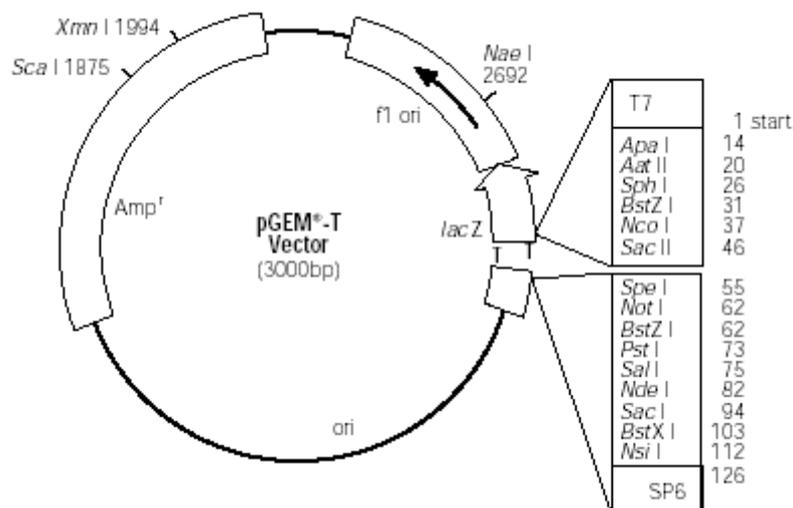


Abb. 12: Vektorkarte des pGEM™-T

2.9.2 pGEX-4T-1 Vektor

Der pGEX-4T-1 Vektor der Firma Amersham-Pharmacia-Biotech ermöglicht die Herstellung von Fusionsproteinen mit einem 26 kDa großen, N-terminalen Anteil der Gluthation-S-Transferase (GST). Der Vektor besitzt hierfür eine Multiple-Cloning-Site, die direkt an das GST-Gen anschließt und eine Thrombin-Erkennungssequenz beinhaltet. Dadurch wird die spätere Abspaltung des GST-Anteils ermöglicht. Da das GST-Fusionsprotein unter der Kontrolle eines chemisch induzierbaren *lac*-Promotors steht, ist eine hohe Expressionsrate gewährleistet. Im Weiteren enthält der 4,8 kb große Vektor ein *E.coli*BR322 „ori“, ein Ampicillinresistenzgen sowie ein *lac Iq* Markergen. Die Vektorkarte wird in Abbildung 13 gezeigt.

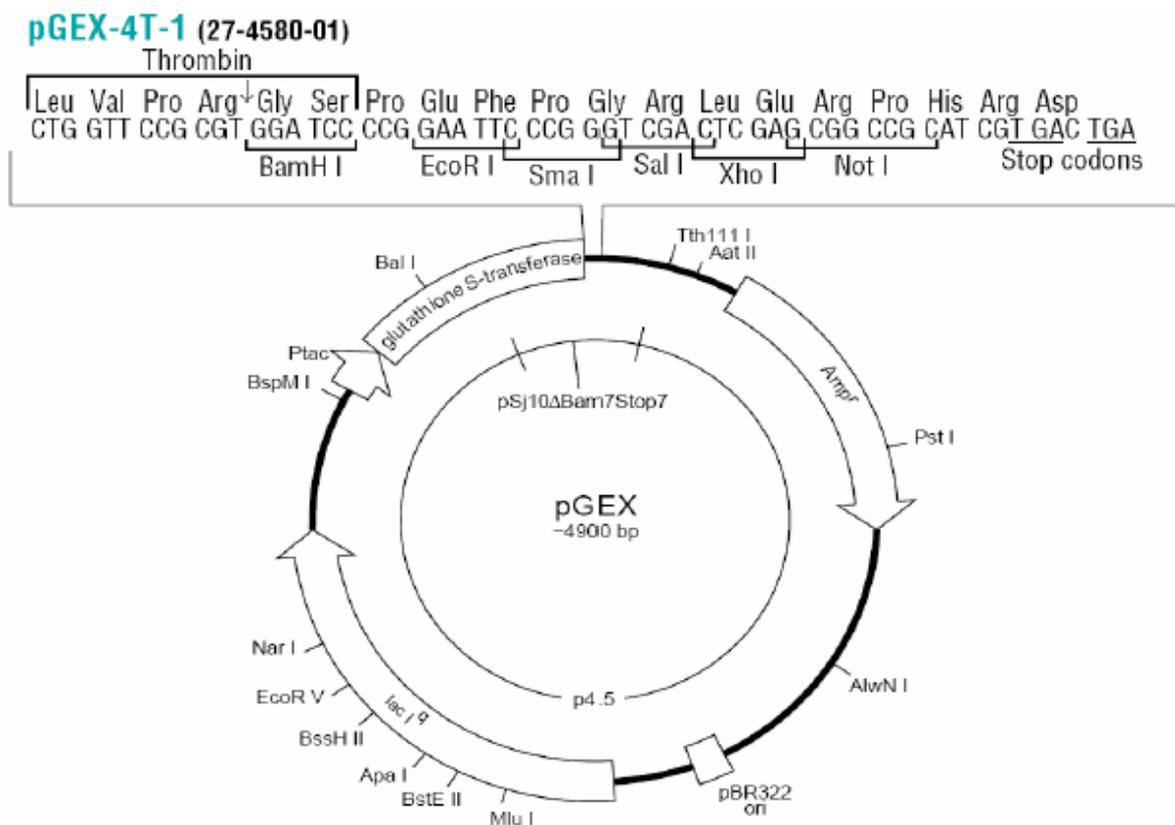


Abb. 13: Vektorkarte des pGEX-4T-1 Vektors

2.9.3 pSG5 Vektor

Der pSG5 Vektor der Firma Stratagene wird überwiegend für die Expression im eukaryotischen System eingesetzt. Der Vektor zeichnet sich durch eine hohe Expressionsrate aus und liefert große Mengen an doppelsträngiger DNA. Außerdem kann der Vektor sowohl für *in vivo* Expression, welche durch den SV 40 Promotor erleichtert wird, als auch für *in vitro* Expression verwendet werden. Hierbei vereinfacht der T7 Promotor die Transkription des klonierten Inserts. Die Ligation von Produkten erfolgt über die Multiple-Cloning-Site (MCS), welche die Erkennungssequenzen von EcoR1, BamH1 und Bgl2 enthält. Dieser Vektor besitzt ebenfalls zwei „ori´s“ (origin of replication), wobei der Bakterien- „ori“ die autonome Replikation im prokaryotischen System ermöglicht und der „ori“ aus dem filamentösen Phagen f1 die Erzeugung von Einzelstrang-DNA vermittelt. Der 4,1 kb große Vektor enthält für die Selektion in Bakterien und eukaryotischen Zellen ein Ampicillinresistenzgen. Die Abbildung 14 zeigt die Karte dieses Vektors.

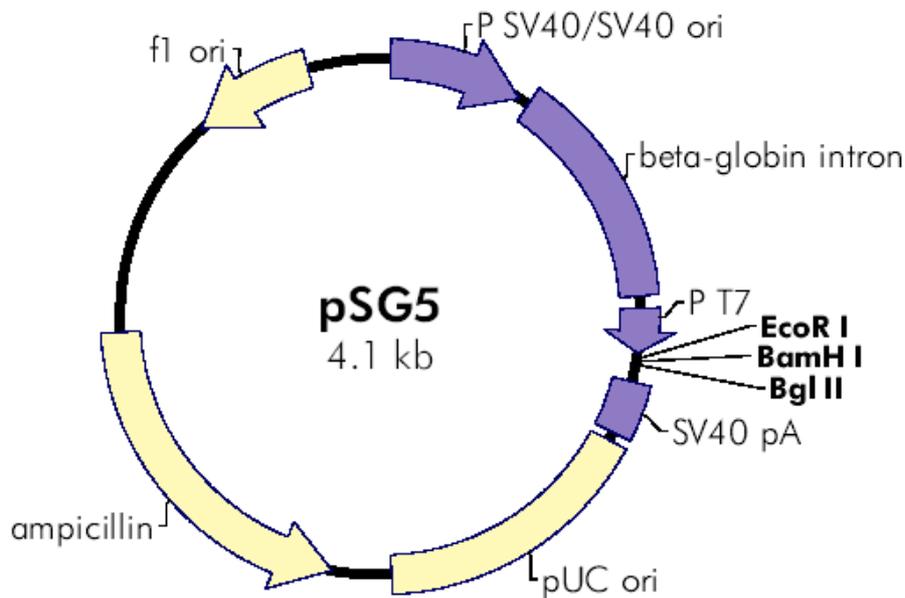


Abb. 14: Vektorkarte des pSG5 Vektors

2.9.4 pCEP4 Vektor

Dieser 10,2 kb große Vektor stammt von der Firma Clontech und stellt einen eukaryotischen Expressionsvektor dar, der auf EBV basiert. Zur stabilen Expression enthält er ein Hygromycin B-Resistenzgen, das EBNA1-Gen, und den EBV-Replikationsursprung, oriP. Die Inserts werden über die MCS einkloniert, stehen dann unter der Kontrolle des CMV-Promotors und besitzen ein SV 40 Polyadenylierungssignal. Zur Amplifizierung und Selektion in Bakterien besitzt der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen und einen pUC ori. Seine Vektorkarte ist in Abbildung 15 zu sehen.

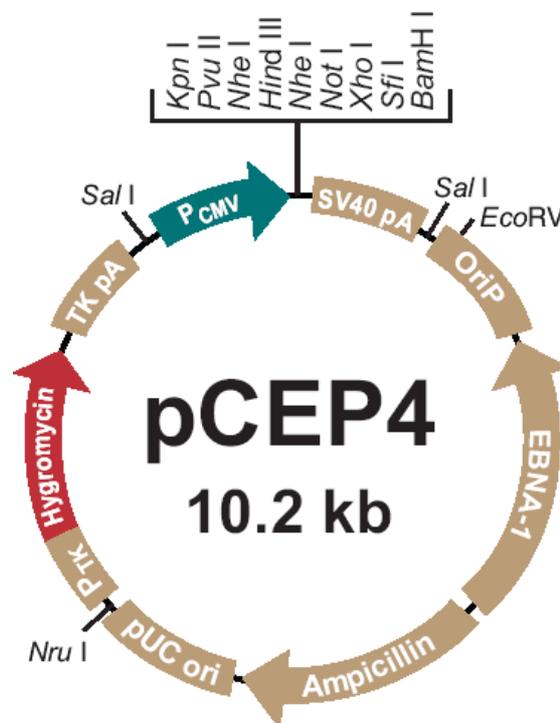


Abb. 15: Vektorkarte des pCEP4 Vektors

2.9.5 pEGFP-C1 Vektor

Der pEGFP-C1 Vektor ist 4,7 kb groß und stammt von der Firma Clontech. Es handelt sich um einen eukaryotischen Expressionsvektor zur transienten oder stabilen Kanamycin/Neomycin-selektierten Expression. Durch den enthaltenen CMV-Promotor werden die einklonierten cDNAs als EGFP (enhanced green fluorescent protein)-

Fusionsprotein exprimiert. Hierbei kann der EGFP-Anteil sowohl N-terminal als auch C-terminal angefügt werden. Die maximale Emission des EGFP-Chromophors kann durch Anregung bei einer Wellenlänge von 488nm bei 507nm durchflusszytometrisch oder fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden. Dadurch ist es möglich, zum Beispiel durch Cotransfektion mit anderen Plasmiden, deren Transfektionsrate zu bestimmen. In Abbildung 16 ist die Vektorkarte dieses Vektors zu sehen.

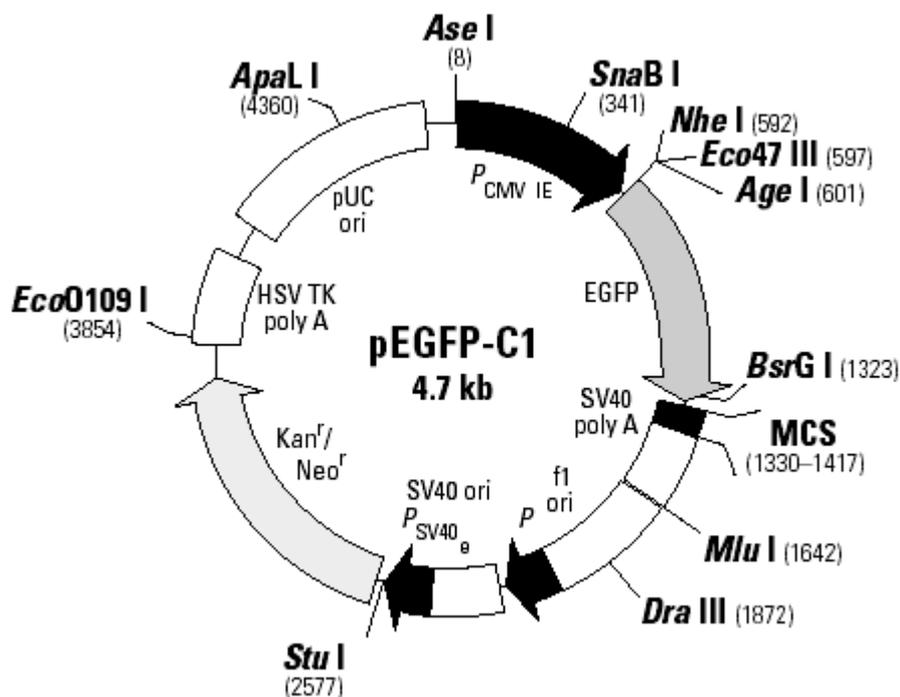


Abb. 16: Vektorkarte des pEGFP-C1 Vektors

2.9.6 pGL3-Promotor Vektor

Es handelt sich hierbei um einen 4,8 kb großen eukaryotischen Expressionvektor, der für die Firefly-Luciferase kodiert (Promega). Diese steht unter der Kontrolle des SV 40- Promotors. Dieser Vektor dient zur quantitativen Analyse von Faktoren, die einen Einfluss auf die Genregulation in Säugerzellen besitzen. Zu diesen Faktoren zählen sowohl cis-regulatorische Elemente als auch trans-regulatorische Elemente wie Enhancer, 3'UTRs mit regulatorischen Funktionen und DNA-bindende Faktoren. Sein Ampicillinresistenzgen dient zur Selektion in

Bakterien. Des Weiteren verfügt er über einen bakteriellen Replikationsursprung und einen „f1 ori“ mit oben beschriebener Funktion. Vor dem Luciferasegen befindet sich die MCS und dahinter ein „SV 40 late polyA signal“ zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. In Abbildung 17 ist der schematische Aufbau dieses Plasmids zu sehen.

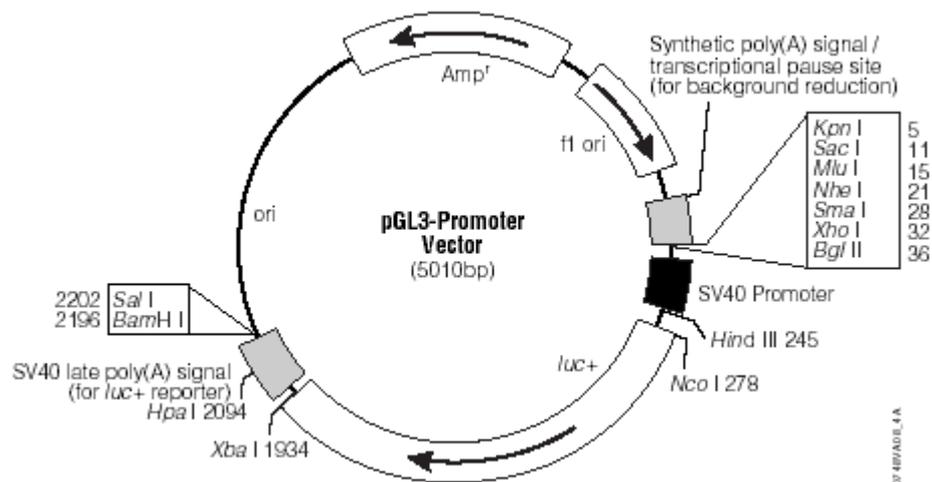


Abb. 17: Vektorkarte des pGL3-Promotor Vektors

2.9.7 Effektorplasmide

pGEX-BFLF2HA

Dieses Protein wurde aus dem pGEX-4T-1 Vektor generiert. Es kodiert für das EBV-Volllängenprotein BFLF2, das am N-terminalen Ende mit GST und am C-terminalen Ende mit HA markiert ist. Der Vektor dient zur heterologen Expression von BFLF2 in E.coli. Das BFLF2HA-Insert wurde mit den Primern 5´Bam-BFLF2 und 3´Eco-BFLF2HA aus genomischer B95-8-Zell-DNA mittels PCR amplifiziert und über eine Bam HI und EcoR I Schnittstelle inkloniert.

pGL3-Prom-BFLF2-3'UTR

Dieser Vektor leitet sich vom pGL3-Promotor Vektor ab. Unmittelbar hinter die kodierende Sequenz der Firefly-Luciferase wurde die komplette 3'UTR des BFLF2 Gens kloniert. Mit Hilfe dieses Reporter-genkonstrukts wurde der regulatorische Einfluss von miR-BHRF1-2 und miR-BHRF1-3 - sowohl Einzel als auch in Kombination - auf die Expression des Reportergens mit der 3'UTR von BFLF2 nachgewiesen. Unter Einsatz der Primer BFLF2-3'UTR-for und BFLF2-3'UTR-rev wurde die BFLF2-3'UTR aus genomischer B95-8-Zell-DNA mittels PCR amplifiziert und über die Nhe I Schnittstelle inkloniert.

pCEP4-BHRF1-1

Dieses Plasmid dient zur Expression der BHRF1-1 miRNA in Säugerzellen. Das Insert, das die Sequenz der miR-BHRF1-1 enthält, wurde durch Hybridisierung der einzelsträngigen Oligonukleotide BHRF1-1pc-for und BHRF1-1pc-rev hergestellt und über eine Bgl II und Hind III Schnittstelle inkloniert.

pCEP4-BHRF1-2

Dieses Plasmid dient zur Expression der BHRF1-2 miRNA in Säugerzellen. Das Insert, welches die Sequenz der miR-BHRF1-2 enthält, wurde durch Hybridisierung der einzelsträngigen Oligonukleotide BHRF1-2pc-for und BHRF1-2pc-rev hergestellt und über eine Bgl II und Hind III Schnittstelle inkloniert.

pCEP4-BHRF1-3

Dieses Plasmid dient zur Expression der BHRF1-3 miRNA in Säugerzellen, wobei das Insert die Sequenz der miR-BHRF1-3 enthält. Es wurde durch Hybridisierung der einzelsträngigen Oligonukleotide BHRF1-3pc-for und BHRF1-3pc-rev hergestellt und wie oben inkloniert.

pSG5-BHRF1-1

Dieses Plasmid dient zur Expression der BHRF1-1 miRNA in Säugerzellen. Das Insert, welches die Sequenz der miR-BHRF1-1 sowie 120 bp flankierend zu jeder Seite enthält, wurde mit den Primern 3´BHRF1-1pSG5 und 5´BHRF1-1pSG5 aus genomischer B95-8-Zell-DNA hergestellt und über die EcoR I Schnittstelle inkloniert.

pSG5-BHRF1-2 und1-3

Dieses Plasmid dient zur Expression der beiden miRNAs BHRF1-2 und 1-3 zusammen in Säugerzellen. Das Insert enthält die beiden miRNAs sowie 120 bp flankierend zu jeder Seite. Es wurde mit Hilfe der Primer 3´BHRF1-2+3pSG5 und 5´BHRF1-2+3pSG5 aus genomischer B95-8-Zell-DNA hergestellt und über die EcoR I Schnittstelle inkloniert.

pSG5-miR155

Dieses Plasmid dient der Expression der miR155 in Säugerzellen. Das Insert, das die Sequenz der miR155 sowie 120 bp flankierend zu jeder Seite enthält, wurde mit den Primern 5´Eco miR155 und 3´Bgl miR155 aus genomischer BL41-Zell-DNA hergestellt und über die EcoR I Schnittstelle inkloniert.

2.10 Synthetische Oligonukleotide

Die im Folgenden aufgeführten Primer wurden zur PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt. Die hier verwendeten Oligonukleotide wurden alle von der Firma MWG-Biotech bezogen. Die Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung verwendet wurden, sind unterstrichen:

5'Bam-BFLF2: CGGGATCCATGGCCCCGGTCACCCCA

3'Eco-BFLF2HA:

GCGGAATTCCTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTACTGTTTATTTTCC

BFLF2-EcoR1-for: CAGAATTCGTTCCCAGGTCTACGTGTGAAAAGTAAACCCGATG

5'BFLF2-3'UTR: CAGCTAGCAGTATAGGCTCTCACCCGTTAAC

3'BFLF2-3'UTR: CAGCTAGCAGATCTTGAATCAGGGTCATTGGGCCTG

5'Eco miR155: CGCGAATTCCAGGAAGGGGAAATCTGT

3'Bgl miR155: CGCGAATTCCAGATCTGTTTATCCAGCAGGGTGACTC

5'BHRF1-1pSG5: GTCGAATTCTGAGCCCCGCCTTTAGGAAGC

3'BHRF1-1pSG5: TCTGAAATTCAGATCTTGGCAGCTAAAGGGGCTAAAC

5'BHRF1-2+3pSG5: GTCGAATTCATGGAAGACGCCAAAAAC

3'BHRF1-2+3pSG5: TCTGAAATTCAGCCAGTAGGATATTAGGC

f.fly-5'nt83: AGGCTATGAAGAGATACGCCCTG

f.fly-3'nt383: ACGAACAACACGGTAGGCTGCGA

GAPDH N: AGTCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC

GAPDH M: TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC

BHRF1-1 forpr: ACCTGATCAGCCCCGGAGTTGCC

BHRF1-2 forpr: CTGTTGCAGCAGATAGCTGATACC

BHRF1-3 forpr: GGG AAGTGTGTAAGCACACACG

pCEP forpr: GTGGATAGCGGTTTGA CTCA

pCEP revpr: CAGCCATACCACATTTGTAGAGG

Zur Herstellung der pCEP4-BHRF1-1, 1-2 sowie 1-3 Konstrukte wurde das Insert nicht durch PCR hergestellt, sondern durch Hybridisieren zweier einzelsträngiger Oligonukleotide, die ebenfalls bei MWG Biotech bezogen wurden. Die Schnittstellen sind unterstrichen.

BHRF1-1pc-for:

AGCTTGAGATCTTATTAACCTGATCAGAAAGGAGTTGCCTGTTTCATCACTAACC
CCGGGCCTGAAGAGGTTGACAA

BHRF1-1pc-rev:

AGCTTTGTCAACCTCTTCAGGCCCGGGGTTAGTGATGAAACAGGCAACTCCGGGG
CTGATCAGGTTAATAAGATCTCA

BHRF1-2pc-for:

AGCTTGAGATCTCTTTTTAAATTCTGTTGCAGCAGATAGCTGATACCCAATGTTATC
TTTTGCGGCAGAAATTGAAAGA

BHRF1-2pc-rev:

AGCTTCTTTCAATTTCTGCCGCAAAGATAACATTGGGTATCAGCTATCTGCTGCA
ACAGAATTTAAAAGAGATCTCA

BHRF1-3pc-for:

AGCTTGAGATCTTCTAACGGGAAGTGTGTAAGCACACACGTAATTTGCAAGCGGT
GCTTCACGTCTTTCGTTAAAA

BHRF1-3pc-rev:

AGCTTTTTAACGAAGAGCGTGAAAGCACCGCTTGCAAATTACGTGTGTGCTTACAC
ACTTCCCGTTAGAAGATCTCA

Zum Nachweis der BHRF1 microRNAs im Northern Blot wurden ³²P-markierte DNA Sonden hergestellt. Hierfür wurden folgende Oligonukleotide, welche komplementär zu den BHRF1 microRNA-Sequenzen sind, bei MWG Biotech bestellt.

BHRF1-1 as :ACTCCGGGGCTGATCAGGTTA

BHRF1-2 as : ATAGAAAACGCCGTCTTTAACTT

BHRF1-3 as : GTGTGCTTACACACTTCCCGTTA

2.11 Computersoftware

Die Textverarbeitung wurde mit Microsoft Word 2000™ (Microsoft Corp.) durchgeführt, und die Graphiken wurden mit dem Programm Photoshop7.0™ (Adobe) erstellt. Nukleotid- und Protein-Sequenzabgleiche wurden über die Internetseiten des *NCBI* (National Center Of Biotechnology Information: www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/) und des *Human Genome Center, Baylor College of Medicine* (BCM Search Launcher: www.gc.bcm.tmc.edu:8088/searchlauncher/launcher.htm/) sowie angeschlossener Dienste durchgeführt. Die Immunfluoreszenzen wurden mit dem Programm „Axio Vision 3.0“ ausgewertet und bearbeitet.

2.12 Verwendete Laborgeräte

- **Blotkammer**
LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit
- **Kryophylle**
Beta A, Firma Christ
- **PCR-Maschine**
Peltier Thermal Cycler 200 der Firma MJ Research
- **Photometer**
Pharmacia Biotech Ultraspec 3000
- **Ultraschallgerät**
Bronson Sonifier 250

- **UV-Gerät**
MWG Biotech Gelprint 2000 i
- **Zentrifugen**
Heraeus Megafuge 1,0 R (mit Kühlung)
Heraeus Picofuge (Tischzentrifuge ohne Kühlung)
Sigma 202 MK (Tischzentrifuge mit Kühlung)
- **Lumat**
LB9501-Luminometer Berthold
- **Immunfluoreszenzmikroskop**
Leica DM IRB/E
- **Kamera zur Dokumentation der Immunfluoreszenzen**
Axio-Cam Color

3. Methoden

3.1 Methoden der Bakterienkultur

3.1.1 Aufzucht und Lagerung von Bakterien

Sowohl zur Aufzucht als auch zur Amplifikation von Plasmiden werden Bakterien mit dem entsprechenden Plasmid transformiert. In diesem Fall wird eine geeignete Menge LB-Medium mit den Bakterien, die auch aus der Stammhaltung (DMSO-Stock) stammen können, angeimpft. Für analytische Zwecke wird zunächst Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit Einzelkolonien von diesen Platten werden anschließend 2,5 ml LB-Suspensionskulturen angeimpft, welche dann 12 - 16 Stunden bei 37°C aerob auf dem Schüttler inkubiert werden. Zur selektiven Kultivierung wird den LB-Agarplatten und LB-Suspensionskulturen Ampicillin [0,1% (w/v)] bzw. Kanamycin [0,03% (w/v)] zugegeben. 800µl der Übernachtskulturen werden zur Stammhaltung mit 20% (v/v) DMSO versetzt. Diese werden bei -70°C eingefroren und gelagert. Bakterien können auch in Form von Zellkolonien auf Agarplatten, die mit Parafilm abgedichtet sind, kurzfristig gelagert werden.

3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

(CaCl₂/RbCl-Methode; Kushner, 1978)

Normalerweise nehmen Bakterien keine Fremd-DNA auf, sondern schützen sich sogar mit speziellen Abwehrmechanismen davor. Bei gentechnischem Arbeiten soll aber die Fähigkeit der Bakterien, sich schnell zu vermehren und somit auch ihre DNA schnell zu replizieren, ausgenutzt werden, um bestimmte Plasmid-DNA, die aufgenommen wurde, zu vermehren. Um dies zu erreichen, wird eine Kompetenzinduktion der Bakterien durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird die Bakterienzellwand durch chemische Einflüsse durchlässig gemacht und Fremd-DNA kann in die Zelle eingeschleust werden. Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien werden 30 ml SOB-Medium mit bereits kompetenten Bakterien angeimpft und diese Vorkultur bei 37°C über Nacht inkubiert. Am Tag darauf

werden 200 ml SOB-Medium mit 8 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C inkubiert, bis sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und die Suspension eine optische Dichte bei 600 nm (OD 600) von 0,3 erreicht. Nun wird die Bakterienkultur in 50 ml Aliquots 15 min auf Eis gehalten und anschließend 5 min bei 2000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 RF). Die so gewonnenen Bakterienpellets werden danach in jeweils 16 ml Transformationspuffer I resuspendiert und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Es folgt nun ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 4°C und 2000 rpm für 5 min (Heraeus Megafuge 1.0 RF). Die so gewonnenen Bakterienpellets werden in jeweils 4 ml Transformationspuffer II resuspendiert, zu je 200 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -70°C gelagert.

Transformationspuffer I: RbCl 0,10 M
MnCl₂ · 4H₂O 0,05 M
CaCl₂ · 2H₂O 0,01 M
CH₃COOH (pH7) 0,03 M
Glycerol 15,0% (v/v)
ad 1000 ml H₂O bidest., sterilfiltriert
pH 5,8 mit 0,2 M CH₃COOH eingestellt

Transformationspuffer II: MOPS (pH6,8) 0,500 M
RbCl 0,010 M
CaCl₂ · H₂O 0,075 M
Glycerol 15% (v/v)
ad 1000 ml H₂O bidest., sterilfiltriert

SOB-Medium: Trypton 20,0 g
Hefe-Extrakt 5,0 g
NaCl 0,6 g
KCl 0,5 g
ad 1000 ml H₂O bidest., autoklaviert
Zugabe von 20 mM MgCl₂ direkt vor Gebrauch

3.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

(Lederberg and Cohen, 1974)

Man bezeichnet mit dem Begriff „Transformation“ die Überführung freier, löslicher DNA in eine dafür kompetente Bakterienzelle. Die Methoden der Kompetenzerzeugung sowie der Transformation sind je nach Art der zu transformierenden Empfängerzelle unterschiedlich. Die eingesetzte, zirkuläre Plasmid-DNA trägt immer die Information für eine selbstständige Replikation und Gene, die der Zelle eine Resistenz gegen bestimmte Antibiotika verleihen, wodurch eine erfolgreiche Selektion von transformierten Zellen gesichert wird. Für die Transformation wird ein 200 µl Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und etwa 60 µl des Aliquots werden mit 20 ng Plasmid-DNA beziehungsweise mit 250 ng DNA (ungefähr 10 µl) aus einem Ligationsansatz gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit wird es der DNA ermöglicht, sich an die Oberfläche der Bakterienzellen anzulagern. Bei dem nun folgenden Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden im Wasserbad - dadurch wird die Bakterienzellwand kurzfristig permeabel - kann die DNA in die Zelle eindringen. Nach zweiminütiger Abkühlung auf Eis lässt die Permeabilität wieder nach. Zu diesem Bakterienansatz wird 1 ml LB-Medium gegeben und diese Vorkultur wird für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Selektion derer Bakterien, die das Plasmid enthalten, wird der Ansatz auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Vorkultur soll den durch den Hitzeschock gestressten Bakterien das Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase erleichtern, bevor sie mit dem Antibiotikum in Kontakt kommen. Hierdurch soll die Bakterienausbeute erhöht werden.

3.1.4 Blue/White Screening

Es handelt sich hierbei um eine beliebte Methode, da sich der Erfolg einer Ligation eines Vektors mit einem entsprechenden Insert direkt erkennen lässt. Auf der Agarplatte kann optisch zwischen Klonen unterschieden werden, die den Vektor mit eingebautem Insert tragen und solchen, die den Vektor ohne Insert tragen. Das Prinzip dieses Screenings beruht auf einer enzymatischen Reaktion. Das Enzym β -Galaktosidase wandelt das Substrat X-Gal zu einem blauen Farbstoff um. Das lacZ-Gen kodiert für das N-terminale α -Fragment der β -Galaktosidase, das alleine keine β -Galaktosidase-Aktivität besitzt. Bringt man es mit dem ebenfalls inaktiven, C-terminalen ω -Fragment zusammen, wird die Aktivität wieder

hergestellt (α -Komplementation). Bakterienstämme, die das Gen *lacZ* Δ M15 besitzen welches für das ω -Fragment kodiert (z.B. pMOS-Stamm) werden mit einem Vektor (z.B. pGEM), der ein induzierbares *lacZ*-Gen enthält, transformiert. Nach Zugabe des Induktors IPTG (Isopropylthiogalaktosid) - ein nicht-metabolisierbares Glucose-Analogon - wird die Expression des *lacZ*-Gens eingeleitet und aktive β -Galaktosidase gebildet. Wurde ein Insert so in den Vektor kloniert, dass es das *lacZ*-Gen unterbricht, erscheinen diese Kolonien auf der Platte weiß, da sie keine funktionelle β -Galaktosidase bilden können. Bakterien, die den Vektor ohne Insert beinhalten, erscheinen blau, da sie funktionelle β -Galaktosidase bilden können und somit die beschriebene enzymatische Reaktion ablaufen kann.

3.2 Kultur von eukaryotischen Zellen

3.2.1 Kultur von B-Zellen in Suspension

B-Zellen der Stämme Raji und BL41 werden in 50 ml RPMI 1640-Medium (Sarstedt, ergänzt mit 10% FKS, „4er Antibiotikum“ 1:1000 und 5% Na-Pyruvat) in 75 cm² Flaschen bei 37°C und 7% CO₂ kultiviert. Die Zellen werden zweimal wöchentlich subkultiviert, wobei die Zellsuspension einmal pro Woche bei 4°C und 1200 rpm (Heraeus Megafuge 1.0 RF) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das erhaltene Zellpellet auf 2 Flaschen à 50 ml RPMI 1640-Medium mit den genannten Zusätzen verteilt wird. Hierdurch sollen schädliche Stoffwechselprodukte aus dem Medium entfernt und dadurch ein besseres Wachstum der Zellen erreicht werden. Für die Zellkultur der B-Lymphozyten werden ausschließlich Plastikpipetten verwendet, um den schädlichen Einfluss von Spülmittelrückständen an Glaspipetten zu vermeiden, da diese Zellen sehr empfindlich darauf reagieren.

3.2.2 Kultur von Monolayerzellen

Monolayer Zellkulturen wachsen adhärent auf einer speziellen Unterlage. Sie werden in 20 ml DMEM Medium, dem 10% FKS und 4er-Antibiotikum zugesetzt wurde, in 75 cm² Flaschen bei 37°C und 7% CO₂ im Brutschrank kultiviert und zweimal wöchentlich subkultiviert. Hierzu wird das Medium unter sterilen Bedingungen abgenommen, der Zellrasen einmal mit

1,5 ml Trypsin/EDTA gespült und dann mit 1 ml Trypsin/EDTA nach kurzer Inkubation bei 37°C und 7% CO₂ abgelöst. Anschließend werden die Zellen mit DMEM Medium verdünnt und 1 ml der Suspension in eine neue 75 cm² Flasche übertragen und auf 10 ml mit dem supplementierten DMEM Medium aufgefüllt.

3.2.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit Nanofectin™

Nanofectin™ ist ein Transfektionsreagenz, das von PAA Laboratories angeboten wird und sich durch eine hohe Transfektionseffizienz bei geringer Zytotoxizität auszeichnet. Es stellt ein positiv geladenes Polymer dar, welches DNA binden kann und diese in einen porösen Nanopartikel einbettet. Der Komplex aus Nanopartikel und gebundener DNA kann somit von der Zelle über Endocytose aufgenommen werden und soll weiterhin die DNA-Degradation in der Zelle verhindern. Adhärente Zellen werden einen Tag vor Transfektion laut Herstellerangaben ausgesät und am nächsten Tag, wenn sie einen etwa 60%igen Zellrasen gebildet haben, transfiziert. Für 24Well-Platten werden jeweils 1 µg Gesamt-DNA mit 50 µl steriler 150 mM NaCl-Lösung und 3,2 µl Nanofectin™ mit 50 µl steriler 150 mM NaCl-Lösung gemischt. Diese beiden Lösungen werden anschließend miteinander vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Von diesem Ansatz werden jeweils 100 µl pro Well tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 2h Inkubation bei 37°C und 7% CO₂ wird das einfache Volumen an frischem Medium auf die Zellen gegeben. Die so gewonnenen transient transfizierten Zellen können in der Regel nach 24 – 48 Stunden Inkubation im Brutschrank zur Durchführung von Versuchen genutzt werden.

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl mit dem Zellanalysegerät CASY™

Mit dem Zellanalysegerät CASY™ der Firma Schade ist eine exakte Bestimmung der Zellzahl möglich, was zur Bearbeitung bestimmter Fragestellungen zwingend ist. Das Gerät erlaubt sowohl die Bestimmung der Zellzahl als auch die qualitative Beurteilung der Zellpopulation. Des Weiteren wird parallel zur Zelldichte auch die Größenverteilung der Zellpopulation analysiert. Das Messprinzip beruht auf der Tatsache, dass intakte Zellen sich in einem elektrisch leitenden Medium wie ein Isolator verhalten und sich bei der Passage

durch die Messzelle der elektrische Widerstand in Abhängigkeit von der Zellgröße ändert. Die zu messenden Zellen werden in einer Verdünnung von 1:1000 in einer Elektrolytlösung (Casyton) resuspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch die Messkapillare gesaugt. Bei diesem Durchtritt der Zellen durch die Kapillare verdrängen sie eine ihrem Volumen entsprechende Menge Elektrolyt aus der Messkammer, was zu einer Erhöhung des Widerstandes führt. Diese Widerstandsänderung dient als Maß für das Volumen der einzelnen Zellen. Die Größenverteilung wird in Form eines Histogramms angegeben.

3.2.5 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) wird die Einzelzelle auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften analysiert. Durch einen künstlich erzeugten Überdruck werden die Zellen beschleunigt und an einem Messpunkt durch einen Argon-Laser ($\lambda = 488\text{nm}$) angeregt (hydrodynamische Fokussierung). Gemessen wird die relative Lichtintensität des emittierten Lichts, wobei das Vorwärts- und das 90° - Seitwärtsstreulicht direkt mit der Größe bzw. der Granularität der Zellen korrelieren. Der Argon-Laser wirkt auch auf die Fluoreszenzfarbstoffe anregend, so dass Zellen, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern oder mit pEGFP markiert wurden, durchflusszytometrisch analysiert werden können. Das dabei emittierte Licht wird über ein optisches System gemessen und auf Grund von unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten eingeteilt. Durch relative Lichtintensitäten, die in einer Auflösung von 1024 Kanälen dargestellt werden, werden Punktdiagramme, Intensitätskurven oder Histogramme angefertigt, die miteinander korreliert werden können.

100 μl der Zellsuspension werden 48 Stunden nach der Transfektion in 100 μl FACS-Fixierlösung fixiert und anschließend im FACScanTM (Becton Dickinson) analysiert. Anhand der Größe und Granularität der Zellen, die nur mit Heringssperma-DNA ohne pEGFP transfiziert wurden (mock-transfizierter Ansatz), kann die nach der Transfektion noch lebende Zellpopulation deutlich von den toten Zellen abgegrenzt werden. Die so als lebend abgegrenzte Zellfraktion wird zum Nullwert bestimmt, der die Grundlage der Messung der pEGFP-transfizierten Zellen bildet. Mit Hilfe der Einrichtung von Quadranten wird der Prozentsatz der pEGFP-transfizierten Zellen in Relation zur Gesamtheit der lebenden Zellen

ermittelt. Der so ermittelte Wert wird als relative Transfektionseffizienz bezeichnet und mit den durch die Luciferase-Aktivitätsmessung gewonnenen Werten verrechnet.

FACS-Fix: Paraformaldehyd 2% (w/v)
NaCl in PBS 150 mM
PH 7,5

3.3 DNA-Techniken

3.3.1 Analytische Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipräparation, „Boiling-Präp“) (modifiziert nach Birnboim and Doly, 1979)

Die Minipräparation dient der Gewinnung kleiner Mengen Plasmid-DNA - maximal etwa 5µg - und wird hauptsächlich zur schnellen Analyse von Klonierungsschritten verwendet. Einzelkolonien werden in 2,5 ml LB-Medium mit einem Selektionsantibiotikum angeimpft, über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert und danach abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm, 4°C, Sigma Kryofuge 202MK). Das gewonnene Zellsediment wird in 200 µl STET-Puffer mit Lysozym (0,5 mg/ml) resuspendiert, 5 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend 45 Sekunden im Wasserbad bei 98,5°C gekocht und danach wieder auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (25 min, 13000rpm, 4°C, Sigma Kryofuge 202MK). Das aus genomischer DNA bestehende Pellet wird noch mit 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen und abzentrifugiert (15 min, 13000rpm, 4°C, Sigma Kryofuge 202MK), um Isopropanolreste zu entfernen. Nach einer kurzen Lufttrocknung wird das Pellet in 20-30 µl TE-Puffer mit RNase A (100 µg/ml) aufgenommen, um noch vorhandene RNA zu verdauen. Dieser Ansatz wird für 10 Minuten bei 37°C inkubiert und kann dann weiter verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

3.3.2 Präparative Plasmidaufreinigung (Nucleobond™ -Methode)

Um Plasmid-DNA in größeren Mengen und mit einem hohen Reinheitsgrad gewinnen zu können, wird der NUCLEOBOND™ -Kit von Macherey Nagel gemäß den

Herstellerangaben verwendet. Diese Methode basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und einer darauf folgenden Ionenaustauschchromatographie. Durch Verwendung von NUCLEOBOND™-AX 100-Säulen (Midipräparation) können circa 100 ml, mit NUCLEOBOND™-AX 500-Säulen 200-500 ml Bakterienkultur aufgearbeitet werden. Mit Minipräparations-DNA wird die ausgewählte Mediummenge - das Medium enthält Selektionsantibiotikum - angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch 10 Minuten Zentrifugation bei 4500 rpm (Heraeus Megafuge 1.0 RF) und Verwerfen des Überstands wird ein Bakterienpellet gewonnen, das bei Midipräparation [Maxipräparation] in 4 ml [10 ml] Puffer S1 resuspendiert wird. Nach Zugabe von 4 ml [10 ml] Puffer S2 wird der Ansatz vorsichtig gemischt und maximal für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch das im Puffer enthaltene SDS wird die bakterielle Zellmembran aufgelöst, es kommt zur Lyse der Zellen und so zur Freisetzung der Zellbestandteile. Die chromosomale DNA wird durch das enthaltene NaOH denaturiert, während die stabilere Plasmid-DNA bei nicht allzu langer Inkubationszeit weitestgehend doppelsträngig bleibt. Im Anschluss daran werden 4 ml [10 ml] Puffer S3 zugegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wird dadurch neutralisiert und die DNA renaturiert wieder - wobei die chromosomale DNA hierbei nicht in ihre ursprüngliche Struktur renaturiert, sondern vielmehr eine netzartige Struktur mit inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen bildet. Die Plasmid-DNA nimmt wieder weitestgehend ihren Ursprungszustand ein. Durch 30 Minuten Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C (Heraeus Megafuge 1.0 RF) präzipitieren Kalium-SDS und chromosomale DNA. Danach wird der Überstand - der die Plasmid-DNA enthält - auf die AX 100- NUCLEOBOND™-Säule [AX 500 - NUCLEOBOND™-Säule] gegeben, die zuvor mit 4 ml [10 ml] Puffer N2 äquilibriert wurde. Durch die Salz- und pH-Bedingungen im Lysat bindet nur die Plasmid-DNA an die Säule und wird zurückgehalten. Nach dem Waschen der Säule mit 2 x 5 ml [3 x 10 ml] Puffer N2 zur Entfernung von Proteinen wird die Plasmid-DNA mit 5 ml [15 ml] Puffer N5 eluiert und mit 3,5 ml [10,5 ml] Isopropanol (100%) gefällt. Das durch die darauf folgende 30 minütige Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C (Heraeus Megafuge 1.0 RF) gewonnene Pellet wird mit eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Nach dem Resuspendieren der DNA-Pellets in 100 µl [200 µl] TE-Puffer beziehungsweise Wasser bidest. kann die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt werden, und es wird ein Restriktionsverdau durchgeführt.

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

3.3.3 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolisieren

(Kirby, 1957)

Die Phenol-Extraktion stellt eine Routinemethode zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen dar. Proteine werden in der Phenollösung denaturiert, wohingegen Nukleinsäuren wegen ihres polyanionischen Charakters in Phenollösungen unlöslich sind. Zur Phenol-Extraktion wird der proteinhaltigen, wässrigen Nukleinsäurelösung das gleiche Volumen Phenol zugesetzt und beide Phasen gut durchmischt. Bei der anschließenden einminütigen Zentrifugation bei 13000 rpm (Sigma Kryofuge 202MK) kommt es zur Phasentrennung in eine phenolhaltige untere Phase, eine Interphase mit denaturierten Proteinen und in eine wässrige, DNA-haltige Oberphase. Diese Oberphase wird vorsichtig

abgenommen und in ein neues Falcon überführt. Um eventuelle Phenolreste aus der Lösung zu entfernen, wird eine Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (CIA-Extraktion) analog durchgeführt.

Phenollösung: Phenol dest. 50% (v/v)
CIA 50% (v/v)
8-OH-Chinolin 0,1% (v/v) (Oxidationsschutz)
Abgesättigt mit TE-Puffer (pH 8,0)

CIA-Lösung: Chloroform / Isoamylalkohol 24:1 (v/v)

3.3.4 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

(Maniatis et al., 1989)

Hierbei handelt es sich um eine Methode zur Konzentration von Nukleinsäurelösungen, die auf der Tatsache beruht, dass DNA in Anwesenheit von Ethanol und relativ hohen Konzentrationen an monovalenten Kationen [ab 70% (v/v)] unlöslich ist. Die DNA-Lösung wird mit 1/10 des Volumens 3 M Na-Acetatlösung versetzt und mit dem 2,5-fachen Volumen gekühltem, absolutem Ethanol gemischt. Zur DNA-Fällung wird der Ansatz nun für 30 Minuten bei -70°C inkubiert, und anschließend kann durch zehnmünütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C (Sigma Kryofuge 202MK) die präzipitierte DNA pelletiert werden. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und nochmals für 10 Minuten zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wird das Pellet 10 Minuten unter Vakuum getrocknet (Speed-Vac Concentrator, Savant) und in einem seiner Größe angepassten Volumen TE-Puffer resuspendiert.

3.3.5 Photometrische Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von Nukleinsäuren

(Maniatis, 1989)

Die Absorptionsspektrometrie ermöglicht die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen. Nukleinsäuren absorbieren auf Grund der Spektralcharakteristika der enthaltenen Basen Licht der Wellenlänge zwischen 250 und 270 nm, wobei das Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt, so dass die photometrisch gemessene Absorption bei 260 nm ein Maß für den DNA-Gehalt der Lösung darstellt. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht bei doppelsträngiger DNA (dsDNA) einer Konzentration von 50 mg/ml, bei einzelsträngiger DNA (ssDNA) und RNA einer Konzentration von 40 mg/ml und bei 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. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Nukleinsäurelösungen wird der Quotient der Extinktionswerte bei 260 nm und 280 nm - was das Absorptionsmaximum von aromatischen Aminosäuren darstellt - ermittelt (OD 260 nm/OD 280 nm). Bei reinen DNA-Lösungen liegt dieser Wert zwischen 1,8 und 1,9. Tiefere Werte geben einen Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten, höhere Werte deuten auf größere Mengen RNA hin. Zur Konzentrationsbestimmung werden 3,5 µl der DNA-Lösung 1:100 mit H₂O bidest. verdünnt und gegen H₂O bidest. als Referenzlösung an einem Ultrospec 3000 Photometer (Pharmacia) gemessen.

3.3.6 Annealing einzelsträngiger Oligonukleotide

Um einzelsträngige, komplementäre Oligonukleotide zu Doppelsträngen zu hybridisieren, müssen diese zusammen kommen. Die in dieser Arbeit verwendeten BHRF1-Oligos wurden in einem Volumen von 10 µl gemischt (c= 0,1 µg/µl) und für 5 Minuten auf 94°C erhitzt. Danach wurden sie bei Raumtemperatur in einem Becherglas mit Wasser für mehrere Stunden abgekühlt, um die Aneinanderlagerung zu ermöglichen.

3.3.7 Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA

(Maniatis, 1989)

Die Agarosegelelektrophorese ist die am häufigsten verwendete Technik, um Nukleinsäuren aufzutrennen und DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe sichtbar zu machen. Die DNA ist wegen des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und wandert im elektrischen Feld auf die Anode zu. Hierbei wirken Agarosegele wie Molekularsiebe, die bewirken, dass kleinere Moleküle schneller durch die Poren des Gels wandern als große. Das konstante Masse-Ladungs-Verhältnis führt zu einer Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihres Molekulargewichts. Hieraus ist ersichtlich, warum die Wahl einer geeigneten Agarosekonzentration für die optimale Auftrennung der DNA-Moleküle große Bedeutung hat. Je geringer die Agarosekonzentration ist, umso größer sind die Poren der Gelmatrix. Neben der Voltzahl, der Stromstärke, der Temperatur usw. hat auch die Konformation der DNA-Moleküle einen Einfluss auf das Laufverhalten der DNA. Die DNA-Konformation kann kovalent geschlossen und ringförmig (coiled and supercoiled Form) oder offen und linear sein. Die supercoiled Form wandert am schnellsten, die offene lineare Form ist etwas langsamer. Der Tris-Acetat-Puffer (TAE-Puffer) wird als Puffer verwendet. Die DNA-Fragmente werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid angefärbt, der mit der doppelsträngigen DNA interkaliert, so dass die DNA-Fragmente unter UV-Licht als orangegefärbte Banden sichtbar und dokumentierbar sind. Um die Dichte der DNA-Lösung zu erhöhen, das Absinken in die Geltasche zu erleichtern und die Lauffront der DNA im Gel zu erkennen, wurde den Proben 1/5 ihres Gesamtvolumens an glycerolhaltigem Blaumarker zugesetzt. Das darin enthaltene EDTA dient als Chelatkomplexbildner und sorgt dafür, dass den Enzymen die für ihre Funktion essentiellen divalenten Kationen entzogen werden und sie somit inaktiviert bleiben. Ein Gelstück mit der benötigten Taschenanzahl wird in eine mit einfachem TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und die Proben in die Taschen pipettiert. Zum Größenvergleich der Fragmente wird parallel dazu eine Markerspur [10 µl 1 kb plus DNA ladder TM (Life technologies)] aufgetragen. Die DNA wird durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt (1-2 h; 80 -130 V). Wenn die Größen der Fragmente analysiert und das Gel fotografiert werden soll, muss die DNA mit kurzwelligem UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht werden (Geldokumentationssystem MWG Biotech Gel Print 2000i). Das kurzwellige UV-Licht schädigt die DNA sehr, wodurch sie danach nicht mehr für gentechnische Arbeiten verwendet werden kann. Zu präparativen Zwecken werden die entsprechenden DNA-Fragmente daher unter langwelligem UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) ausgeschnitten.

3.3.8 Herstellung der Agarosegele

Wie oben erwähnt, ist der Auftrennungsbereich der Gelelektrophorese von der Porengröße des Gels abhängig, welche wiederum von der Agarosekonzentration abhängt. Daher wird abhängig von den aufzutrennenden DNA-Fragmenten die jeweils geeignete Konzentration an Agarose zwischen 0,8% und 3,0% (w/v) eingesetzt. Die gewünschte Agarosemenge wird in 450 ml 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen im Mikrowellenherd gelöst, nach Abkühlen auf circa 60°C mit 25 µl Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml in H₂O) versetzt und anschließend wird die Agaroselösung auf Glasplatten mit Kunststoffeinfassung (24,5 cm x 24,5 cm x 1 cm) - die zuvor mit 1%iger Agarose abgedichtet werden - gegossen. Im Gel werden durch PVC-Kämme Probetaschen ausgespart. Die Kämme werden erst nach vollständiger Polymerisation des Gels wieder entfernt. Das Gel wird in Klarsichtfolie eingepackt und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

3.3.9 Glasmilch-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen oder Lösungen

Glasmilch besitzt in Gegenwart von hohen Konzentrationen an chaotropen Salzen die Eigenschaft, spezifisch DNA zu binden. Dies bietet die Möglichkeit, DNA aus Lösungen und auch aus Agarosegelen zu isolieren. Hierbei muss die Fragmentgröße der DNA zwischen 130 bp und 5 kbp liegen, da kleinere Fragmente nahezu irreversibel gebunden werden und größere Fragmente durch die auftretenden Scherkräfte zerstört werden. Die Ausbeute liegt bei etwa 70%. Das entsprechende DNA-Fragment wird unter langwelligem UV-Licht (=366 nm) mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach dem Wiegen des Gelstücks wird die dreifache Menge seines Gewichts, beziehungsweise das dreifache Volumen bei Lösungen an 6 M NaI-Lösung zugegeben und circa 10 Minuten bei 55°C inkubiert, so dass sich das Agarosegel auflöst. Dem aufgelösten Gelstück werden abhängig von der DNA-Menge beziehungsweise der Lösung 10-20 µl selbst hergestellte Glasmilch zugesetzt. Damit die DNA an die Glasmilch bindet, wird das Gemisch zwischen 5 Minuten und 1 Stunde auf einem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Sedimentation wird der Ansatz schließlich 1 Minute bei 13000 rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge), der Überstand verworfen, das Glasmilchpellet drei Mal mit je 400 µl NEW-WASHTM-Lösung (Gene-CleanTM-Kit) gewaschen und erneut 1 Minute bei 13000 rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge). Das gewaschene Pellet wird nun in 20 µl TE-Puffer oder H₂O bidest. resuspendiert, für 5 Minuten

bei 55°C inkubiert und anschließend nochmals 1 Minute bei 13000 rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge), um die DNA aus dem Glasmilchpellet zu eluieren. Der so gewonnene DNA-enhaltende Überstand wird in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und davon 3 µl zur Überprüfung der Reisolierung auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.4 Enzymatische Modifikation von DNA

3.4.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)

(Maniatis, 1989)

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um Enzyme, die hochspezifisch Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und sie durch Spaltung der Phosphodiesterbindung im DNA-Rückgrat vollständig trennen. Man unterscheidet drei verschiedene Typen von Restriktionsenzymen, von denen nur die Enzyme des Typs II molekularbiologisch von Interesse sind, da sie die DNA an genau definierbaren Stellen schneiden. Die spezifischen Erkennungssequenzen, die normalerweise auch die Schnittstelle selbst beinhalten, umfassen meist 4 - 8 Basenpaare. Häufig handelt es sich bei diesen Schnittstellen um Palindrome. Es gibt grundsätzlich zwei verschiedene Varianten wie die DNA durch die Enzyme geschnitten werden kann. Bei der ersten Möglichkeit werden die Phosphodiesterbindungen zwischen direkt gegenüberliegenden Basenpaaren geschnitten, so dass glatte Enden („blunt ends“) entstehen. Bei der zweiten Variante kommt es zu einem versetzten Aufschneiden der DNA, wobei entweder ein 3'-oder ein 5'-Überhang entsteht („sticky ends“). In dieser Arbeit wurden nur Restriktionsenzyme verwendet, die „sticky ends“ mit 5'-Überhang erzeugen. Mittlerweile sind viele Restriktionsendonukleasen bekannt und auch käuflich zu erwerben. Diese Enzyme stammen ursprünglich aus Mikroorganismen, die sich mit ihrer Hilfe vor eingedrungener, schädigender Fremd-DNA schützen. Die Wirksamkeit der Enzyme wird in Units angegeben, wobei 1 Unit (U) definiert ist als die Menge Enzym, die in der Lage ist, 1 µg DNA in optimalem Milieu und bei optimaler Temperatur (meistens 37°C) innerhalb von 60 Minuten vollständig zu schneiden. Der Vorgang des Schneidens wird auch als „Restriktionsverdau“ bezeichnet. Für analytische Zwecke werden in den Verdauansätzen 0,5 - 1 µg DNA verwendet und für präparative Zwecke bis zu 4 µg. Je nach Enzym werden zwischen 2 und 10 U/µg DNA für einen Verdau eingesetzt, wobei das Volumen an zugesetztem Enzym wegen des in

der Enzymlösung vorhandenen Glycerols 1/10 des Reaktionsansatzes nicht überschreiten darf, da eine Glycerolkonzentration von über 5% (v/v) des Gesamtvolumens eine unspezifische Fragmentierung der DNA durch das Enzym zur Folge hat. Die Durchführung des Verdau erfolgt immer unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen hinsichtlich Temperatur und Inkubationsdauer mit den mitgelieferten zehnfach Puffern und, wenn benötigt, 10 x BSA. Es besteht auch die Möglichkeit, DNA mit mehreren Enzymen in einem Ansatz zu fragmentieren, wobei der sogenannte „Doppelverdau“ mit zwei unterschiedlichen Enzymen am häufigsten verwendet wird. Die Voraussetzung hierfür ist immer, dass die Enzyme im gleichen Puffermilieu angemessen schneiden. Sollten die Puffer nicht kompatibel sein, erfolgt ein sequenzieller Verdau mit den entsprechenden Enzymen nacheinander.

3.4.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA-Enden

(Bolivar, 1977; Chaconas, 1980)

Zur Verhinderung einer Rezirkularisierung beziehungsweise einer Konkatemerisierung von linearisierter Vektor-DNA, werden die linearisierten Vektoren vor der Ligation mit dem Insert mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (CIP, calf intestinal phosphatase) dephosphoryliert. Am freien 5'-Ende der DNA spaltet dieses Enzym die reaktive Phosphatgruppe ab. Im Standardreaktionsansatz sind 20 µl der verdauten Vektor-DNA, 1 µl alkalische Phosphatase, 3 µl mitgelieferter zehnfach Reaktionspuffer zusammen mit 6 µl H₂O bidest. auf 30 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Dieser Ansatz wird für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die so gewonnene DNA wird in einem Agarosegel aufgetrennt und mit Glasmilch reisoliert. Eine Dephosphorylierung wird auch dann durchgeführt, wenn Vektoren mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten wurden, so dass deren „sticky ends“ nicht komplementär zueinander waren, da eine Verbindung mehrerer Vektoren miteinander sonst immer noch möglich wäre.

3.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten

(Dugaiczky, 1975; Sgaramella, Van de Sande, and Khorana, 1970)

Die zu den DNA-Reparaturenzymen gehörende T4-DNA-Ligase lässt sich aus *E.coli*-Bakterien, die mit dem Bakteriophagen T4 infiziert wurden, isolieren. Mit ihrer Hilfe ist es möglich zwei Nukleinsäuremoleküle *in vitro* miteinander zu verknüpfen, indem die Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden geknüpft und somit die Bildung einer intakten, rekombinanten ds-DNA ermöglicht wird. Die T4-DNA-Ligase ist dabei auf die Katalase ATP als Cofaktor und Energiequelle angewiesen. Die Effektivität der Ligation ist abhängig von den eingesetzten Konzentrationen an Vektor- und Insert-DNA. Es wird etwa fünf Mal mehr Insert als Vektor eingesetzt, wobei hier die Stoffmenge und nicht die Masse gemeint ist. Der Ligationsansatz wird nach Zugabe von 2 µl zehnfach Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) mit H₂O bidest. auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und 4 Stunden oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Mit dem halben Ligationsansatz (10 µl) werden nach der Inkubation direkt kompetente Bakterien transformiert, die andere Hälfte wird für eventuell notwendige Wiederholungsschritte bei 4°C gelagert. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Dephosphorylierung des Vektors wird zu jeder Ligation eine sogenannte „CIP-Kontrolle“ (dephosphorylierter Vektor ohne Insert) mitgeführt, wobei das Wachstum von Transformanten ein Beweis für mangelnde Dephosphorylierung wäre. Im Weiteren wird eine Transformationskontrolle mit einem zirkulären Vektor, welcher den Bakterien nach erfolgreicher Transformation eine Antibiotika-Resistenz verleiht, durchgeführt. Hierbei gilt Bakterienwachstum als Zeichen für eine erfolgreiche Transformation.

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

3.4.4 Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde

Um die Expression der EBV microRNAs im Northern Blot nachzuweisen, werden ^{32}P -markierte DNA-Sonden hergestellt. Als Sonden werden die Oligonukleotide BHRF1-1as, BHRF1-2as und BHRF1-3as (siehe 2.10) benutzt, welche komplementär zur miR-BHRF1-1, 1-2 bzw. 1-3 sind. Jeweils 1 μl dieser Oligonukleotide (20 μM) werden mit 5 μl Gamma- ^{32}P -ATP (3000 Ci/mmol), 2 μl 10x T4 PNK Puffer, 11,8 μl Wasser bidest. und 0,2 μl T4 Polynukleotidkinase (10 U/ μl) versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die PNK hängt hierbei ein radioaktives Phosphat an das 5'Ende der Oligonukleotide. Zum Stoppen der Reaktion werden 30 μl 30mM EDTA pH8,0 hinzugegeben und der Ansatz auf eine äquilibrierte Sephadex G25 Säule (Roche) gegeben. Nach kurzem Abzentrifugieren wird die Lösung für 1 Minute bei 95°C inkubiert, um eventuell noch aktive PNK zu inaktivieren. 1 μl dieser Lösung wird anschließend in 50 μl Wasser bidest. verdünnt und steht nun bereit zur Verwendung im Northern Blot.

3.5 Die Polymerase-Kettenreaktion

Bei der PCR handelt es sich um ein enzymatisches Verfahren, mit dessen Hilfe es möglich ist, aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen einen DNA-Bereich definierter Länge und Sequenz *in vitro* selektiv zu amplifizieren. Es wird hierbei die Fähigkeit der DNA-Polymerase genutzt, von einem freien 3'-Hydroxy-Ende eines Doppelstrangbereiches ausgehend einen zur einzelsträngigen DNA-Matrize (Template) komplementären Strang zu synthetisieren. Als „Primer“ werden künstlich synthetisierte Oligonukleotide von definierter Sequenz verwendet. Die Auswahl erfolgt so, dass ein Primer den positiven und der andere den negativen Strang der denaturierten einzelsträngigen DNA bindet. Um die Primer spezifisch für den DNA-Bereich auswählen zu können, muss die DNA-Sequenz des Templates bekannt sein. Die PCR wird in automatisierten Thermocyclern durchgeführt, die nach entsprechender Programmierung automatisch die Reaktionsschritte durchführt. Der erste Schritt der Amplifikation ist die Denaturierung (Melting) der ds-DNA Matrize (Template). Das Melting erfolgt durch Erhitzen auf eine Temperatur über dem Schmelzpunkt der Matrize (etwa 94°C) für 30 Sekunden. Nach der darauf folgenden Abkühlung können sich die synthetischen Oligonukleotide (Primer), die zu jeweils einem der Matrizenstränge komplementäre Bereiche besitzen, an diese anlagern (Annealing). Die Annealing-Temperatur ist hierbei abhängig von

der Schmelztemperatur der Primer beziehungsweise deren GC-Gehalt und ist der wichtigste Parameter, der über Erfolg und Scheitern der PCR bestimmt. Sie wird für jeden Primer bestimmt und gemittelt. Meist liegen die Werte zwischen 51°C und 65°C. An dieser Stelle steht nun der DNA-Polymerase ein freies 3'-Ende zur Verfügung, welches als Ausgangspunkt für die Synthese eines zum Template komplementären Tochterstranges nicht definierter Länge dient. Diese Reaktion, die auch Elongation genannt wird, findet bei der für das Enzym optimalen Temperatur (72°C) und in Gegenwart der zur Synthese benötigten Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's) statt. Bei dem zweiten Reaktionszyklus (Denaturierung, Primeranlagerung und Synthese) wird die DNA wieder aufgeschmolzen. Es entstehen nun zwei Typen von Tochtersträngen: Zum einen die beiden ursprünglichen einzelsträngigen DNA-Templates und zum anderen die neusynthetisierten Stränge, deren 5' Ende einer der beiden Primer darstellt. In diesem zweiten Zyklus dienen beide Typen als Template. Ab dem dritten Zyklus entstehen dann Fragmente, die die gewünschte Länge aufweisen und ab dem vierten Zyklus vermehrt sich die Zielsequenz exponentiell, weil jeder neu synthetisierte Strang als Matrize dient. Durch eine 20-40malige Wiederholung dieser Reaktion würde theoretisch nach 30 PCR-Zyklen eine 27millionenfache Amplifikation der Fragmente erwartet werden. Dieses Ergebnis wird allerdings nicht erreicht, weil limitierende Faktoren - wie abnehmende Enzymaktivität und steigende DNA-Konzentration - zu ungünstigen Reaktionsbedingungen führen. Mittels einer PCR lassen sich auch spezifisch Mutationen in die DNA einfügen, da die Primer bei entsprechend gewählter Annealing-Temperatur auch dann noch an das Template binden, wenn die Sequenz nicht vollkommen übereinstimmt. Verwendet werden sogenannte „mutagene Primer“, die die Fähigkeit besitzen, Mutationen in die Endbereiche der Amplifikate einzubauen. Die eingesetzte Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase), weswegen sie ein für Enzyme außergewöhnlich hohes Temperaturoptimum von über 70°C besitzt und auch noch bei 94°C - wenn die DNA denaturiert - stabil bleibt und so während allen Zyklen aktiv ist. Neben der taq-Polymerase gibt es mittlerweile eine Vielzahl weiterer hitzestabiler Polymerasen, sowohl aus anderen thermophilen Bakterien als auch rekombinant hergestellte. Bei der Auswahl der Primerpaare soll berücksichtigt werden, dass die Primer möglichst ähnliche Schmelztemperaturen besitzen, keine Selbstkomplementarität aufweisen und keine Sekundärstrukturen ausbilden können. Zur Überprüfung auf eventuelle Kontaminationen wird zusätzlich eine H₂O-Kontrolle - also ein kompletter Ansatz lediglich ohne Matrizen-DNA - gemacht. Abschließend werden 20 µl von jedem Ansatz in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Ein typischer PCR-Ansatz ist in Tabelle 1 aufgeführt und ein

entsprechendes Programm in Tabelle 2. Neben den Reagenzien, die in jeder PCR-Reaktion erforderlich sind, gibt es auch Zusätze, wie z.B. DMSO (Dimethylsulfoxid), das in der Lage ist, die Schmelztemperatur herabzusetzen und so eine Erhöhung der Stringenz bewirkt. Dadurch ist es möglich, bei manchen Versuchen überhaupt ein Produkt zu erhalten, in anderen wird so die Ausbeute wesentlich gesteigert.

Verwendete Reagenzien:

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

Tab.1: Pipettierschema eines 50 μ l-Standard-PCR-Ansatzes

Komponente	Menge/Volumen	Endkonzentration
10xReaktionspuffer	5 μ l	1 x
DNTPs (je 10 mM)	1 μ l	je 200 μ M
forward-Primer (25 μ M)	1 μ l	0,5 μ M
reverse-Primer (25 μ M)	1 μ l	0,5 μ M
template-DNA	0,1 - 1 μ g	0,1 - 1 μ g
taq-Polymerase	0,5 μ l	2,5 U
H ₂ O bidest.	ad 50 μ l	

Tab.2: Schema eines verwendeten PCR-Standardprogramms

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94 °C	3 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	55 °C	1 min
Extension	72 °C	2 min
Extension	72 °C	10 min
	4 °C	∞

3.6 Der Luciferase-Reportergen-Assay

Hierbei handelt es sich um einen sehr sensitiven und leicht zu handhabenden Assay, welcher zur Untersuchung von Promotoren und Induktionsstudien dient und auch anderweitig vielseitig einsetzbar ist. Die Luciferase stellt ein 61 kDa großes Protein des Glühwürmchens dar, die ihre enzymatische Aktivität ohne posttranslationale Modifikation erreicht. In einer ATP-abhängigen Reaktion katalysiert die Luciferase die Oxidation des Substrats Luciferin unter Abgabe von Licht. Die Lichtproduktion ist proportional zur Luciferasemenge, wodurch die Luciferase für den quantitativen Nachweis einsetzbar ist. Die Lumineszenz wird in einem Luminometer der Firma FIRMA gemessen. In der vorliegenden Arbeit wurde die 3'UTR von BFLF2 unmittelbar hinter das Luciferasegen des pGL3-Promotor-Vektors kloniert. MicroRNAs, die einen Einfluss auf die Expression der Luciferase ausüben sollen sowie microRNAs, die keinen Einfluss auf die Expression der Luciferase ausüben - und so als Negativkontrolle dienen sollen - wurden sowohl über pSG5- als auch über pCEP4-Konstrukte cotransfiziert. Die dabei entstandene Luciferasemenge beziehungsweise die gemessene Lichtmenge konnte Aufschluss über die regulierenden Eigenschaften der verwendeten microRNAs geben. Hierfür wurden 293T-Zellen in 24-Loch-Platten nach den Herstellerangaben (Nanofectin™) ausgesät und mit den in den einzelnen Experimenten angegebenen Effektor- und Reporterkonstrukten - welche zum einen für die microRNAs kodierten und zum anderen die BFLF2-3'UTR hinter dem Luciferasegen besaßen - sowie mit pEGFP-C1 zur späteren Kontrolle der Transfektionseffizienz mittels FACS-Analyse kotransfiziert. Es wurden jeweils 0,8 µg der pSG5 beziehungsweise 1,6 µg der pCEP4

abgeleiteten, microRNA-kodierenden Effektorstrukturen, 0,2 µg der pGL3-abgeleiteten Reporterstrukturen sowie 0,2 µg des pEGFP-C1-Vektors eingesetzt. Die DNA-Gesamtmenge belief sich auf 1 µg pro Transfektionsansatz bei Verwendung der pSG5-Konstrukte und 2 µg pro Transfektionsansatz bei Verwendung der pCEP4-Konstrukte und wurde, wo nötig, durch Zugabe von Heringssperma-DNA konstant gehalten. Bei jedem Transfektionsexperiment wurde jeweils ein Ansatz lediglich mit Heringssperma-DNA transfiziert, um bei der FACS-Analyse zur Eingrenzung der lebenden Zellpopulation zu dienen. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 100 µl Zellsuspension zur späteren Transfektionskontrolle entnommen. Die restlichen Zellen wurden nach kurzem Lufttrocknen bei Raumtemperatur in 100 µl einfachem CCLR-Puffer (Promega) lysiert. Danach wurden durch zehnmündige Zentrifugation bei 1200 rpm und 4°C die Zelltrümmer entfernt und dann die Luciferase-Aktivität mit Hilfe des Promega Luciferase Assay SystemsTM (Promega) gemäß der Herstellerangaben in einem Lumat LB9501-Luminometer (Berthold) gemessen. Bei jedem Experiment wurden mindestens doppelte Ansätze verwendet und die gewonnenen Werte mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie bezüglich der Transfektionsrate standardisiert. Die statistische Auswertung wie auch die graphische Darstellung der einzelnen Experimente erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes Sigma Plot 4.1TM (SPSS). Die Signifikanz der Abweichung wurde als Standardfehler angegeben.

3.7 RNA-Techniken

3.7.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus den Zellen erfolgt nach dem Standardprotokoll von peqGOLD TriFastTM, wobei der Waschschriff der gefällten RNA mit 75%igem Ethanol nicht durchgeführt wird, da kleine RNAs in höher konzentriertem Ethanol noch löslich sind. Mit dieser Methode ist die gleichzeitige Extraktion von RNA, DNA und Proteinen möglich. Das TriFastTM Reagenz enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat in einphasiger Lösung. Nach der Zugabe von Chloroform und der anschließenden Zentrifugation [30 min, 6000 rpm, Raumtemperatur (Heraeus Megafuge 1.0 RF)] trennt sich das Homogenat in drei Phasen. In der oberen wässrigen Phase befindet sich die RNA; die DNA ist sowohl in der organischen, unteren Phase als auch in der Interphase zu finden und die Proteine sind in der organischen

Phase enthalten. Das Guanidinisothiocyanat hemmt effektiv die RNAsen, so dass die Durchführung bei Raumtemperatur möglich ist. Auf diesem Weg erhält man eine quantitativ und qualitativ hohe Ausbeute an nicht-degradierten RNAs.

3.7.2 Gelelektrophorese einzelsträngiger RNA

Die Auftrennung einzelsträngiger RNA erfolgt in einem 15%igem, denaturierenden Polyacrylamidgel, das mit dem SequaGel R Sequencing System Kit der Firma National Diagnostics laut Protokoll hergestellt wird. In den Lösungen ist neben Acrylamid und Bisacrylamid auch Harnstoff enthalten, der die Faltung der RNA in Sekundärstrukturen verhindert. Da die RNA negativ geladene Phosphatgruppen besitzt, wandert sie in Richtung Anode, wobei größere Fragmente langsamer durch das engmaschige Gel wandern und man so eine Auftrennung der RNA nach ihrer Größe erhält. Dazu wurden 30 µl Gesamt-RNA mit dem gleichen Volumen an 2 x Bromphenolblau-Marker gemischt und in eine Geltasche gefüllt. Das Gel lief 10 Minuten bei 10 W und anschließend 1 Stunde bei 30 W. Zur Kontrolle der RNA-Auftrennung wird das Gel für 10 Minuten in 100 ml 1 x TBE, das 10 µl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung enthält, gefärbt. Danach kann es unter UV-Licht ($\lambda=254$ nm) fotografiert werden.

3.7.3 Umschreibung von RNA in cDNA

Die Umschreibung der aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA erfolgte nach dem Standardprogramm von SuperScript™ III Reverse Transcriptase von Invitrogen. Zunächst muss die RNA durch DNase von noch vorhandener DNA befreit werden. Hierzu werden 50µl Gesamt-RNA-Ansatz (1µg/µl) mit 3µg DNase versetzt. Dieses Gemisch wird 20 Minuten bei 37°C und 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Zur Umschreibung der RNA wird ein 20 µl Ansatz eingesetzt, der sich wie folgt zusammensetzt:

4µl 5xPuffer

4µl RNA (1µg/µl)

2µl DDT

1µl Primer (Laudom Hexamer)

1µl dNTPs

1µl SuperScript™ III Reverse Transcriptase

7µl H₂O

Es werden je RNA immer zwei Ansätze hergestellt, von denen der erste SuperScript™ III Reverse Transcriptase enthält, der zweite nicht. Die Ansätze werden 1 Stunde bei 50°C und dann 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Danach wird kurz zentrifugiert, und die so gewonnene cDNA kann entweder direkt weiterverarbeitet oder bei –20°C gelagert werden.

3.7.4 Northern-Blot

Der Northern-Blot dient dem Nachweis von RNAs und ähnelt dem Prinzip des Southern- oder Western-Blot. Nachdem die RNA auf einem Gel der Größe nach aufgetrennt wurde, werden sie auf eine Membran übertragen und mit einer spezifischen Sonde, die entweder aus einzelsträngiger RNA oder DNA bestehen kann und die immobilisierte RNA nach dem Prinzip der homologen Basenpaarung bindet, nachgewiesen. Die Markierung der Sonde kann durch radioaktives Phosphat oder anderen nicht-radioaktiven Markern - wie zum Beispiel Digoxigenin - erfolgen. Aus dem Polyacrylamidgel wird die RNA mittels einer Semi-Dry Blotting-Apparatur (2117 Multiphor, LKB Bromma) auf eine Nylonmembran transferiert (Hybond N+, Amersham), wobei 1 x TBE als Transferpuffer dient. Danach wird die Membran getrocknet und die RNA durch UV-Crosslinking (UV Stratalinker 1800, Stratagene) auf der Membran immobilisiert. Der Nachweis der EBV microRNAs erfolgt mit spezifischen, radioaktiv markierten Sonden. Hierfür wird die Hybridisierungslösung auf 50°C erwärmt und die Membran mit 15 ml dieser Lösung für 1 Stunde bei 50°C auf einem Rotator inkubiert (Pre-Hybridisierung). Die Lösung wird danach verworfen und die restlichen 15 ml mit der markierten Sonde zusammen auf die Membran gegeben, welche dann auf einem Rotator über Nacht bei 50°C inkubiert. Es folgen zwei Waschstufen von jeweils 10 Minuten bei 50°C mit Waschpuffer I. Danach wird unter denselben Bedingungen mit Waschpuffer II gewaschen. Nun kann auf die Membran ein Film aufgelegt werden, der durch die Radioaktivität der gebundenen Sonde geschwärzt wird.

Denhardts Lösung 50x:	1%	Albumin Fraktion V
	1%	Polyvinylpyrrolidon K30
	1%	Ficoll 400
Hybridisierungslösung:	7,5 ml	20 x SSC
	0,6 ml	1 M Na ₂ HPO ₄ (pH 7.2)
	3,0 ml	10% SDS
	18,0 ml	Wasser bidest.
	0,6 ml	Denhardts Lösung
	0,3 ml	Lachssperma DNA
Waschpuffer I:	5 x	SSC
	1%	SDS
Waschpuffer II:	1 x	SSC
	1%	SDS

3.8 Proteintechniken

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

(Maniatis, 1989)

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Monolayerkulturen und Suspensionskulturen werden von einer dicht gewachsenen 75 cm² Kulturflasche Monolayer durch Ablösung mit Hilfe von Trypsin und darauf folgender Mediumaufnahme geerntet. Bei Suspensionszellen entfällt dieser Schritt. Danach werden die Zellen 10 Minuten bei 1200 rpm und 4°C abzentrifugiert (Megafuge 1.0 RF, Heraeus). Der Überstand wird verworfen und das Pellet zwei Mal mit sterilem, kaltem PBS gewaschen. Danach wird es in einer definierten Menge 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Im SDS-Probenpuffer ist 3-Mercapto-1,2-Propandiol enthalten, das Disulfidbrücken zerstört und so die Tertiärstruktur der Proteine zerstört. Hierdurch wird die Auftrennung der Proteine im Gel proportional zu ihrer Größe verbessert

und es kommt nicht mehr zu Protein-Protein-Interaktionen. Der Zellaufschluss wird durch eine zehnstündige Ultraschall-Behandlung erreicht. Nach zehnmütigem Kochen bei 95°C werden die Proben anschließend für 10 Minuten bei 13000 rpm (Sigma Kryofuge 202MK) und 4°C zentrifugiert, um nicht gelöste Zellbestandteile zu sedimentieren. Der proteinhaltige Überstand kann bei -20°C gelagert werden.

3.8.2 Bestimmung der Konzentration von Proteinextrakten

Auch die Proteinkonzentration wird mit Hilfe von Absorptionsspektrometrie gemessen. Das Absorptionsmaximum ist hauptsächlich vom Gehalt an Tyrosin- und Tryptophan- Resten geprägt und liegt bei 280 nm. Eine Konzentration von 1,8 mg/ml entspricht dabei einer Absorptionseinheit. Bei Verwendung von 2 x SDS-Proben-Puffer ohne Bromphenolblau kann der Proteingehalt der Extrakte photometrisch bestimmt werden, wozu eine 1:50 Verdünnung in 0,1 M NaOH-Lösung hergestellt wird. Die gemessene Extinktion bei 280 nm dieser Lösung wird in die folgende Formel eingesetzt und so die Menge an Protein berechnet, die in der Gelelektrophorese eingesetzt werden soll.

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

E₂₈₀ = Extinktion des Proteinextraktes bei 280 nm

Mit Hilfe dieser Formel wird berechnet, welche Menge des 2 x Sample-Buffer-Extrakts (in µl) eingesetzt werden muss, um 15 µg Protein zu erhalten.

3.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970; Maniatis, 1989)

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

3.8.4 Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels

Zur Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels werden zwei Glasplatten mit der Größe 14,5 cm auf 16,5 cm, von denen die eine an der einen langen Seite eine Aussparung hat, verwendet. Vor der Verwendung werden die Platten mit 70%igem Ethanol (v/v) gereinigt. Zwischen sie werden Teflon-Abstandshalter eingelegt und die Platten so miteinander durch Klammern an drei Seiten befestigt, dass die Seite mit der Aussparung keine Klammern aufweist. Die Ränder der Platten werden mit Agarose (1%) abgedichtet, um das Auslaufen des Gels zu verhindern. Jetzt wird das Trenngel bis circa drei Zentimeter unter den Rand zwischen die Glasplatten gegossen und mit H₂O bidest. überschichtet. Nach der Polymerisation des Untergels wird das H₂O bidest. abgegossen und das Sammelgel darauf gegeben. In dieses wird direkt ein Teflonkamm eingelegt, der die sogenannten Geltaschen für das spätere Probenauftragen formt. Nach der Polymerisation dieses Gels werden der Kamm und der untere Abstandshalter entfernt und das Gel senkrecht in die Elektrophoresekammer eingespannt. Diese besteht im Prinzip aus zwei Kammern, die beide mit Laufpuffer gefüllt werden und zwischen denen das Gel die „Brücke“ für den Strom bildet, wenn Spannung an die Kammern angelegt wird. Die Probenauftragung in die Geltaschen erfolgt mit Hilfe von Hamilton-Mikropipetten. Die elektrophoretische Auftrennung im Sammelgel erfolgt bei 25 mA und später im Trenngel bei 35 mA für 2,5 bis 3 Stunden. Abgeschaltet wird der Strom, wenn die durch Sample Buffer blau markierte Lauffront der Proben am unteren Ende des Trenngels auszulaufen beginnt. Nach Entfernung der Klammern können die Glasplatten voneinander gelöst und das darin liegende Gel entnommen werden. Die aufgetrennten Proteine befinden sich im Trenngel, weswegen das Sammelgel einfach abgetrennt werden kann.

Tab. 3: Komponenten für ein 10%iges Polyacrylamidgel

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

3.8.5 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Das Trenngel mit den darin enthaltenen Proteinen kann durch einstündige Inkubation in Coomassie-Blue-Lösung bei Raumtemperatur und anschließender ein- bis zweistündiger Inkubation in Entfärberlösung ebenfalls bei Raumtemperatur unspezifisch angefärbt werden. Danach wird das Gel in einem Vakuumtrockner bei 80°C für 1,5 Stunden getrocknet.

3.8.6 Western Blot (Immunoblot)

Das Trenngel mit den darin enthaltenen Proteinen kann beim Western Blot auf eine Membran (Nylon oder Nitrocellulose) übertragen werden, wobei das nach der Auftrennung entstandene Proteinmuster immobilisiert auf der Membran erhalten bleibt. Bei niedriger Ionenstärke binden die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran. Sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine bleibt weitgehend erhalten, so dass sie durch den Einsatz spezifischer Antikörper im Immunoblot immunologisch nachgewiesen werden können.

3.8.6.1 Proteintransfer

Der Aufbau des Blots erfolgt in einer mit Transferpuffer gefüllten Wanne. In eine Vorrichtung, die aus zwei zusammensteckbaren PVC-Gittern besteht, wird auf das erste Gitter ein Wattetuch und dann zwei Whatman-Papiere gelegt. Nun folgt das Polyacrylamidgel, auf das die zuvor in PBS äquilibrierte Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schuell) gelegt wird. Dies wird wieder mit zwei Whatman-Papieren zugedeckt, von einem Wattetuch bedeckt und dann durch das zweite Gitter luftblasenfrei verschlossen. Der so aufgebaute Blot wird in richtiger Orientierung zur Anode hin in eine mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer (LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit) eingesetzt. Der Transfer erfolgt über Nacht bei 35 mA oder alternativ dazu in einer Stunde bei 335 mA. Danach wird die Nitrocellulose-Membran aus den Whatman-Papieren herausgenommen und zur unspezifischen Färbung aller Proteine circa zehn Minuten in PonceauSTM (Sigma-Aldrich) gelegt. Hierdurch erreicht man eine unspezifische Färbung der Proteine auf der Membran, wodurch es ermöglicht wird, die Markerspuren mit einem Skalpell abzutrennen und auch - wenn zur weiteren

Versuchsdurchführung notwendig - die weiteren Proben voneinander zu trennen. Diese Färbung ist durch Spülung mit Wasser ablösbar. Die Markerspür wird nun 15 Minuten in Amidoschwarz-Lösung angefärbt und anschließend wieder entfärbt. Die restliche Membran wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 5%iger PBS-Milch geblockt, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen.

3.8.6.2 Immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen

Der immunologische Nachweis wird mit Antikörpern gegen die zu untersuchenden Proteine durchgeführt. Die Detektion der gebundenen Antikörper kann sowohl radioaktiv als auch durch Chemilumineszenz erfolgen. In dieser Doktorarbeit wird ausschließlich die chemilumineszente Detektion benutzt. Nach dem Blocken wird die Nitrocellulosemembran mit dem entsprechenden Antikörper in 2-5 ml PBS-Milch (5%) luftblasenfrei in Klarsichthüllen eingeschweißt und auf einem Taumler über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran 3 x 15 Minuten in PBS-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wird die Membran mit einem entsprechenden Sekundäntikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, in 2-5 ml PBS-Milch (5%) luftblasenfrei in Klarsichthüllen eingeschweißt und auf einem Schüttler 1 bis 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten von je 15 Minuten in PBS-Puffer erfolgt die Detektion gebundener Sekundäntikörper mit Hilfe des ECLTM-Kits (Enhanced Chemoluminescence, Amersham). Bei der Detektion kommt es zu einer Peroxidase-katalysierten Reduktion von H₂O₂ und gleichzeitig zu einer Oxidation von Luminol, was eine Licht-Emission der Wellenlänge $\lambda=428$ nm zur Folge hat, die durch einen blaulichtempfindlichen ECLTM-Film (Hyperfilm ECLTM, Amersham) dokumentiert werden kann. Dazu wird die Membran in einer Kunststoffschale mit den kurz vorher 1:1 gemischten ECLTM-Lösungen 1 und 2 (je 3 ml) für eine Minute inkubiert, mit Whatman-Papier getrocknet und der ECLTM-Film für die entsprechende Expositionszeit aufgelegt. Der Film wird anschließend entwickelt, fixiert und zum Trocknen aufgehängt.

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

Nach manchen Versuchen erscheint es sinnvoll, dieselbe Membran mit einem anderen Antikörper nochmals zu färben - sei es aus Vergleichszwecken oder auch nur, weil der Antikörper nicht gut genug gebunden hat oder zu unspezifisch war. Dazu wird die Membran nach erfolgter ECL™ -Färbung 30 Minuten in circa 100 ml „Stripping-Puffer“ bei 55°C im Wasserbad geschüttelt („gestrippt“). Durch das enthaltene SDS und 3-Mercapto-1,2-propandiol werden die kovalenten Protein-Antikörper-Bindungen gelöst. Anschließend wird die Membran 2 x 15 und 4 x 5 Minuten in PBS auf dem Schüttler gewaschen. Danach ist die Durchführung eines erneuten immunologischen Nachweises der Proteine möglich.

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

3.8.7 Nachweis der Proteinlokalisierung durch Immunfluoreszenzen

Um die subzelluläre Lokalisation von Proteinen zu untersuchen, werden HeLa-Zellen in 6-Loch-Platten auf Deckgläsern ausgesät und mit Nanofectin™ nach Herstellerangaben transient transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion werden die auf den Deckgläsern gewachsenen Zellen 2 Mal vorsichtig mit PBS gewaschen, 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert und dann 2 Minuten bei -20°C in 0,2% Triton-X-100 permeabilisiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C mit einer 2%-igen BSA-Lösung zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen, erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper für 45 Minuten bei 37°C. Darauf folgen drei Waschschriffe mit PBS und ein einmaliges Waschen mit 0,03% Triton-X-100-Lösung. Nun werden die Zellen mit dem Zweitantikörper (anti-Ratte-TRITC, 1:50) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und wieder - wie oben beschrieben - gewaschen. Um die Zellkerne sichtbar zu machen, werden die Zellen zwei Minuten bei 37°C in einer DAPI-Methanol-Lösung (0,2 µg/ml) gefärbt und einmal mit Methanol gewaschen. Zum Schluss wird das Deckgläschen mit den Zellen nach unten auf einen mit einer Evanol-Lösung betropften Objektträger gelegt, versiegelt und bis zur Auswertung bei 4°C im Dunkeln gelagert. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern,

werden längere Inkubationsschritte in feuchten Kammern durchgeführt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgt am „Leica DM IRB/E“ Fluoreszenzmikroskop. Die Kamera „Axio-Cam Color“ der Firma Zeiss dient der Dokumentation der Aufnahmen, und die Auswertungssoftware heißt „Axio Vision 3.0“.

3.9 Herstellung von Antigen für die Immunisierung von Versuchstieren

3.9.1 Induktion der rekombinanten Proteinexpression in Bakterien

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich große Mengen rekombinanten Proteins anzureichern, welches dann für andere Anwendungen benutzt werden kann. Das hier verwendete System arbeitet mit dem *E.coli*-Stamm BL21/DE3, der mit dem pGEX-4T-1 Vektor der Firma Amersham-Pharmacia-Biotech transformiert wird. Durch eine Induktion mit IPTG wird das Gen der Glutathion-S-Transferase angeschaltet und dieses Protein in großer Menge von den Bakterien exprimiert. Das zu exprimierende Gen wird so in den Vektor einkloniert, dass ein GST-Fusionsprotein mit dem gewünschten Protein entsteht. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Fusionsprotein von GST und BFLF2 hergestellt werden, das dann als Antigen für die Antikörperproduktion dienen soll. Das Insert wird in die MCS des pGEX-4T-1 Vektors über passende Schnittstellen einkloniert. 2 µg dieser DNA werden verwendet, um 50 µl BL21/DE3 Bakterien zu transformieren. Damit wird eine 20 ml Vorkultur (LB-Medium mit Ampicillin) angeimpft, die über Nacht bei 37°C im Brutraum auf den Schüttler gestellt wird. Am nächsten Morgen werden 2 ml Suspension aus der Vorkultur entnommen und damit 200 ml LB-Medium mit Ampicillin angeimpft. Diese Kultur wird bei 37°C geschüttelt bis sie eine Optische Dichte von 0,6 bei 600 nm ($OD_{600} = 0,6$) erreicht hat. An dieser Stelle werden 50 ml der Suspension für die Kontrolle vor Induktion ($t = 0$ h) entnommen und abzentrifugiert (10 min, 4°C, Megafuge 1.0 RF, Heraeus). Der Rest wird mit 0,1 mM IPTG (Endkonzentration) versetzt, wodurch die Proteinexpression induziert wird. Nach 4 h wird erneut die optische Dichte bei 600 nm bestimmt, wofür die Bakteriensuspension 1:20 verdünnt wird. Zur Kontrolle der Induktion werden 10 ml der Suspension ($t = 4$ h) entnommen. Diese Kontrolle und der Rest der Suspension (140 ml) werden abzentrifugiert (10 min, 4°C, Megafuge 1.0 RF, Heraeus). Die Pellets der Nullkontrolle, der 4 h-Kontrolle und des Restes werden mit 2x Sample Buffer nach folgender Formel versetzt:

OD600 x Aliquotmenge [ml] x evtl. Verdünnung x 10 x 2 = 2 x SDS-Probenpuffer Zugabe[μ l]

Die Proben werden für 3 x 5 Sekunden einer Ultraschallbehandlung unterzogen und dazwischen in Eis gekühlt und dann bei 98,5°C für 10 min gekocht. Die Kontrollen werden zur Durchführung normaler SDS-Gelelektrophoresen benutzt, während die Proben zur Herstellung präparativer Gele genutzt werden.

3.9.2 Präparative Proteinaufbereitung mit Hilfe von SDS-PAGE

Durch dieses Verfahren wird es ermöglicht, größere Mengen an reinem Protein herzustellen, welches dann im Rahmen dieser Arbeit als Antigen zur Immunisierung von Versuchstieren eingesetzt wurde. Abweichend von der normalen SDS-PAGE werden hier Abstandshalter (Spacer) verwendet, die 3 Mal so breit sind. Außerdem wird ein spezieller Kamm, der links und rechts im Gel jeweils eine kleine Tasche für den Marker und in der Mitte eine sehr breite Tasche für den aufzutrennenden Proteinextrakt ausspart, benutzt. Nach der Auftrennung werden die Proteine angefärbt und die entsprechende Bande - die sich auf Grund der breiten Tasche über fast die komplette Breite des Gels erstreckt - kann ausgeschnitten und reisoliert werden. In einem 10%igen SDS-Gel der oben beschriebenen Machart werden 500 μ l des SDS-Proteinextraktes aus den zuvor transformierten und induzierten Bakterien aufgetrennt. Das Gel wird 2 Stunden mit nicht fixierender Coomassie-Brilliant-Blue Lösung (ohne Isopropanol und Eisessig) gefärbt. Dadurch wird eine Elution des Proteins aus dem Gel ermöglicht. Das Gel wird dann in einer 1 M Tris/HCl Lösung bis zur Erkennung der Banden entfärbt. Die Bande des entsprechenden gewünschten Proteins zeichnet sich durch eine intensive Färbung aus, da durch die Induktion eine große Menge dieses Proteins exprimiert wurde. Sie wird ausgeschnitten und durch Drücken durch eine 10 ml Spritze und dann durch eine 5 ml Spritze zerkleinert. Das zerkleinerte Gelmaterial wird in circa 25 ml einer 50 mM NH_4HCO_3 -Lösung aufgenommen und auf dem Drehrad bei RT für mindestens 8 Stunden inkubiert. Während dieser Zeit diffundiert das Protein aus der Gelmatrix in die Lösung. Der komplette Ansatz wird 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 RF), der proteinhaltige Überstand abgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Das Pellet wird dann erneut mit ca. 25 ml der 50 mM NH_4HCO_3 -Lösung versetzt und auf dem Drehrad bei RT für 2-3 Stunden inkubiert und wie oben zentrifugiert. Auch dieser Überstand wird abgenommen und mit dem anderen vereinigt. Das Pellet kann bei -20°C für eventuelle

Wiederholungsschritte aufbewahrt werden. Der Überstand mit dem eluierten Protein wird in zwei 50 ml Gefäßen bei -70°C eingefroren. Dabei werden die Gefäße schräg gestellt, um nach dem Gefrieren eine relativ große Oberfläche zu erreichen, da dies für die Gefriertrocknung von großer Bedeutung ist. Die Gefäße mit der gefrorenen Proteinlösung werden dann mit gelöchertem Parafilm verschlossen und über Nacht in einem Gefriertrocknungsgerät (Kryophylle) gefriergetrocknet. Um eine schnelle und gute Kryophyllisierung zu erreichen ist es wichtig, dass das verwendete Material nicht angetaut ist. Es entsteht ein gefriergetrocknetes Pulver, in dem das Protein aufkonzentriert ist. Dieses gefriergetrocknete Pulver wird in 2,5 ml PBS gelöst, um es von noch verbliebenen Acrylamidresten und anderen Verunreinigungen zu befreien. Dazu wird eine NAPTM-25 Säule der Firma Pharmacia Biotech, die mit SephadexTM-G25-Sepharose beladen ist, verwendet. Diese Säule funktioniert wie ein Molekularsieb, das heißt sie hält kleine Moleküle zurück und lässt große Teilchen passieren. Sie wird mit 25 ml PBS äquilibriert und dann werden die 2,5 ml Proteinlösung in die Säule eingelassen. Der Vorlauf wird bei -20°C aufgehoben und das gereinigte Protein von der Säule mit 3,5 ml PBS eluiert. Die Säule kann bei 4°C aufbewahrt werden. Von dem nun gereinigten Protein werden 100 μl abgenommen und dessen Anwesenheit im Western Blot nachgewiesen. Der Rest wird erneut, wie oben beschrieben, gefriergetrocknet und in 0,5 ml PBS aufgenommen. Die auf diese Weise erhaltene Proteinlösung wurde zu Frau Dr. Kremmer nach München geschickt und diente dort als Antigen zur Immunisierung von Lou/C Ratten nach der Methode von Kremmer, Grässer et al., 1995.

3.8.3 Lyse von induzierten Bakterien nach IPTG-Induktion

Bei diesem Verfahren bleiben die Proteine im Gegensatz zur präparativen Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE nativ. Es wird ein Lysepuffer verwendet, der kein 3-Mercapto-1,2-Propandiol und SDS enthält. Stattdessen wird Lysozym benutzt, das in der Lage ist, die Zellwand der Bakterien aufzulösen. Das Bakterienpellet, das 4 h nach der Induktion gewonnen wird, wird in TNE-Puffer aufgenommen. Die entsprechende Menge errechnet sich dabei nach folgender Formel:

$$OD600 \times \text{Aliquotmenge [ml]} \times \text{evtl. Verdünnung} \times 10 \times 2 = \text{TNE-Puffer Zugabe [\mu\text{l}]}$$

Zu diesem Ansatz wird der Protease-Inhibitor PMSF (1 mM Endkonzentration) sowie Lysozym (1mg/ml Endkonzentration) zugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es erfolgt eine Zugabe von Triton-X-100 bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (v/v) und eine Inkubation von 10 Minuten auf Eis. Anschließend wird der Ansatz mit DNase (10µg/ml), MgCl₂ (10 mM Endkonzentration) und NaCl (1 M Endkonzentration) versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird der Ansatz einer Ultraschallbehandlung unterzogen (3 x 5 sec) mit zwischenzeitlicher Abkühlung auf Eis. Der Ansatz wird zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4°C, Sigma Kryofuge 202MK) und der dabei entstandene Überstand abgenommen und als Suspension I bezeichnet. Das Pellet wird weiterverarbeitet, indem es wieder in die berechnete Menge TNE-Puffer aufgenommen wird. Hier wird dann Triton-X-100 in 0,5% (v/v) Endkonzentration und EDTA (10 mM Endkonzentration) zugegeben. Nach einer erneuten Ultraschallbehandlung wird der Ansatz abzentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4°C, Sigma Kryofuge 202MK), der Überstand abgenommen und als Suspension II bezeichnet. Zum Abschluss wird das Pellet in der für den TNE-Puffer berechneten Flüssigkeitsmenge H₂O bidest. aufgenommen und anschließend abzentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4°C, Sigma Kryofuge 202MK). Der Überstand wird als Suspension III aufgehoben und das Pellet verworfen. Je ein Aliquot der Suspensionen I, II und III werden im Western Blot auf die Anwesenheit des Fusionsproteins getestet. Die Suspension I und II werden in einem Gefäß gemischt und von Frau Dr. Kremmer für die Bestimmung der hergestellten Antikörper im ELISA verwendet.

TNE-Puffer: Tris (pH 7,4) 50 mM
 NaCl 300 mM
 EDTA 2 mM
 DTT 2 mM
 Aprotinin 0,9 µg
 Glycerol 10%
 ad 100 ml mit H₂O bidest., Lagerung bei 4°C.

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung eines BFLF2-Antigens zur Immunisierung von Ratten und somit zur Herstellung monoklonaler Antikörper

MicroRNAs sind endogene 19-25 nt lange RNAs, die wichtige regulatorische Funktionen im Stoffwechsel von Tieren und Pflanzen innehaben (Ambros, Bartel et al., 2003; Bartel 2004; Cullen 2004). Sie gelten als negative Regulatoren der Zelle und hemmen die Proteinsynthese ihres Zielgens auf Translationsebene. Dies wird durch das Schneiden der Ziel-mRNAs oder durch translationale Repression erreicht und geht mit einer Reduktion der Proteinmenge einher. Im Jahr 1993 konnte gezeigt werden, dass das *lin-4* Gen nicht für ein Protein, sondern für zwei kleine RNAs von 21 nt und 61 nt Länge kodiert (Lee, Feinbaum et al., 1993). So kam es zur Entdeckung der microRNAs. Erst 2004 wurden die ersten fünf viralen microRNAs aus einer Burkitt-Lymphom Zelllinie, die latent mit EBV infiziert wurde, nachgewiesen (Pfeffer, Zavolan et al., 2004). Die EBV-kodierten microRNAs sind in zwei Clustern auf dem EBV-Genom angeordnet, wobei das erste Cluster innerhalb des BHRF1-Gens liegt. Die miR-BHRF1-1 liegt in der 5'UTR; die miR-BHRF1-2 und miR-BHRF1-3 liegen in der 3'UTR des Gens und werden in antisense zu diesem transkribiert. Die BFLF2-mRNA wurde durch bioinformatische Analysen als potentiell Ziel der miR-BHRF1-2 und 1-3 vorhergesagt (Pfeffer, Zavolan et al., 2004). Das BFLF2-Gen des EBV kodiert für ein Protein, das zusammen mit dem BFRF1-Genprodukt an der Umhüllung der Kapside der Epstein-Barr-Virionen an der Kernmembran beteiligt ist (Gonella, Farina et al., 2005). BFLF2 gehört zu den frühen Transkripten und wird in einer Vielzahl von Zelllinien nach Aktivierung des lytischen Replikationszyklus exprimiert (Gonella, Farina et al., 2005). Es wird vermutet, dass die beiden microRNAs miR-BHRF1-2 und 1-3 zur Aufrechterhaltung des Latenzstadiums beitragen, indem sie die BFLF2-Expression unterdrücken. In Zusammenarbeit mit Frau Doktor Elisabeth Kremmer (GSF München) wurden für Untersuchungen hinsichtlich der Lokalisation von BFLF2 mittels Immunfluoreszenz monoklonale Antikörper gegen das BFLF2-Protein hergestellt. Im Weiteren sollen diese Antikörper - in hier jedoch nicht durchgeführten Experimenten - im Western Blot zum Nachweis der Proteinexpression genutzt werden. Die kodierende Sequenz wurde in den pGEX-4T-1 Vektor kloniert, um GST-Fusionsproteine zu erhalten. Diese wurden aufgereinigt und aufkonzentriert, so dass sie zur

Immunisierung von Ratten verwendet werden konnten. Die dann hergestellten monoklonalen Antikörper mussten auf ihre Spezifität im Western-Blot getestet werden, wozu HA-markiertes Protein in Säugerzellen exprimiert werden musste.

4.1.1 Klonierung von GST-BFLF2-HA

Zur Expression von GST-markiertem BFLF2-Fusionsprotein wurde in einer PCR-Reaktion die kodierende Sequenz von BFLF2 zusammen mit einer HA-Sequenz vor dem Stop-Codon amplifiziert. Dazu wurden die Primer 5´Bam-BFLF2 und 3´Eco-BFLF2HA verwendet (siehe 2.10). Dieses Fragment wurde in den zuvor geschnittenen und dephosphorylierten pGEX-4T-1 Vektor inkloniert. In Abbildung 18 ist das Ergebnis der PCR sowie der Kontrollverdau mit BamH I und EcoR I zu sehen. In der linken Abbildung ist in Spur 1 eine Bande bei circa 1000 bp zu erkennen, was der amplifizierten BFLF2-HA-Sequenz mit einer Größe von 1002 bp entspricht. Auf dem rechten Bild ist der Kontrollverdau abgebildet. Der leere pGEX-Vektor besitzt eine Größe von 4900 bp. Die in Spur 6 und 7 erkennbare Bande bei ungefähr 1000 bp zeigt das BFLF2-HA-Insert - nach Restriktion mit BamH I und EcoR I wieder aus dem pGEX-Vektor herausgeschnitten.

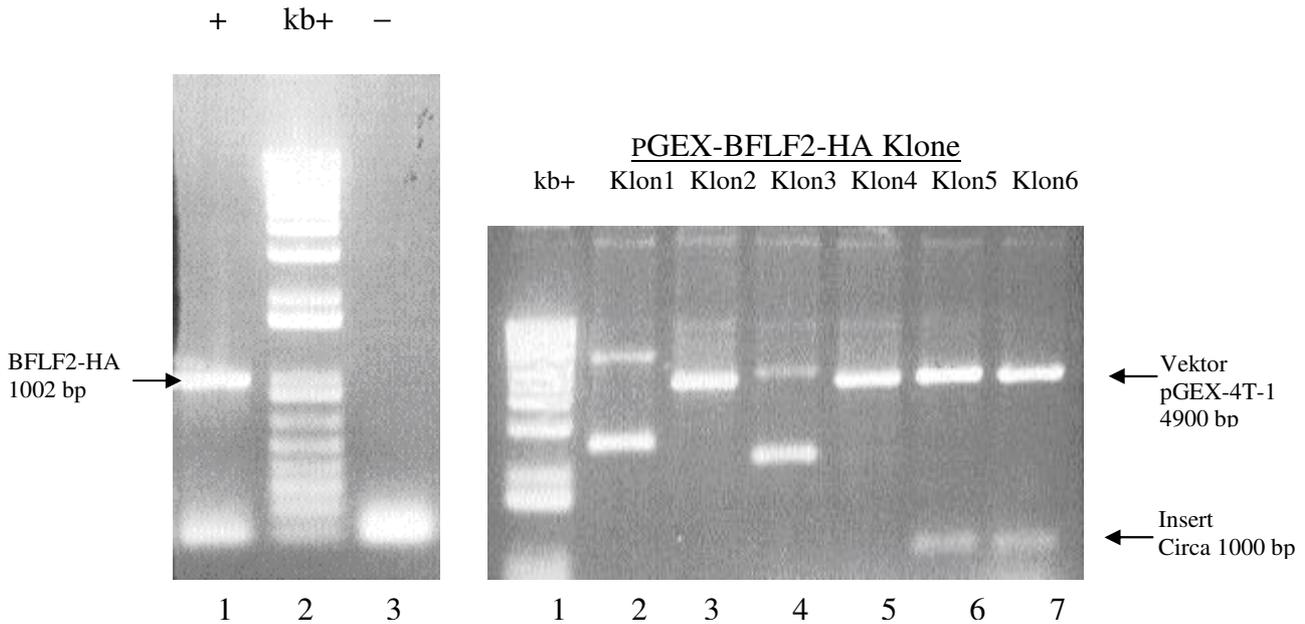


Abb. 18: Amplifikation von BFLF2-HA und Klonierung von BFLF2-HA in pGEX

Links: einprozentiges Agarosegel zum Nachweis der Amplifikation mittels PCR der kompletten, kodierenden BFLF2-Sequenz (cds) mit HA-Markierung. In Spur 1 wurde ein Aliquot des PCR-Produktes aufgetragen, in Spur 3 ist die Negativkontrolle zu sehen. BFLF2-HA wurde aus einer EBV-Cosmid-Bank amplifiziert.

Rechts: Kontrollverdau von pGEX-BFLF2-HA mit BamH I und EcoR I auf einem einprozentigen Agarosegel.

4.1.2 Expression des Fusionsproteins GST-BFLF2-HA in Bakterien

Zur Expression des Fusionsproteins GST-BFLF2-HA wurde der E. coli Stamm BL21/DE3 verwendet. Hierbei handelt es sich um einen durch genetische Veränderung für die Expression von Proteinen optimierten Bakterienstamm. Die Bakterienkultur wurde mit dem pGEX-BFLF2-Plasmid transformiert und in LB-Medium kultiviert. Durch Zugabe von IPTG zu dieser Kultur wurde die Expression von BFLF2 induziert. Zur Überprüfung der Induktion des Fusionsproteins wurde aus dieser Kultur nach 4 Stunden ein Extrakt hergestellt, auf einem 12,5%igen analytischen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt (Abbildung 19). Vor der Induktion wurde eine kleine Menge der Suspension entnommen, um damit ein Proteinextrakt als Nullkontrolle herzustellen. Das GST-BFLF2-HA Protein hat ein errechnetes Molekulargewicht von 62,7 kDa, und - wie in der Abbildung zu sehen ist - erscheint in der induzierten Probe eine ausgeprägte Bande zwischen 43 und 67

kDa, die bei den nicht-induzierten Proben nur leicht angedeutet ist. Nun wurde ein Western-Blot durchgeführt, um sicherzustellen, dass es sich wirklich um die gesuchten Fusionsproteine handelt (Abbildung 20). Hierfür wurde ein GST-spezifischer Antikörper verwendet. Auch hier ist eine Bande zwischen 43 und 67 kDa in den induzierten Proben zu sehen, welche ohne Induktion – zum Zeitpunkt 0 – nicht detektierbar ist. Jedoch ist auch ein sehr starker Hintergrund bei diesem Nachweis sichtbar. Dennoch konnte so das Ergebnis aus der Coomassie-Färbung in Abbildung 17 bestätigt und das Protein für die Antikörperherstellung weiterverarbeitet werden.

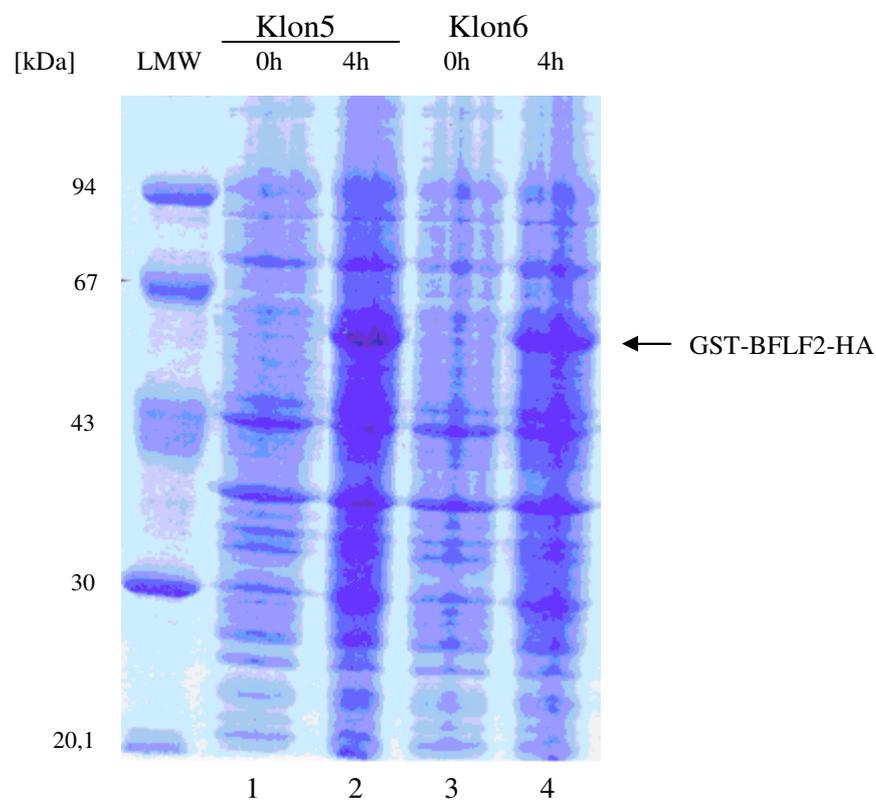


Abb. 19: Induktion des GST-BFLF2-HA-Fusionsproteins: Coomassie- Gel

BL21/DE3-Bakterien wurden mit pGEX-BFLF2-HA transformiert und die Expression der Fusionsproteine mit Hilfe von IPTG induziert. Nach vier Stunden wurden Proteinextrakte hergestellt und auf ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt. Es wurden die Proteinextrakte von zwei verschiedenen Klonen sowohl vor (Spur 1 und 3, 0h) als auch nach (Spur 2 und 4, 4h) der Induktion mit IPTG aufgetragen.

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

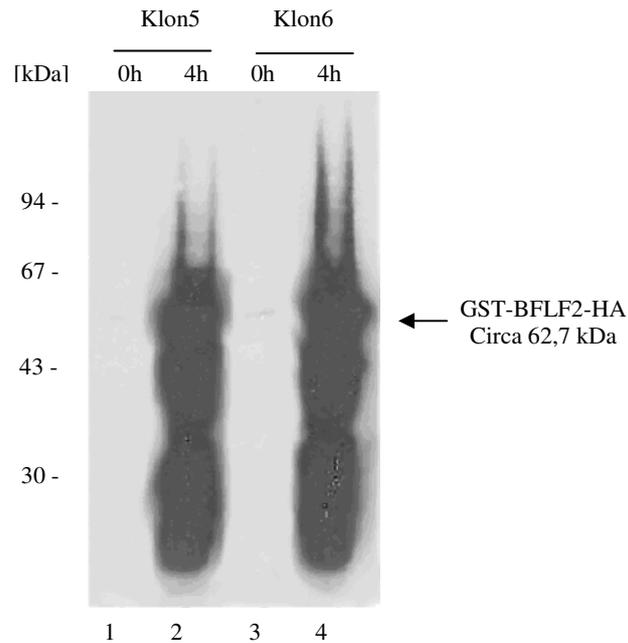


Abb. 20: Induktion des GST-BFLF2-HA-Fusionsproteins: Western Blot

BL21/DE3-Bakterien wurden mit pGEX-BFLF2-HA transformiert und die Expression der Fusionsproteine mit Hilfe von IPTG induziert. Nach vier Stunden wurden Proteinextrakte hergestellt und auf ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Übertragen auf eine Nitrozellulosemembran wurde diese mit einem GST-spezifischen Antikörper gefärbt. Es wurden die Proteinextrakte von zwei verschiedenen Klonen sowohl vor (Spur 1 und 3, 0h) als auch nach (Spur 2 und 4, 4h) der Induktion mit IPTG aufgetragen. Molekulargewichtsmarker: siehe Abbildung 17 Seite 94.

4.1.3 Anreicherung und Aufreinigung von GST-BFLF2-HA

Das Fusionsprotein musste, um als Antigen zur Immunisierung von Lou/C Ratten Verwendung zu finden, angereichert und aufgereinigt werden. Hierfür wurde der Proteinextrakt über ein präparatives SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Bande von GST-BFLF2-HA ausgeschnitten. Mit Hilfe von NH_4HCO_3 -Puffer wurde das Protein eluiert und anschließend gefriergetrocknet. Zur Entfernung der Acrylamidreste sowie anderer eventueller Verunreinigungen wurde das gefriergetrocknete Pellet in PBS-Puffer aufgenommen und über eine NAPTM-25 Säule (Pharmacia Biotech) aufgereinigt. Diese mit SephadexTM-G25-Sepharose beladene Säule wirkt wie ein Molekularsieb und lässt große Moleküle nahezu ungehindert passieren, während kleinere zurückgehalten werden. So konnte gereinigtes Protein gewonnen werden, welches - in PBS gelöst - den Ratten injiziert wurde.

Zum späteren Nachweis der spezifischen monoklonalen BFLF2-Antikörper in den Kulturüberständen mit Hilfe von ELISA wurden native SDS-freie Lysozym-Extrakte aus den induzierten BL21/DE3-Bakterien hergestellt. Die Bakterien wurden in TNE-Puffer mit Lysozym angedaut und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Aliquots dieser Lysozym-Extrakte sowie ein Aliquot des über die Säule aufgereinigten Proteinextraktes wurden zusammen mit den Extrakten von vor und nach der Induktion in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (Abbildung 21). Im Weiteren wurde der Proteinnachweis mit Hilfe eines GST-Antikörpers im Western Blot erbracht (Abbildung 22).

In der Coomassie-Färbung ist zu sehen, dass das BFLF2-Fusionsprotein in den einzelnen Extraktionsschritten aufgereinigt wird: Die Menge an BFLF2-Fusionsprotein nimmt bei jedem Schritt ab [Abbildung 21; Spur 3-5, L (Lysozym) 1-3]. Im Lysozym-Extrakt 3 war das Fusionsprotein fast nicht mehr nachweisbar, weswegen für die ELISA-Tests nur die Lysozym-Extrakte 1 und 2 eingesetzt wurden. Um eine noch effektivere Aufreinigung zu erzielen, wurde ein präparatives Gel verwendet. Das so gewonnene aufgereinigte Protein ist in Spur 6 [E (Eluat präparatives Gel)] zu sehen. Hier ist nur noch die Bande des Fusionsproteins deutlich sichtbar, während die anderen Banden komplett verschwunden oder nur noch undeutlich erkennbar sind. Beim immunologischen Nachweis des Fusionsproteins mit Hilfe des GST-Antikörpers im Western Blot zeigt sich dasselbe Bandenverteilungsmuster: Die drei Lysozym-Extrakte (Abbildung 22, Spur 3-5) zeigen wieder eine abnehmende Proteinmenge in den einzelnen Extraktionsschritten, wobei neben der schwachen Bande des Fusionsproteins zwei bis drei stärkere Banden unter 30 kDa sichtbar sind. In der 0h-Kontrolle - vor der Induktion - ist nur eine schwache Bande des Fusionsproteins zu sehen (Spur 1), während in der 4h-Kontrolle - nach der Induktion - neben der starken Bande des Fusionsproteins und den Banden von dessen Abbauprodukten eine Vielzahl an Banden deutlich erscheint. Auch hier ist die endgültige Aufreinigung des Proteins in Spur 6 zu erkennen. Dessen Bande ist sehr deutlich, aber es zeigen sich - wenn auch stark verringert - Abbauprodukte und GST alleine.

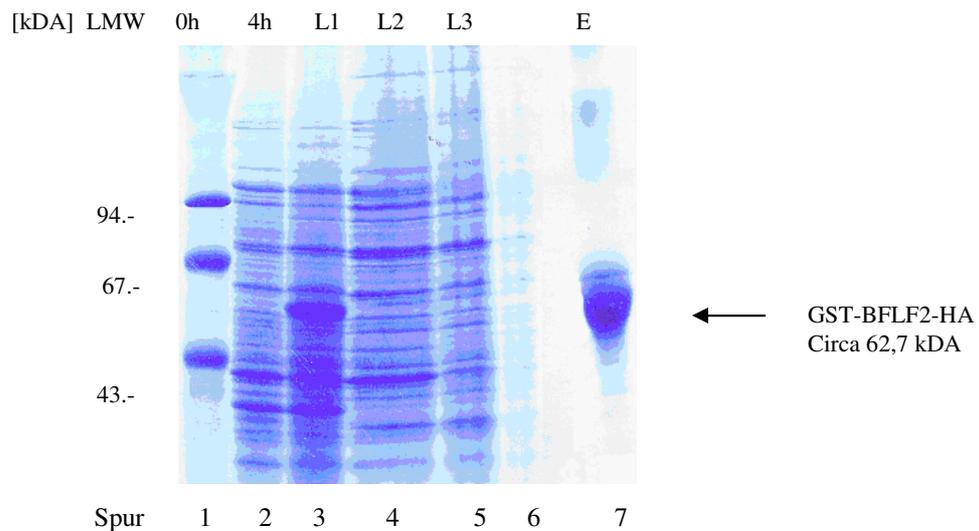


Abb. 21: Aufreinigung des GST-BFLF2-HA-Fusionsproteins: Coomassie-Gel

BL21/DE3-Bakterien wurden mit pGEX-BFLF2-HA transformiert und die Expression der Fusionsproteine mit Hilfe von IPTG induziert. Native Lysozymextrakte wurden in drei verschiedenen Anreicherungsstufen, mit L1-3 gekennzeichnet und in Spur 3 bis 5 aufgetragen, hergestellt. Im Weiteren ist der Acrylamid-freie, angereicherte Proteinextrakt, markiert mit E, in Spur 6 aufgetragen. Auch die Proteinextrakte vor (0h) und nach (4h) der Induktion mit IPTG wurden nochmals in Spur 1 und 2 auf ein 12,5%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blau.

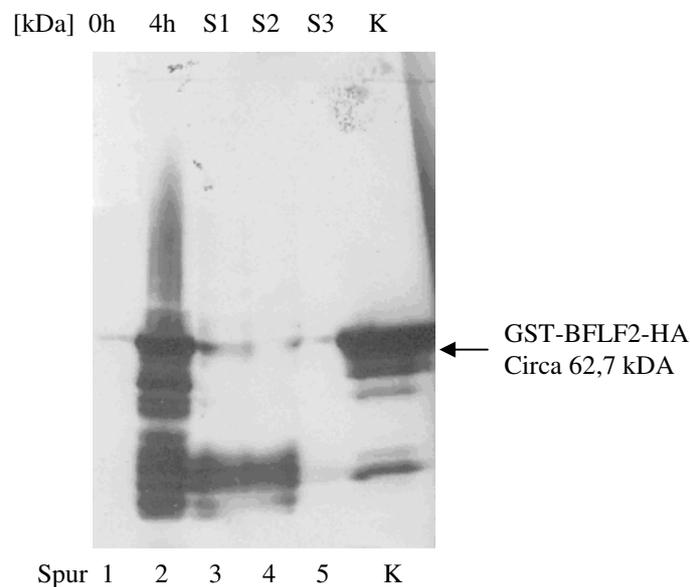


Abb. 22: Aufreinigung des GST-BFLF2-HA-Fusionsproteins: Western Blot

BL21/DE3-Bakterien wurden mit pGEX-BFLF2-HA transformiert und die Expression der Fusionsproteine mit Hilfe von IPTG induziert. Native Lysozymextrakte wurden in drei verschiedenen Anreicherungsstufen, mit L1-3 gekennzeichnet und in Spur 3 bis 5 aufgetragen, hergestellt. Im Weiteren ist der Acrylamid-freie, angereicherte Proteinextrakt, markiert mit E, in Spur 6 aufgetragen. Auch die Proteinextrakte vor (0h) und nach (4h) der Induktion mit IPTG wurden nochmals in Spur 1 und 2 auf ein 12,5%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Mit Hilfe eines GST-spezifischen Antikörpers wurde der immunologische Nachweis erbracht.

4.2 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen BFLF2

Das gereinigte BFLF2-Fusionsprotein wurde von Frau Dr. Kremmer, GSF München, zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern aus Ratten verwendet. Sie schickte uns 30 primäre BFLF2-Antikörper zu, deren Spezifität im Western Blot überprüft werden musste. Zur Expression von HA-markiertem BFLF2-Protein wurde ein pSG5-BFLF2-HA Konstrukt hergestellt. Hierbei diente das HA-„Tag“ als zusätzliche Kontrolle. Nur Antikörper, die in der Lage waren, dieses Protein im Western Blot zu erkennen, wurden zum immunologischen Nachweis des BFLF2-Proteins in BL41-, Raji- und TPA-induzierten Raji-B-Zelllinien verwendet. Zeigten Antikörper in diesen Versuchen ein zufriedenstellendes Ergebnis, wurden sie von Frau Dr. Kremmer stabil subkloniert.

4.2.1 Herstellung eines pSG5-BFLF2-HA Konstruktes

Zur Expression von BFLF2 in Säugerzellen musste die kodierende Sequenz in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert werden. Zunächst wurde die kodierende Sequenz des BFLF2-Gens mit Hilfe der Primer 3'Eco BFLF2 HA und BFLF2-EcoR1-for (siehe 2.10) aus genomischer B95-8-DNA amplifiziert (Abbildung 23, links). So wurde vor das Stop-Codon von BFLF2 ein HA-„Tag“ gesetzt. Das Fragment besitzt eine Größe von 1034 bp. Diese DNA wurde dann in den zuvor mit EcoRI geschnittenen und dephosphorylierten pSG5-Vektor einkloniert. Mit dem Restriktionsenzym Sal I wurde zur Überprüfung der Orientierung des Inserts ein Kontrollverdau durchgeführt (Abbildung 23, rechts). In der Spur 1 des Kontrollverdaus ist exemplarisch ein Klon mit richtiger Orientierung zu sehen, während Spur 2 einen Klon ohne Insert zeigt. Die positiven Klone wurden sequenziert und zur Expression von HA-markiertem BFLF2-Protein in COS-Zellen verwendet. Aus diesen Zellen wurden Zellextrakte zur Überprüfung der Spezifität der monoklonalen Antikörper im Western Blot hergestellt.

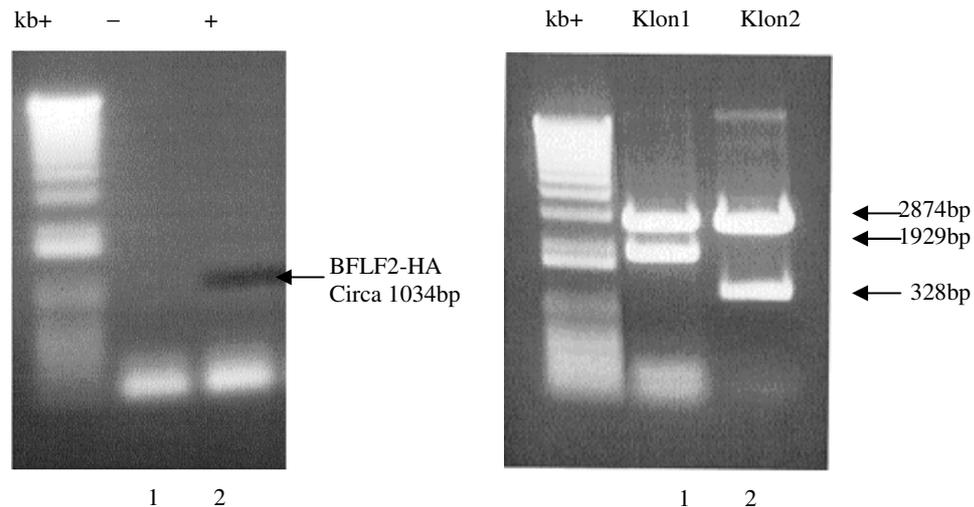


Abb. 23: Klonierung des BFLF2-HA Expressionsvektors

Links: 1%iges Agarosegel zur Kontrolle der PCR von BFLF2-HA. Die Negativkontrolle ist in Spur 1 aufgetragen, das Amplifikat der PCR-Reaktion in Spur 2 (die Bande wurde vor dem Fotografieren ausgeschnitten).

Rechts: 1%iges Agarosegel zur Kontrolle der Sal I-Restriktion verschiedener pSG5-BFLF2-HA Klone. Abgebildet sind exemplarisch zwei Klone. (sense-Orientierung: 2874 bp + 1929 bp + 328 bp; antisense-Orientierung: 2874 bp + 1189 bp + 1068 bp; Vektor ohne Insert: 2874 bp + 1224 bp)

4.2.2 Untersuchung der BFLF2-Antikörper auf Antigen-Spezifität

Zur Untersuchung der monoklonalen Antikörper auf ihre Antigenerkennung im Western Blot wurde HA-markiertes BFLF2-Protein, das in COS-Zellen exprimiert wurde, eingesetzt. Pro Spur wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen, auf einem 10%igen PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Danach wurden die verschiedenen Antikörper im Western Blot getestet. Abbildung 24 zeigt das Ergebnis dieser Immunoblots. Außer bei 3B2 ist bei allen getesteten Antikörpern bei ungefähr 36 kDa eine deutliche Bande zu erkennen. Aber es sind auch schwächere Banden bei allen Antikörpern bei höherem Molekulargewicht sichtbar. Alle Antikörper zeigen also eine schwache Kreuzreaktivität in höheren Molekulargewichtsbereichen.

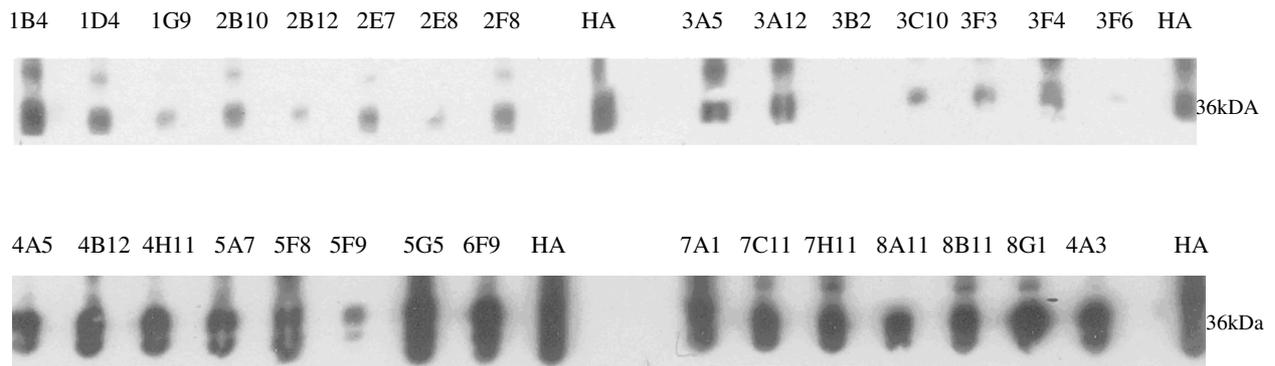


Abb. 24: Nachweis von BFLF2-HA im Western-Blot

Von BFLF2-HA exprimierenden COS-Zellen wurden Proteinextrakte hergestellt, von denen je 15 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen wurde. Mit den von Frau Dr. Kremmer hergestellten Antikörpern wurde der Nachweis in einer Verdünnung von 1:50 erbracht. Der HA-Antikörper dient als Positivkontrolle. Die Bezeichnung des jeweiligen Antikörpers ist über der entsprechenden Spur vermerkt.

Ausgewählte Antikörper, wie zum Beispiel 7H11 und 3F3 wurden auf die Antigenerkennung von endogen exprimiertem BFLF2 in B-Zellen getestet. Es wurden dafür verschiedene Zellextrakte hergestellt. Die EBV-negative BL41-Zelllinie wurde als Negativkontrolle verwendet, da hier kein endogenes BFLF2 exprimiert wird und somit kein BFLF2-Nachweis möglich ist. BFLF2 ist ein Protein, das früh während der lytischen Replikation des EBV exprimiert wird. Daher sollte es nicht in EBV-positiven Zellen, die latent infiziert sind, aber in EBV-positiven Zellen, in denen sich das Virus lytisch vermehrt, nachweisbar sein. Deshalb wurden Extrakte aus den EBV-positiven Zelllinien Raji und B95-8-CBL mit und ohne Phorbol ester TPA - dieser induziert in latent infizierten Zelllinien den lytischen Zyklus - hergestellt. Das Ergebnis des immunologischen Nachweises von BFLF2 in den oben beschriebenen B-Zellextrakten ist in Abbildung 25 zu sehen: Der Antikörper 7C11 zeigt sowohl in uninduzierten als auch in induzierten B-Zellen eine Bande bei etwa 35 kDa, jedoch erscheint die Bande in Spur 3 stärker. Die Spur 1 mit der Negativkontrolle ist blank. Die Antikörper 7H11 und 3F3 zeigen eine Bande auf richtiger Höhe im induzierten Extrakt, keine Banden bei der Negativkontrolle und bei den nicht-induzierten Extrakten. Bei dem Antikörper 8B11 erscheinen leicht angedeutete Banden bei etwa 35 kDa in allen drei Zellextrakten. Das in COS-Zellen exprimierte BFLF2-HA, welches in Spur 4 aufgetragen ist, wurde - wie oben auch - von allen Antikörpern erkannt. Die Positivkontrolle (HA) weist für BFLF2-HA eine

Bande bei etwa 36 kDa auf - allerdings zeigt sie auch zwei schwächere Banden bei niedrigerem Molekulargewicht.

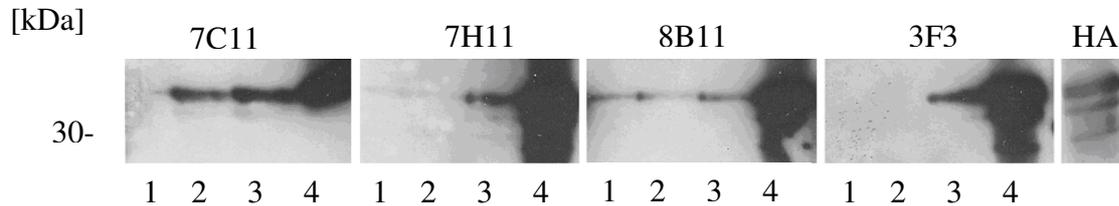


Abb. 25: Nachweis von endogenem BFLF2 durch ausgewählte BFLF2-Antikörper im Western Blot

Je 30 µg Gesamtprotein verschiedener B-Zellextrakte wurden pro Spur aufgetragen. In der Spur 1 wurde der Extrakt EBV-negativer BL41-Zellen, in Spur 2 der Extrakt EBV-positiver Raji-Zellen ohne Induktion mit TPA und in Spur 3 mit Induktion mit TPA aufgetragen. Der Extrakt von COS-Zellen, die BFLF2-HA überexprimieren, wurde in Spur 4 aufgetragen. Der Nachweis von endogenem BFLF2 erfolgt mit den über den Einzelabbildungen angegebenen BFLF2-Antikörpern in einer Verdünnung von 1:50. Der COS-Zellextrakt, gekennzeichnet mit HA, wurde als Positivkontrolle aufgetragen und, da BFLF2 mit HA markiert wurde, mit einem HA-Antikörper in der Verdünnung 1:200 nachgewiesen.

Das beste Ergebnis lieferten die Antikörper 7H11 und 3F3, weswegen diese erneut im Western Blot auf Antigenerkennung auch in anderen EBV-positiven Zellen getestet wurden. Dies ist in Abbildung 26 zu sehen. Es wurde ein 293T-Zellextrakt mit überexprimiertem BFLF2 und zwei Extrakte der EBV-positiven Zelllinien B95-8 und Raji, sowohl TPA-induziert als auch nicht induziert, eingesetzt. Bei beiden getesteten Antikörpern ist eine Bande bei etwa 35 kDa in den TPA-induzierten, EBV-positiven B-Zellextrakten und in den 293T-Zellextrakten zu sehen. In den nicht-induzierten B-Zellextrakten waren keine Banden sichtbar.

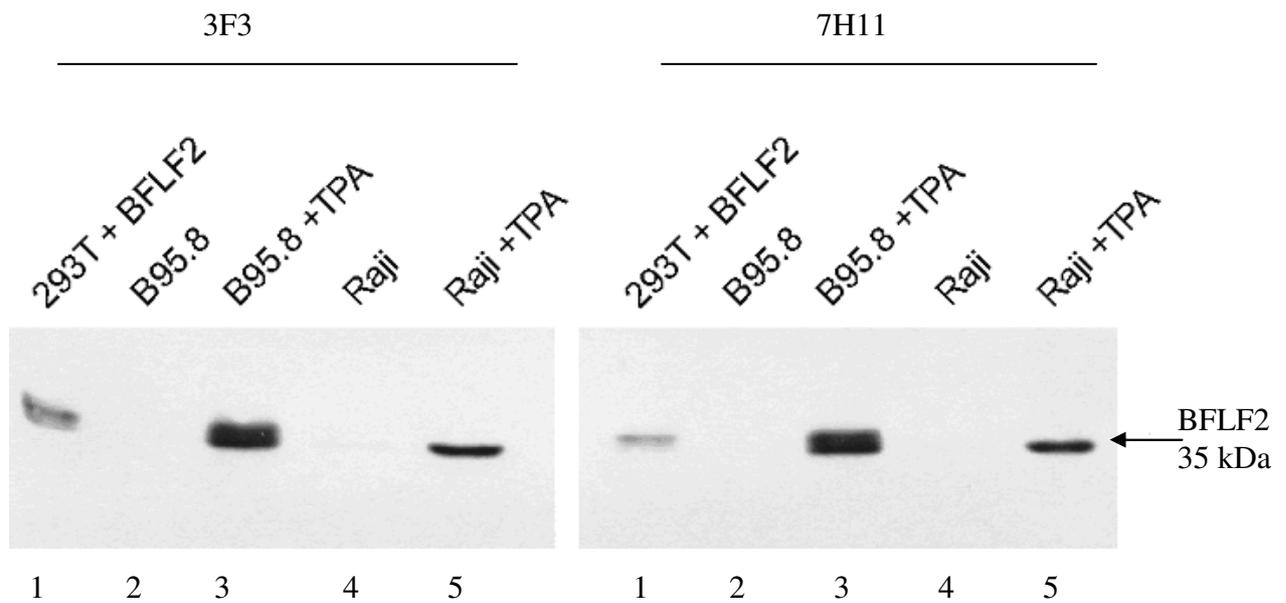


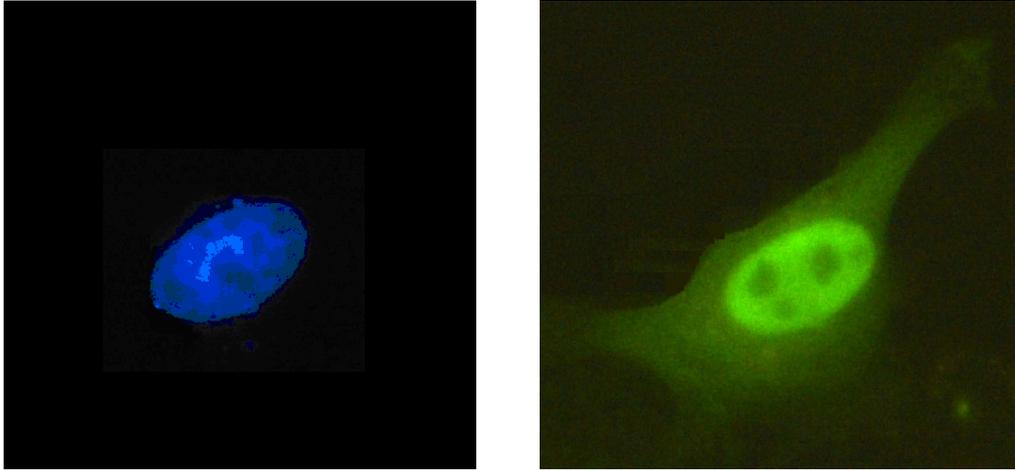
Abb. 26: Nachweis von BFLF2 im Western Blot durch die BFLF2-Antikörper 3F3 und 7H11

Je 30 μ g Gesamtprotein verschiedener B-Zell-extrakte wurden pro Spur aufgetragen. In Spur 1 wurde der Extrakt von 293T-Zellen, die BFLF2 überexprimieren, aufgetragen. Der Extrakt EBV-positiver B95-8-Zellen wurde in Spur 2 ohne TPA-Induktion und in Spur 3 mit TPA-Induktion aufgetragen. Der Extrakt EBV-positiver Raji-Zellen wurde in Spur 4 ohne TPA-Induktion und in Spur 5 mit TPA-Induktion aufgetragen. Der Nachweis von endogenem BFLF2 erfolgte mit den beiden BFLF2-Antikörpern 3F3 und 7H11 in einer Verdünnung von 1:50.

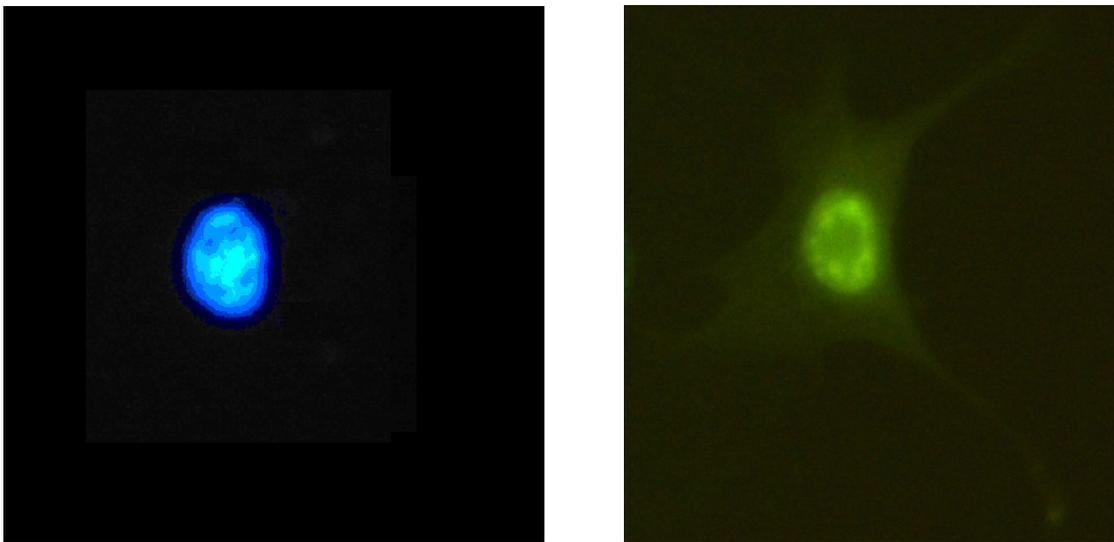
4.3 Subzelluläre Lokalisation von BFLF2

BFLF2 wird früh im lytischen Zyklus repliziert und ist - wie sein Homolog UL31 - in der Kernmembran lokalisiert, vorzugsweise in Gebieten, wo die Knospung der Kernkapside stattfindet, was mit Hilfe von Zellfraktionsexperimenten und Immunlokalisationen gezeigt werden konnte (Farina, Santerelli et al., 2000). BFRF1 ist beteiligt an dem Transport reifer Virionen durch die Kernmembran. Es stellt eine strukturelle Komponente der viralen Partikel dar (Farina, Santerelli et al., 2000). Dies zeigt, dass es sich bei BFRF1 um ein Schlüsselprotein für die EBV-Reifung handelt. BFLF2 wird zum Zusammenbau von intrazellulären Virionen benötigt, ist jedoch keine Komponente reifer Viren. Es interagiert mit dem oben beschriebenen BFRF1, was auch so bei ihren Homologen UL34 und UL31 ist und in Coimmunopräzipitationen nachgewiesen werden konnte (Gonella, Farina et al., 2004). Die beiden Proteine colokalisieren an der Kernmembran. Um diese hier beschriebene Lokalisation von BFLF2 zeigen zu können, wurden mit den von Frau Dr. Kremmer hergestellten BFLF2-Antikörpern Immunfluoreszenzen durchgeführt. Es wurde auch der von Gonella et al. verwendete BFLF2-Antikörper C1 eingesetzt, um zu zeigen, dass die verschiedenen Antikörper zum gleichen Ergebnis führen. Dazu wurden HeLa-Zellen in 6-Loch-Platten auf Deckgläsern ausgesät und mit 3 µg BFLF2-HA DNA (siehe 4.2.1) sowie mit NanofectinTM nach Herstellerangaben transient transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen - wie unter 3.8.7 beschrieben - mit dem HA-spezifischen monoklonalen Antikörper 3F10 beziehungsweise den monoklonalen BFLF2-Antikörpern C1 (von Gonella et al.), 3F3 oder 7H11 und einem TRITC-konjugierten anti-Ratte IgG Sekundärantikörper angefärbt. Die Kerne wurden mit DAPI dargestellt (Abbildung 27).

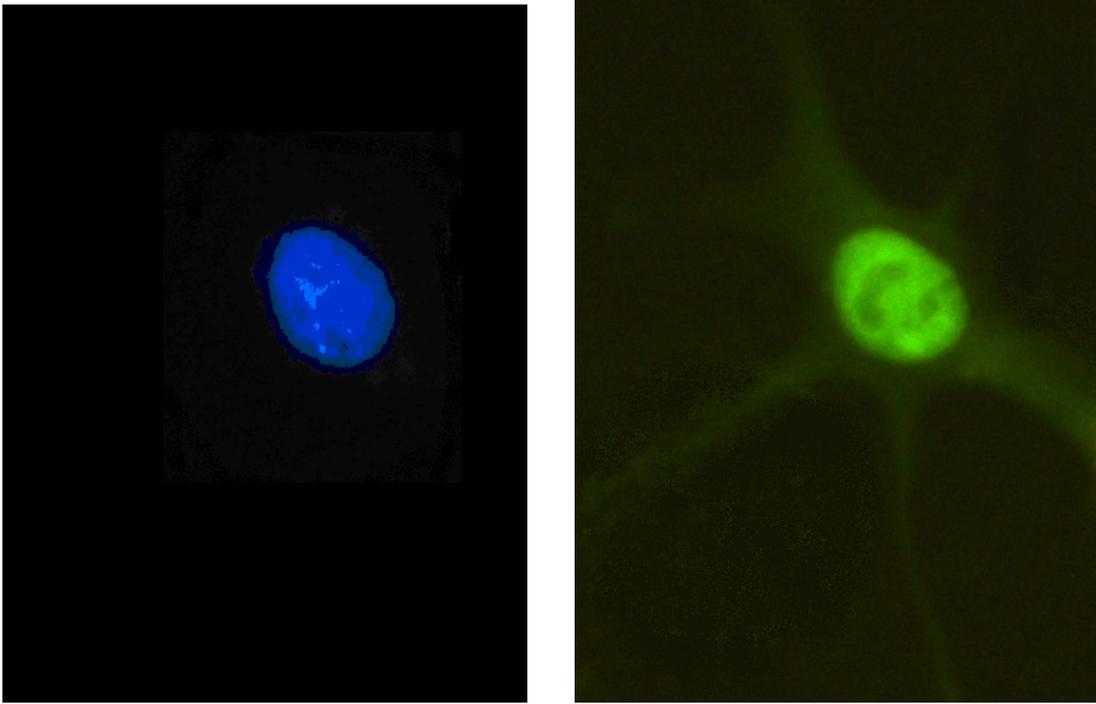
Auf der linken Seite ist jeweils die DAPI-Färbung abgebildet, worauf lediglich der Zellkern zu sehen ist. Jeweils auf der rechten Seite ist die Färbung mit den verschiedenen oben beschriebenen Antikörpern abgebildet. Wie erwartet, konnte sowohl in der Kontrollfärbung mit dem HA-spezifischen monoklonalen Antikörper 3F10 als auch mit den drei monoklonalen BFLF2-Antikörpern der Kern angefärbt werden. Dies zeigt, dass das BFLF2-Protein an der Kernmembran lokalisiert ist und dass die beiden eigenen Antikörper in Immunfluoreszenzen zuverlässig eingesetzt werden können.



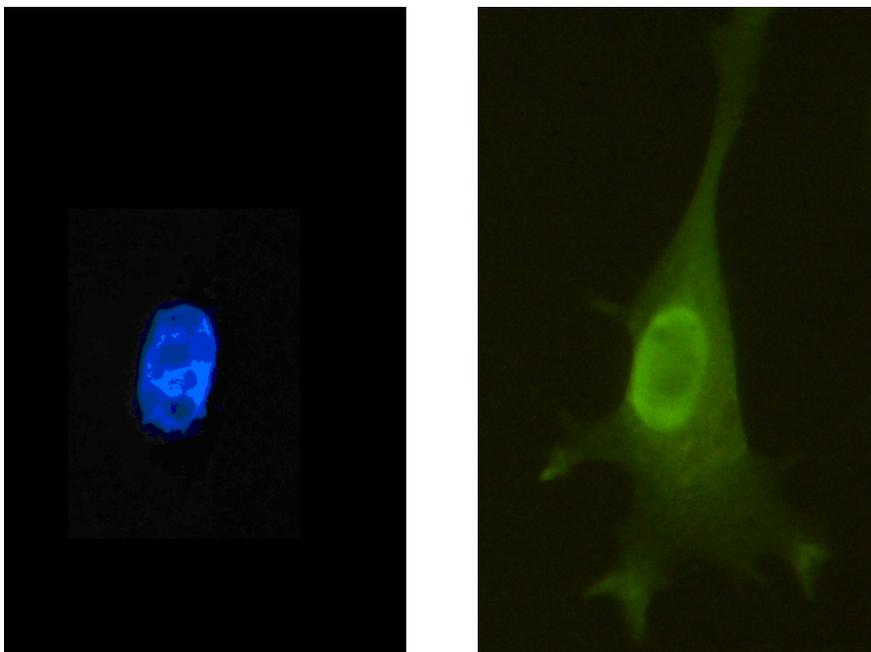
Reihe 1 der Abb. 27: Positivkontrolle mit dem HA-spezifischen Antikörper 3F10 in einer Verdünnung von 1:100



Reihe 2 der Abb. 27: Positivkontrolle mit dem BFLF2-spezifischen Antikörper C1 von Gonella et al. in einer Verdünnung von 1:20



Reihe 3 der Abb. 27: Immunfluoreszenz mit dem BFLF2-spezifischen Antikörper 3F3 in einer Verdünnung von 1:10



Reihe 4 der Abb. 27: Immunfluoreszenz mit dem BFLF2-spezifischen Antikörper 7H11 in einer Verdünnung von 1:10

Abb. 27: Immunfluoreszenz zur subzellulären Lokalisation von BFLF2

HeLa-Zellen wurden mit 3 µg BFLF2-HA transfiziert.

In der 1. Reihe ist die Positivkontrolle mit dem HA-spezifischen 3F10-Antikörper abgebildet. Die 2. Reihe zeigt den BFLF2-spezifischen Antikörper von Gonella et al. C1. Die BFLF2-Antikörper 3F3 und 7H11 sind in den Reihen 3 und 4 zu sehen. Ein TRITC-konjugierter anti-Ratte IgG-Antikörper diente als Sekundärantikörper.

Links: Kerndarstellung der HeLa-Zellen mit der DAPI-Färbung

Rechts: Fluoreszenz der mit BFLF2 transfizierten HeLA-Zellen

4.4 Verifizierung der vorhergesagten Ziel-mRNAs der EBV-kodierten microRNAs miR-BHRF1-2 und miR-BHRF1-3

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der EBV-kodierten microRNAs miR-BHRF1-2 und 1-3. Fünf verschiedene microRNAs konnten ursprünglich in EBV-transformierten Zellen 2004 identifiziert werden (Pfeffer, Zavolan et al., 2004). Die beiden obengenannten microRNAs sowie die miR-BHRF1-1 gehören zum BHRF1-Cluster. Anhand bioinformatischer Untersuchungen konnte eine Reihe möglicher Ziel-mRNAs für diese fünf EBV-kodierten microRNAs vorhergesagt werden (Pfeffer, Zavolan et al., 2004). Hierunter befand sich auch die mRNA von BFLF2 für die miR-BHRF1-2 und 1-3. In den hier durchgeführten Untersuchungen sollte BFLF2 als potentiell Ziel dieser microRNAs experimentell validiert werden. Dazu wurden die microRNAs in geeignete Expressionsvektoren kloniert und deren Expression im Northern Blot nachgewiesen. Der Teil der 3'UTR von BFLF2, der die potentiellen Bindungsstellen für die microRNAs enthält, wurde in einen Luciferase-Vektor - direkt 3' hinter das Luciferase Leseraster - kloniert, um zu untersuchen, ob eine microRNA-vermittelte Regulation der Reporter-Gen-Expression stattfindet. Dies wurde in einem Luciferase-Assay durchgeführt.

4.4.1 Klonierung der EBV microRNAs miR-BHRF1-2 und 1-3 in den Expressionsvektor pCEP4

Um Untersuchungen hinsichtlich der Funktion der BHRF1-microRNAs durchführen zu können, mussten diese in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden. Durch Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide - welche die Sequenz der miR-BHRF1-1, der miR-BHRF1-2 beziehungsweise der miR-BHRF1-3 Vorläufer-miRNA beinhalten und geeignete Restriktionsstellen an beiden Enden besaßen (siehe 2.10) - konnte ein doppelsträngiges Insert mit einer Länge von 78 bp bei miR-BHRF1-2 und 76 bp bei miR-BHRF1-3 hergestellt werden. Diese wurden in den zuvor aufgeschnittenen und dephosphorylierten Vektor pCEP4 (Clontech) über die Bgl II und Hind III Schnittstelle inkliniert. Da der Probeverfall auf Grund des kurzen Inserts kein brauchbares Ergebnis erbrachte, wurde mit Hilfe von PCR das Einklonieren beziehungsweise die Orientierung des Inserts überprüft. Die dafür verwendeten Primer waren pCEP forpr, pCEP revpr sowie für

BHRF1-1 BHRF1-1forpr, für BHRF1-2 BHRF1-2forpr und für BHRF1-3 BHRF1-3forpr (siehe 2.10). Anhand der Länge des Amplifikats konnte das Insert sowie dessen Orientierung nachgewiesen werden. Die Abbildung 28 zeigt eine Probe-PCR für BHRF1-1, 1-2 und 1-3. In den Spuren, die mit a gekennzeichnet sind, wurde als 3'Primer der Primer pCEP-forpr und als 5'Primer der Primer BHRF1-1forpr, BHRF1-2forpr beziehungsweise BHRF1-3forpr verwendet. Wenn das Insert in sense-Orientierung vorliegt, ist in diesen Spuren keine Bande zu erwarten. Liegt es in antisense vor, zeigt sich eine Bande bei 400 bp. In den mit b gekennzeichneten Spuren wurde als 3'Primer der Primer pCEP-revpr und als 5'Primer wieder die oben genannten benutzt. Liegt das Insert in sense-Orientierung vor, muss hier eine Bande bei 400 bp zu sehen sein. Wenn es in antisense vorliegt, wird keine Bande sichtbar. Ist in keiner Spur eine Bande zu sehen, lag kein Insert vor. Die miR-BHRF1-1 ist in Spur 3b in sense und in Spur 8a in antisense inkloniert. Wie in Spur 5b und 8b zu sehen ist, liegt die miR-BHRF1-2 in diesen Klonen in sense-Orientierung im pCEP4-Vektor vor. Die miR-BHRF1-3 ist - wie in Spur 4c zu erkennen - in diesem Klon in sense und - wie in Spur 5c abgebildet - in diesem Klon in antisense-Orientierung in den pCEP4-Vektor inkloniert.

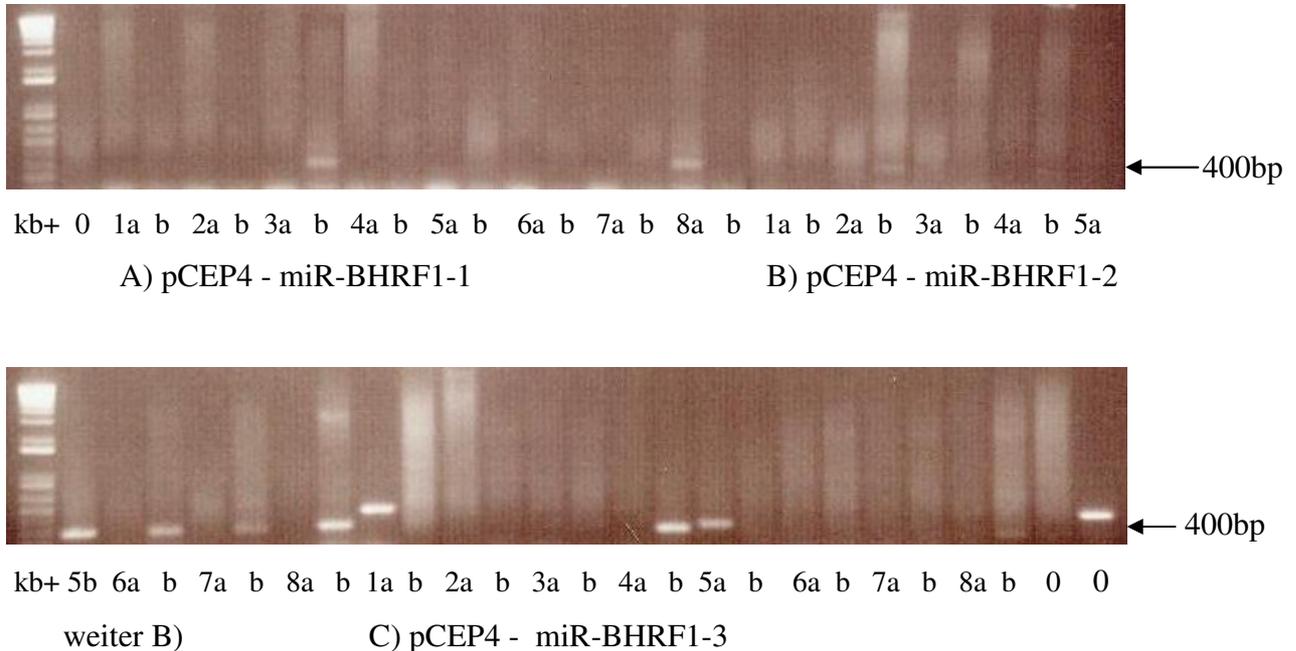


Abb. 28: Probe-PCR zur Kontrolle, ob ein Insert in pCEP4 vorliegt und zur Überprüfung der Orientierung des Inserts

In der oberen Abbildung sieht man in den ersten acht Spuren die Probe-PCR für die Klonierung der miR-BHRF1-1 in den pCEP4-Vektor, daran anschließend und in die untere Abbildung weitergehend ist die Probe-PCR für die Klonierung der miR-BHRF1-2 in den pCEP4-Vektor dargestellt und als letztes ist die Probe-PCR für die Klonierung der miR-BHRF1-3 in den pCEP4-Vektor abgebildet. In den Spuren, die mit a gekennzeichnet sind, wurde als 3'Primer der Primer pCEP-forpr und als

5' Primer der Primer BHRF1-1forpr beziehungsweise BHRF1-2forpr beziehungsweise BHRF1-3forpr verwendet. Wenn das Insert in sense-Orientierung vorliegt, ist in diesen Spuren keine Bande zu erwarten. Liegt es in antisense vor, zeigt sich eine Bande bei 400 bp. In den mit b gekennzeichneten Spuren wurde als 3' Primer der Primer pCEP-revpr und als 5' Primer wieder die oben genannten benutzt. Liegt das Insert in sense-Orientierung vor, muss hier eine Bande bei 400 bp zu sehen sein. Wenn es in antisense vorliegt, wird keine Bande sichtbar. Ist in keiner Spur eine Bande zu sehen, lag kein Insert vor. Die miR-BHRF1-1 liegt in dem Klon 3b in sense-Orientierung, im Klon 8a in antisense-Orientierung vor. Die miR-BHRF1-2 zeigt sich in den Klonen 5b und 8b in sense-Orientierung und die miR-BHRF1-3 liegt in 4c in sense und in 5c in antisense-Orientierung vor. Die Proben wurden auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen.

4.4.2 Klonierung der 3'UTR von BFLF2

Um einen spezifischen Effekt der miR-BHRF1-2 und miR-BHRF1-3 auf die 3'UTR von BFLF2 nachweisen zu können, wurden Luciferase-Reportergen-Assays durchgeführt. Hierzu war die Herstellung eines Reportergenkonstruktes notwendig, das den betreffenden Bereich der 3'UTR von BFLF2 unmittelbar hinter dem Luciferase ORF beinhaltet. Eine negative Regulation der Luciferase-Expression, die durch Binden der genannten microRNAs an den angefügten Abschnitt der 3'UTR vermittelt wird, kann somit durch Messen der Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden. Die komplette 3'UTR des BFLF2-Gens [Position 54968-55409 des EBV Genoms (GeneBank AJ507799)] mit einer Länge von 432 bp, wurde mit den Primern 5'BFLF2-3'UTR und 3'BFLF2-3'UTR (siehe 2.10) aus genomischer B95-8 DNA amplifiziert (Abbildung 29). Die vorhergesagten Bindestellen der microRNAs befinden sich bei Position 55176 - 55198 für die miR-BHRF1-2 und bei Position 55256 - 55278 für die miR-BHRF1-3. Über die angefügten Nhe I-Schnittstellen wurde diese Sequenz in den zuvor Nhe I geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pGL3-Promotor eingefügt. Zur Kontrolle und Bestimmung der Orientierung des Inserts wurde das pGL3-Prom-BFLF2-3'UTR Konstrukt mit Bgl II geschnitten (Abbildung 30). Bei Vorliegen einer sense-Orientierung sind die zu erwartenden Banden bei circa 2300 und 300 bp zu finden. Wenn es sich um antisense-Orientierung handelt, zeigen sich Banden bei ungefähr 3500 und 1900 bp. Nur in Spur 10 ist ein Klon in sense-Orientierung zu sehen, die anderen zeigen antisense. Dieser positive Klon wurde sequenziert und als Reporterplasmid für den Luciferase-Assay eingesetzt.

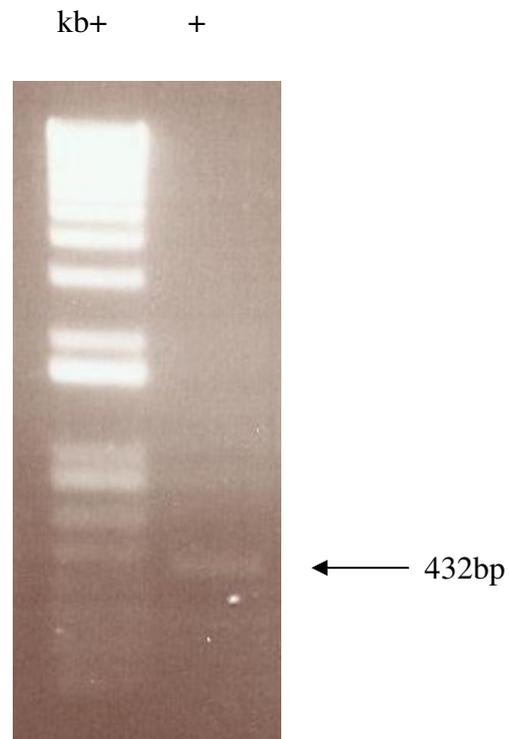


Abb. 29: PCR-Amplifikation von BFLF2-3'UTR

Einprozentiges Agarosegel zur Überprüfung der PCR zur Amplifikation von BFLF2-3'UTR. Als Template diente genomische B 95-8 DNA und die Annealingtemperatur betrug 58°C.

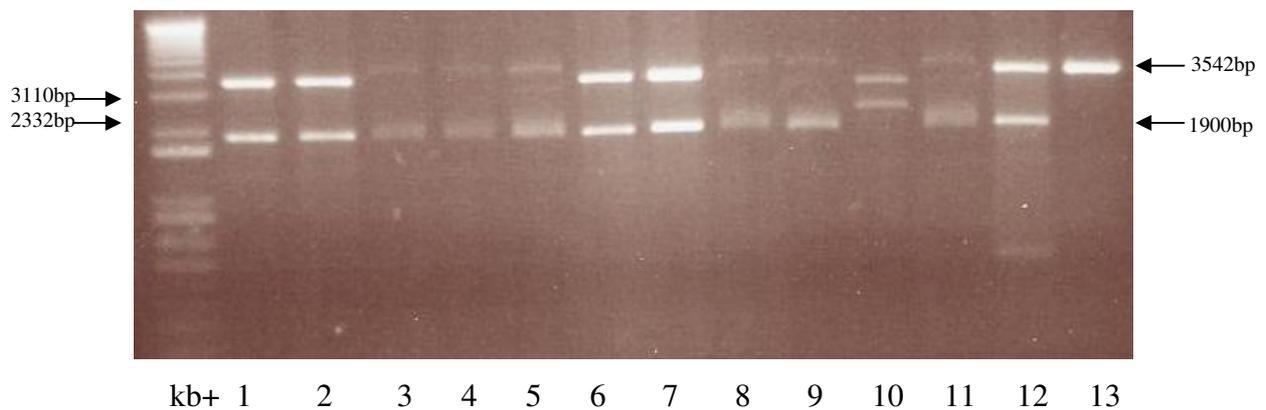


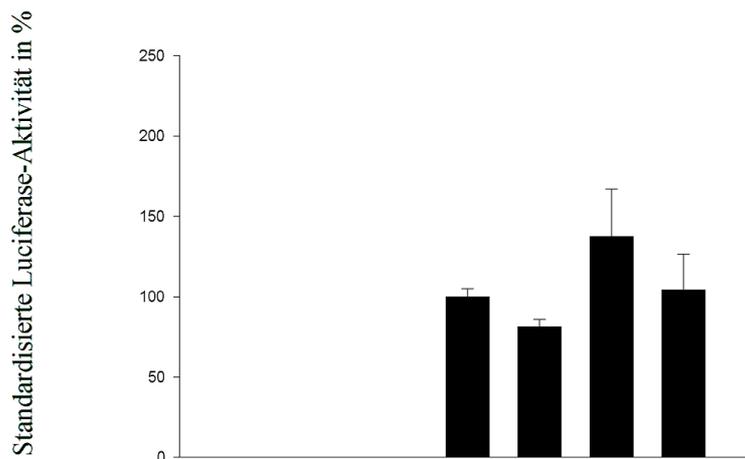
Abb. 30: Orientierungsverdau der pGL3-BFLF2-3'UTR-Konstrukte

Einprozentiges Agarosegel zur Überprüfung der Bgl II-Restriktion von pGL3-BFLF2-3'UTR (sense-Orientierung: 2332bp+ 3110bp antisense-Orientierung: 1900bp+3542bp). Demnach liegt die sense-Orientierung hier nur bei Klon 10 vor.

4.4.3 Regulierung der BFLF2-Expression durch die miR-BHRF1-2 und 1-3 im pCEP4-Vektor (Luciferase-Reportergen-Assay)

Zum Nachweis des negativ-regulatorischen Einflusses der miR-BHRF1-2 und 1-3 auf ihre vorhergesagte Ziel-mRNA BFLF2-3'UTR, wurden Luciferase-Reportergen-Assays durchgeführt. Hierfür wurden circa 10^5 293T-Zellen in 24-Loch-Platten ausgesät und gemäß Herstellerangaben (NanofectinTM) mit dem Nanofectin ITM-Reagenz transfiziert. Von den auf den pCEP4-Vektor basierenden miRNA-kodierenden Effektorstrukturen wurden 1,6 µg und von den pGL3-abgeleiteten Reporterstrukturen 0,2 µg eingesetzt. Zu allen Ansätzen wurden 0,2 µg des pEGFP-C1-Vektors hinzugefügt, um die spätere Transfektionseffizienzkontrolle im FACS durchführen zu können. Die DNA-Gesamtmenge betrug bei den pCEP4-Effektorstrukturen pro Transfektionsansatz 2 µg. Wenn es nötig war, wurde die DNA-Gesamtmenge mit Heringssperma-DNA ausgeglichen. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, die Luciferaseaktivität gemessen und mit der durchflusszytometrisch bestimmten Transfektionseffizienz standardisiert. Die Abbildungen 31a und b zeigen je ein Balkendiagramm der gemessenen und standardisierten Luciferase-Aktivität für die Regulierung der BFLF2-Expression durch pCEP4-BHRF1-2 und pCEP4-BHRF1-3.

In der Abbildung 31a sind zunächst die internen Kontrollen zu sehen. Man sieht, dass die Effektorplasmide alleine (pCEP4, pCEP4-BHRF1-2, pCEP4-BHRF1-3) keine Luciferase-Aktivität besitzen (Balken 1-3). Bei Transfektion von pGL3-Luciferase mit pCEP4 zeigt sich eine relativ hohe Luciferaseaktivität; diese wurde auf 100% gesetzt (Balken 4). Durch Zugabe der miR-BHRF1-3 einzeln beziehungsweise in Kombination mit der miR-BHRF1-2 zu pGL3-Luciferase zeigt sich eine Erhöhung der Luciferase-Aktivität (Balken 6+7), welche aber statistisch nicht signifikant sind. Bei der Zugabe von pCEP4-BHRF1-2 zu pGL3-Luciferase kommt es zu einer Abnahme von circa 5% (Balken 5); welche statistisch signifikant ist.



	1	2	3	4	5	6	7
pCEP4	+	-	-	+	-	-	-
pGL3Luc	-	-	-	+	+	+	+
miR-BHRF1-2	-	+	-	-	+	-	+
miR-BHRF1-3	-	-	+	-	-	+	+

Abb. 31a: Regulation der BFLF2-3'UTR durch BHRF1-2 und BHRF1-3 (in pCEP4)

Transfektion von 293T-Zellen mit 0,2 µg pEGFP-C1 und verschiedenen Kombinationen aus 0,2 µg Reporter- und 1,6 µg Effektorplasmiden (x-Achse). Die standardisierte relative Luciferase-Aktivität ist auf der y-Achse aufgetragen. Der Wert für pGL3-Luc und pCEP4 wurde auf 100% gesetzt. Die Balken stellen Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit je 2 Ansätzen dar. Der mittlere Fehler des Mittelwertes ist als T-Wert angegeben.

Interne Kontrollen zu diesem Versuchsaufbau: Die Effektorplasmide alleine zeigen keine Luciferase-Aktivität. Die Zugabe von miR-BHRF1-3 alleine beziehungsweise in Kombination mit miR-BHRF1-2 zu pGL3-Luciferase zeigen keine statistisch signifikanten Veränderungen. Die Zugabe der miR-BHRF1-2 zu pGL3-Luciferase führt zu einer statistisch signifikanten Reduktion um 5%.

In der Abbildung 31b ist nun der eigentliche Versuch abgebildet. Wieder wird gezeigt, dass die Effektorplasmide (pCEP4, pCEP4-BHRF1-2, pCEP4-BHRF1-3) alleine keine Luciferase-Aktivität besitzen (Balken 1-3). Die BFLF2-3'UTR-Luciferase wurde hier auf 100% gesetzt (Balken 4). Bei Transfektion von pGL3-BFLF2-3'UTR-Luciferase zusammen mit BHRF1-2 beziehungsweise 1-3 kommt es zu einer Abnahme der Luciferase-Aktivität um je circa 35% (Balken 5+6). Bei gleichzeitiger Transfektion von pGL3-BFLF2-3'UTR mit miR-BHRF1-2 und 1-3 nimmt die Luciferase-Aktivität um 50% ab (Balken 7).

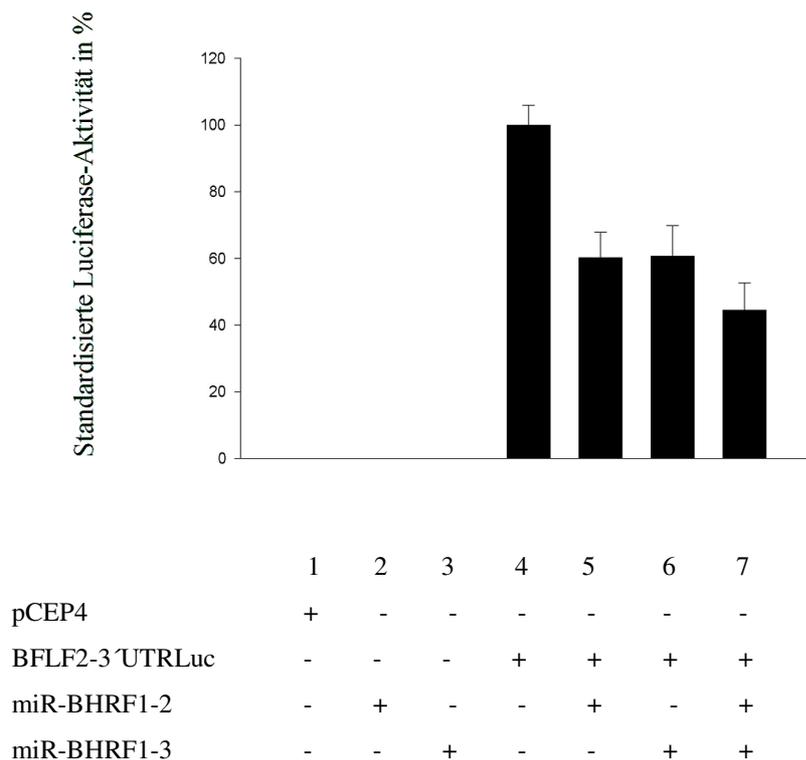


Abb. 31b: Regulation der BFLF2-3'UTR durch BHRF1-2 und BHRF1-3 (in pCEP4)

Transfektion von 293T-Zellen mit 0,2 µg pEGFP-C1 und verschiedenen Kombinationen aus 0,2 µg Reporter- und 1,6 µg Effektorplasmiden (x-Achse). Die standardisierte relative Luciferase-Aktivität ist auf der y-Achse aufgetragen. Die Balken stellen Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit je 2 Ansätzen dar. Der mittlere Fehler des Mittelwertes ist als T-Wert angegeben.

Eigentlicher Versuch: Die BFLF2-3'UTR-Luciferase wird auf 100% gesetzt. Bei Zugabe der miR-BHRF1-2 beziehungsweise der miR-BHRF1-3 zu BFLF2-3'UTR kommt es zur statistisch signifikanten Reduktion um circa 35%. Werden die beiden microRNAs zusammen dazu gegeben, kommt es zu einer statistisch signifikanten Reduktion um circa 50 %

4.4.4 Klonierung der EBV microRNAs miR-BHRF1-2 und 1-3 in den Expressionsvektor pSG5

Um zu zeigen, dass der beobachtete Effekt nicht vektorspezifisch ist, wurden die EBV microRNAs miR-BHRF1-2 und 1-3 auch in den Expressionsvektor pSG5 kloniert. Hier wurde jedoch nicht nur die Vorläufer-miRNA einkloniert, sondern circa 120 bp flankierend zu beiden Seiten der microRNAs. Da die beiden microRNAs miR-BHRF1-2 und 1-3 dicht beieinander liegen, konnten sie hier nur gemeinsam kloniert werden. Mit Hilfe der Primer 5'BHRF1-2+3 pSG5 und 3'BHRF1-2+3 pSG5 (siehe 2.10) wurden aus genomischer B95-8 DNA die beiden microRNAs wie beschrieben amplifiziert (Abbildung 32). Sowohl bei einer Annealingtemperatur von 58°C als auch von 60°C zeigt sich eine Bande bei circa 400 bp. Die

amplifizierte Sequenz hat eine Größe von 402 bp. Nach dem EcoR I-Verdau des Amplifikates wurde dieses in den zuvor EcoR I-geschnittenen und dephosphorylierten pSG5-Vektor kloniert. Die Abbildung 33 zeigt ein Kontrollgel für diese Klonierung. Zusätzlich wurde die Sequenz auch in den pGEM-Vektor kloniert, falls der andere Weg kein positives Ergebnis brächte. Da jedoch - wie die Abbildung zeigt - pSG5-Klone mit Insert gefunden wurden, wurde nur mit diesen weitergearbeitet. Zur Kontrolle der Orientierung des Inserts wurde ein Bgl II-Verdau durchgeführt (Abbildung 34). Positive Klone zeigen nur eine Bande, während antisense-Klone zwei Banden zeigen. Danach wurden die positiven Klone sequenziert und im Luciferase-Assay eingesetzt.

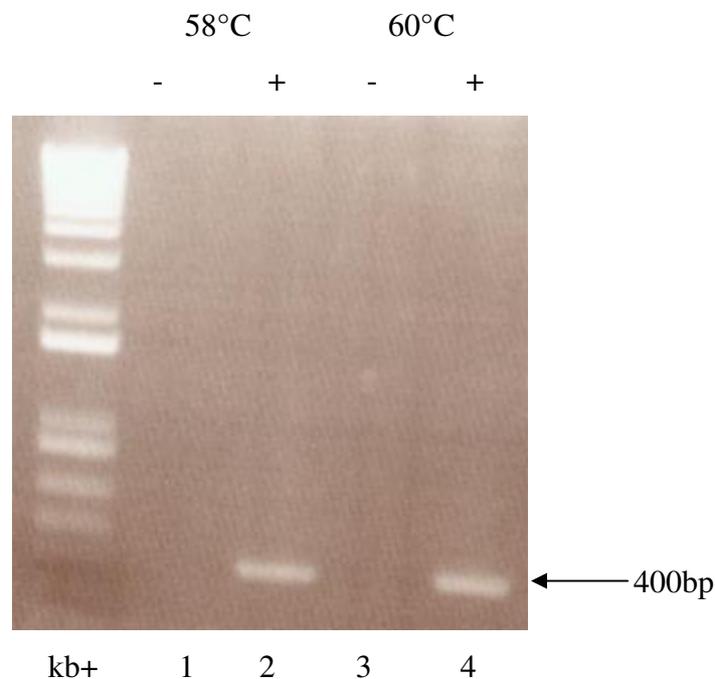


Abb. 32: PCR-Amplifikation von miR-BHRF1-2 und 1-3

2%iges Agarosegel zur Überprüfung der PCR der miR-BHRF1-2 und 1-3. In Spur 1 und 3 sind jeweils die Negativkontrollen aufgetragen. Als Template wurde genomische B95-8 DNA benutzt und die Annealingtemperatur betrug einmal 58°C und einmal 60°C.

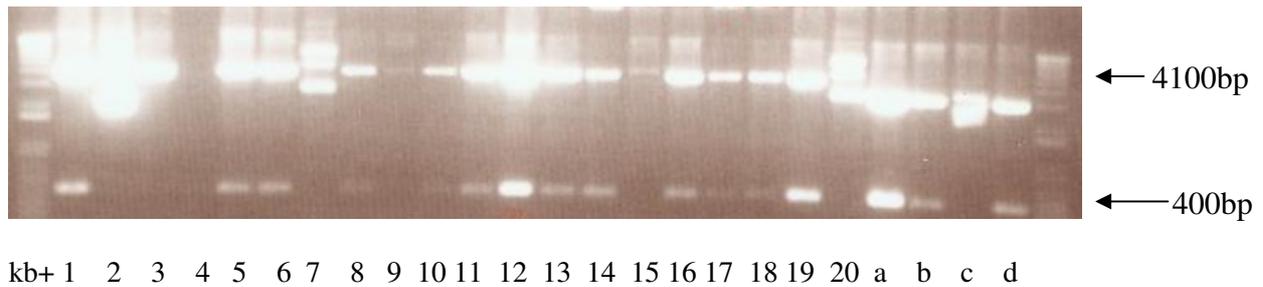


Abb. 33: Klonierung von pSG5-BHRF1-2+3 (Spur 1-20) und pGEM- BHRF1-2+3 (Spur a-d).

Auftragung der durch Minipräparation gewonnenen DNA, geschnitten mit EcoRI, auf ein einprozentiges Agarosegel. In den Spuren 1-20 wurden pSG5-Klone und in den Spuren a-d pGEM-Klone aufgetragen. Da positive pSG5-Klone (z.B. Spur 1) gefunden wurden, wurde weiterhin nur mit den pSG5-Klonen gearbeitet.

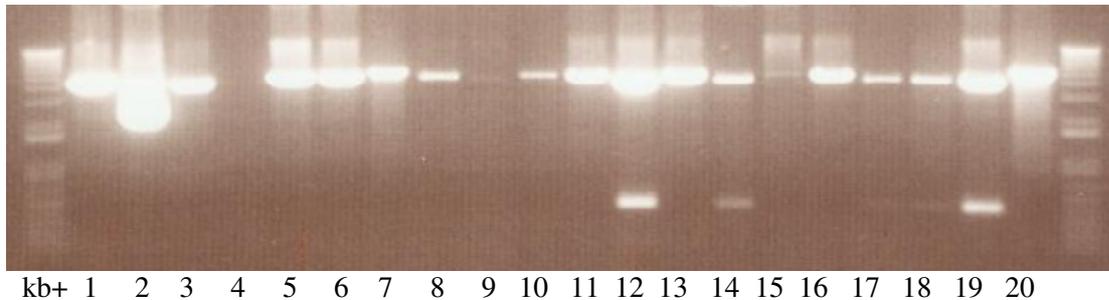


Abb. 34: Orientierungsverdau der pSG5-BHRF1-2+3 Klone

Probeverdau der pSG5-BHRF1-2+3-Klone mit Bgl II zur Kontrolle der Orientierung des Inserts, aufgetragen auf ein einprozentiges Agarosegel. In sense-Orientierung liegen zum Beispiel die Klone in Spur 1 und 5 vor, während die Klone in Spur 12 und 14 in anti-sense vorliegen.

4.4.5 Klonierung der für die BFLF2-3'UTR unspezifischen miR-BHRF1-1 und miR-155

Um zu zeigen, dass die microRNAs miR-BHRF1-2 und 1-3 eine spezifische Wirkung auf ihr Target BFLF2-3'UTR haben, sollten auch Versuche mit den beiden für BFLF2-3'UTR unspezifischen microRNAs miR-BHRF1-1 und miR-155 gemacht werden. Hierfür mussten auch diese beiden microRNAs in geeignete Expressionsvektoren kloniert werden.

Die Sequenz der BHRF1-1-Vorläufer-miRNA mit zu beiden Seiten je circa 120 flankierenden bp wurde mit Hilfe der Primer 5'BHRF1-1pSG5 und 3'BHRF1-1pSG5 (siehe 2.10) aus genomischer B95-8-DNA amplifiziert und anhand der EcoRI-Schnittstellen einkloniert.

Die Sequenz der miR-155 wurde mit Hilfe der Primer 5'Eco miR155 und 3'Bgl miR155 (siehe 2.10) aus genomischer BL41-Zell DNA amplifiziert. Durch die angefügten EcoRI-Schnittstellen wurde das Amplifikat in den zuvor EcoRI-geschnittenen und dephosphorylierten pSG5-Vektor kloniert. Zur Kontrolle und Bestimmung der Orientierung des Inserts wurde das Konstrukt in der 3'-eingefügten BglII-Schnittstelle mit BglII geschnitten (Abbildung 35). Ungefähr bei 4000 bp - dies entspricht dem pSG5-Vektor mit 4100 bp - und zwischen 200 und 300 bp - die für die miR155 berechnete Sequenzgröße befindet sich bei einer Größe von 240 bp - zeigt sich je eine Bande. Dieser positive Klon wurde sequenziert und im Luciferase-Assay eingesetzt.

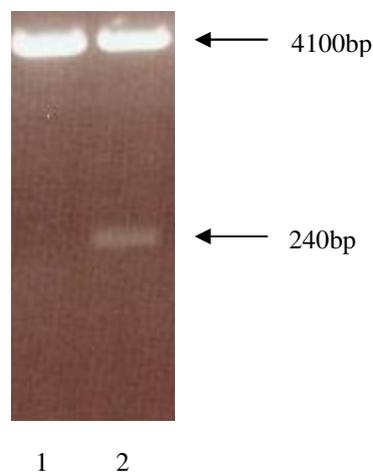


Abb. 35: Orientierungsverdau des pSG5-miR155-Konstrukts

Die Proben wurden auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen. Der Verdau wurde mit Bgl II durchgeführt. Der pSG5-Vektor besitzt 4100 bp und die miR155 240bp. Die Spur 1 zeigt einen leeren Vektor, die Spur 2 den Vektor und das Insert.

4.4.6 Expression der microRNAs miR-BHRF1-1, 1-2 und 1-3

Die klonierten microRNAs können nur dann eine Funktion in einer transfizierten Zelle ausüben, wenn sie exprimiert werden. Deshalb stand der Nachweis der Expression an erster Stelle. Dafür wurden 293T-Zellen mit den hergestellten pCEP4-Konstrukten pCEP4-BHRF1-1, 1-2 und 1-3 transfiziert und nach 48 Stunden die Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Hybond-N+ Membran (Amersham Biosciences) übertragen. Der Nachweis der exprimierten miRNAs erfolgte mit einer zuvor hergestellten, radioaktiv markierten DNA-Sonde. Der Northern Blot ist in Abbildung 36 zu sehen. Der Block A zeigt die BHRF1-1, der Block B die BHRF1-2 und der Block C die BHRF1-3.

Jeweils in Spur 1 ist als Negativkontrolle BL41-RNA und in Spur 2 als Positivkontrolle B95.8 CBL-RNA aufgetragen. Die oben beschriebene 293T-Zell-DNA wurde in Spur 3 aufgetragen. Die Negativkontrolle ist in allen drei Blöcken negativ. Mit der anti miR-BHRF1-1-Sonde (Block1) erfolgte der Nachweis der pre-miRNA von miR-BHRF1-1 (63 nt) und der reifen miRNA miR-BHRF1-1 (21 nt) (siehe Pfeil) in der Positivkontrolle (Spur2) und in der zu untersuchenden 293T-Zell-RNA. Dies gelang auch mit der anti miR-BHRF1-2-Sonde bei miR-BHRF1-2 (Block2) und der anti miR-BHRF1-3-Sonde bei miR-BHRF1-3 (Block3).

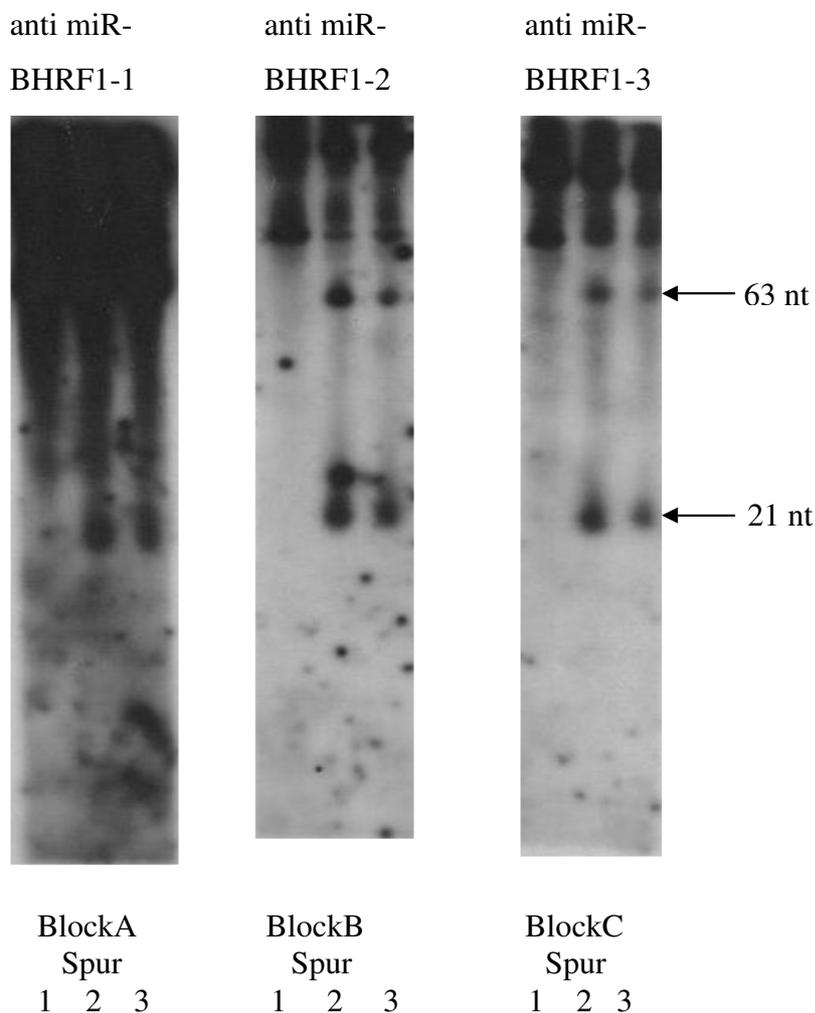


Abb. 36: Northern Blot zum Nachweis der miR-BHRF1-1, 1-2 und 1-3

Der Nachweis der microRNAs erfolgte mit ³²P-markierten Sonden.

Block1-3: Zum Nachweis der miR-BHRF1-1 (Block1), der miR-BHRF1-2 (Block2) und der miR-BHRF1-3 (Block3) wurde in Spur 1 jeweils BL41-RNA als Negativkontrolle und in Spur 2 B95.8 CBL-RNA als Positivkontrolle aufgetragen. In Spur 3 wurde die zu untersuchende 293T-Zell-RNA aufgetragen.

4.4.7 Regulierung der BFLF2-Expression durch die miR-BHRF1-2 und 1-3 im pSG5-Vektor

(Luciferase-Reportergen-Assay)

Um nachzuweisen, dass die gezeigten Effekte nicht vektorspezifisch sind, wurde der oben beschriebene Luciferase-Assay mit einem anderen Vektor - hierbei handelte es sich um pSG5 - wiederholt. Es wurden ebenfalls 293T-Zellen laut Herstellerangaben (8×10^4 - 10^5) (NanofectinTM) in 24-Loch-Platten ausgesät und mit dem Nanofectin ITM-Reagenz transfiziert. Allerdings wurde von dem auf den pSG5-Vektor basierenden miRNA-kodierenden Effektorkonstrukt nur 0,8 µg verwendet. Im Weiteren wurden - wie oben - 0,2 µg des pGL3-abgeleiteten Reporterkonstrukts und 0,2 µg des pEGFP-C1-Vektors eingesetzt. Die DNA-Gesamtmenge betrug somit bei den pSG5-Effektorkonstrukten pro Transfektionsansatz 1,2 µg. Auch hier wurde die DNA-Gesamtmenge - wenn nötig - mit Heringssperma ausgeglichen. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, die Luciferaseaktivität gemessen und mit der durchflusszytometrisch bestimmten Transfektionseffizienz standardisiert. Die Abbildungen 37a und b zeigen je ein Balkendiagramm der gemessenen und standardisierten Luciferase-Aktivität für die Regulierung der BFLF2-Expression durch pSG5-BHRF1-2 und 1-3 zusammen.

Auch hier sind in der Abbildung 37a die internen Kontrollen zu sehen. Die Effektorplasmide alleine (pSG5, BHRF1-2 und 1-3) zeigen keine Luciferase-Aktivität (Balken 1+2). Die Transfektion von pGL3-Luciferase und pSG5 wurde hier auf 100% gesetzt (Balken 3). Bei Zugabe der miR-BHRF1-2 und 1-3 zu pGL3-Luciferase kommt es zu einer Erhöhung der Luciferase-Aktivität (Balken 4); diese ist jedoch statistisch nicht signifikant.

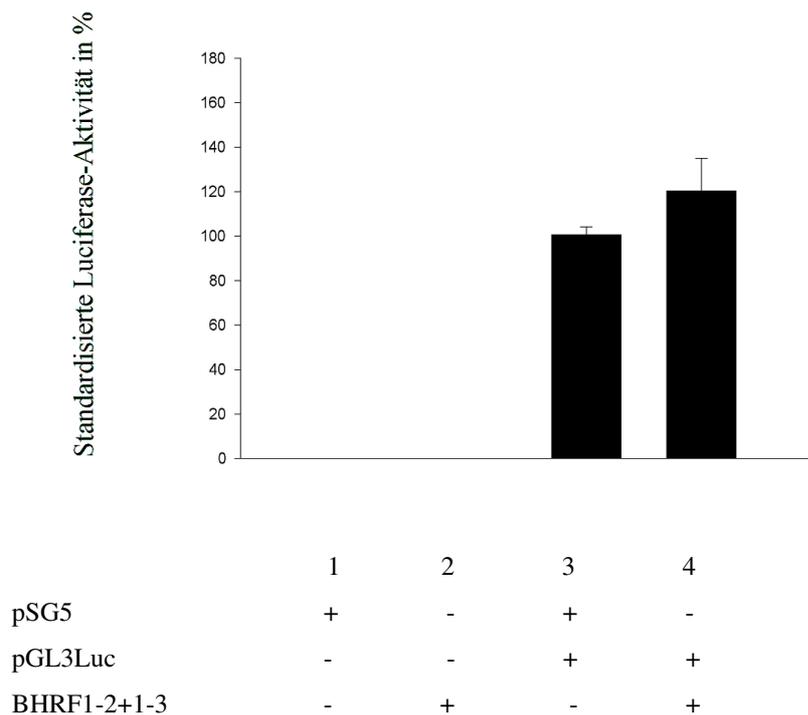


Abb. 37a: Regulation der BFLF2-3'UTR durch BHRF1-2 und BHRF1-3 (in pSG5)

Transfektion von 293T-Zellen mit 0,2 µg pEGFP-C1 und verschiedenen Kombinationen aus 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmiden (x-Achse). Die standardisierte relative Luciferase-Aktivität ist auf der y-Achse aufgetragen. Der Wert für pGL3-Luc und pSG5 wurde auf 100% gesetzt. Die Balken stellen Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit je 2 Ansätzen dar. Der mittlere Fehler des Mittelwertes ist als T-Wert angegeben.

Interne Kontrollen zu diesem Versuchsaufbau: Die Effektorplasmide alleine zeigen keine Luciferase-Aktivität. Die Zugabe von miR-BHRF1-2+1-3 zu pGL3-Luciferase zeigt keine statistisch signifikanten Veränderungen.

In der Abbildung 37b ist nun der eigentliche Versuch aufgezeigt. Wieder wird gezeigt, dass die Effektorplasmide (pSG5, pSG5-BHRF1-2+1-3) alleine keine Luciferase-Aktivität besitzen (Balken 1+2). Die BFLF2-3'UTR-Luciferase wurde auf 100% gesetzt (Balken 3). Bei Transfektion von pGL3-BFLF2-3'UTR-Luciferase zusammen mit BHRF1-2+1-3 kommt es zu einer Abnahme der Luciferase-Aktivität um circa 50%.

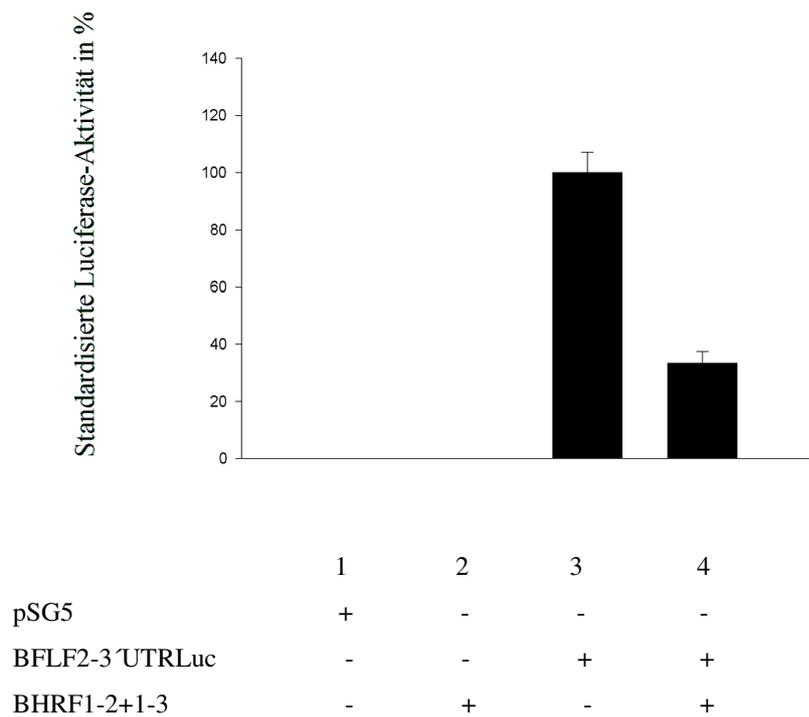


Abb. 37b: Regulation der BFLF2-3'UTR durch BHRF1-2 und BHRF1-3 (in pSG5)

Transfektion von 293T-Zellen mit 0,2 µg pEGFP-C1 und verschiedenen Kombinationen aus 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmiden (x-Achse). Die standardisierte relative Luciferase-Aktivität ist auf der y-Achse aufgetragen. Die Balken stellen Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit je 2 Ansätzen dar. Der mittlere Fehler des Mittelwertes ist als T-Wert angegeben.

Eigentlicher Versuch: Wieder wird gezeigt, dass die Effektorplasmide (pSG5, pSG5-BHRF1-2+1-3) alleine keine Luciferase-Aktivität besitzen (Balken 1+2). Die BFLF2-3'UTR-Luciferase wurde hier auf 100% gesetzt (Balken 3). Bei Transfektion von pGL3-BFLF2-3'UTR-Luciferase zusammen mit BHRF1-2+1-3 kommt es zu einer Abnahme der Luciferase-Aktivität um circa 50%.

4.4.8 Durchführung des Luciferase-Reportergen-Assays mit der für die BFLF2-3'UTR unspezifischen microRNA miR-BHRF1-1 im pSG5-Vektor

(Luciferase-Reportergen-Assay)

Hier wurde genau wie bei 4.3.7 verfahren. Die Abbildungen 38a und b zeigen je ein Balkendiagramm der gemessenen und standardisierten Luciferase-Aktivität hinsichtlich der BFLF2-Expression unter Einfluss der miR-BHRF1-1.

Die Abbildung 38a zeigt wieder zunächst die internen Kontrollen. Auch hier zeigten die Effektorplasmide (pSG5 und BHRF1-1) alleine keine Luciferase-Aktivität (Balken1+2). Die Transfektion von pGL3-Luciferase zusammen mit pSG5 wurde auf 100% gesetzt. Bei Zugabe der miR-BHRF1-1 zu pGL3-Luciferase zeigt sich eine statistisch signifikante Erhöhung der Luciferase-Aktivität um circa 20% (Balken 3).

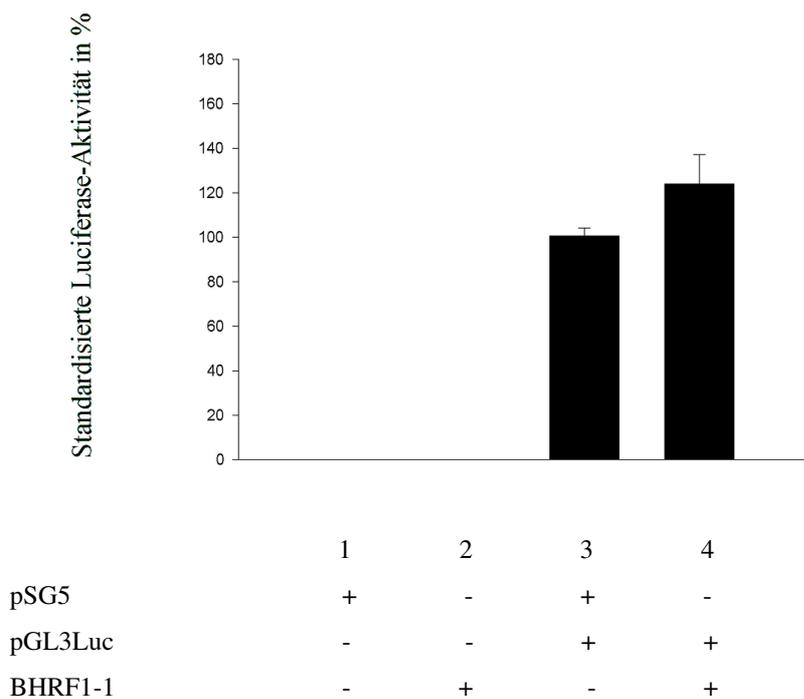


Abb. 38a: Keine Regulation der BFLF2-3'UTR durch BHRF1-1

Transfektion von 293T-Zellen mit 0,2 µg pEGFP-C1 und verschiedenen Kombinationen aus 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmiden (x-Achse). Die standardisierte relative Luciferase-Aktivität ist auf der y-Achse aufgetragen. Der Wert für pGL3 und pSG5 wurde auf 100% gesetzt. Die Balken stellen Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit je 2 Ansätzen dar. Der mittlere Fehler des Mittelwertes ist als T-Wert angegeben.

Interne Kontrollen zu diesem Versuchsaufbau: Die Effektorplasmide alleine zeigen keine Luciferase-Aktivität. Die Zugabe von miR-BHRF1-1 zu pGL3-Luciferase zeigt eine statistisch signifikante Erhöhung um circa 20%.

In der Abbildung 38b ist der eigentliche Versuch aufgezeigt. Wieder ist zu sehen, dass die Effektorplasmide (pSG5, pSG5-BHRF1-1) alleine keine Luciferase-Aktivität besitzen (Balken 1+2). Die BFLF2-3'UTR-Luciferase wurde auf 100% gesetzt (Balken 3). Bei Transfektion von pGL3-BFLF2-3'UTR-Luciferase zusammen mit BHRF1-1 kommt es zu einer Erhöhung der Luciferase-Aktivität um circa 40%.

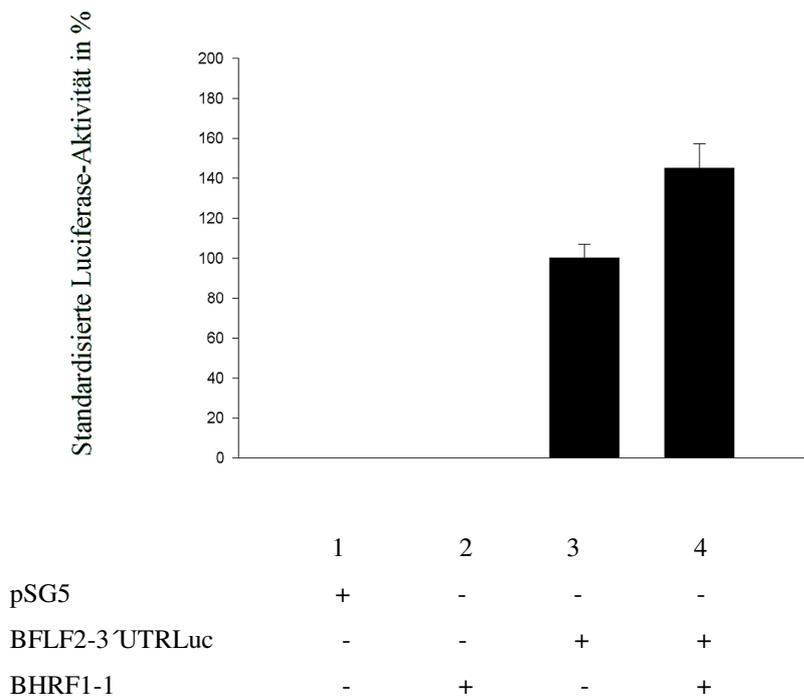


Abb. 38b: Keine Regulation der BFLF2-3'UTR durch BHRF1-1

Transfektion von 293T-Zellen mit 0,2 µg pEGFP-C1 und verschiedenen Kombinationen aus 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmiden (x-Achse). Die standardisierte relative Luciferase-Aktivität ist auf der y-Achse aufgetragen. Die Balken stellen Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit je 2 Ansätzen dar. Der mittlere Fehler des Mittelwertes ist als T-Wert angegeben.

Eigentlicher Versuch: Wieder wird gezeigt, dass die Effektorplasmide (pSG5, pSG5-BHRF1-1) alleine keine Luciferase-Aktivität besitzen (Balken 1+2). Die BFLF2-3'UTR-Luciferase wurde hier auf 100% gesetzt (Balken 3). Bei Transfektion von pGL3-BFLF2-3'UTR-Luciferase zusammen mit BHRF1-1 kommt es zu einer Erhöhung der Luciferase-Aktivität um circa 40%.

4.4.9 Durchführung des Luciferase-Reporter-Gen-Assays mit der für die BFLF2-3'UTR unspezifischen microRNA miR-155 im pSG5-Vektor (Luciferase-Reporter-Gen-Assay)

Hier wurde genau wie bei 4.3.7 verfahren. Die Abbildungen 39a und b zeigen je ein Balkendiagramm der gemessenen und standardisierten Luciferase-Aktivität hinsichtlich der BFLF2-Expression unter Einfluss der miR-155.

In Abbildung 39a sind wieder die internen Kontrollen zu sehen. Auch hier erbrachten die Effektorplasmide (pSG5 und BHRF1-1) alleine keine Luciferase-Aktivität (Balken1+2). Die Luciferaseaktivität der Transfektion von pGL3-Luciferase und pSG5 wurde auf 100% gesetzt. Bei Zugabe der miR-155 zu pGL3-Luciferase zeigt sich hinsichtlich der Luciferase-Aktivität (Balken 3) keine statistisch signifikante Veränderung.

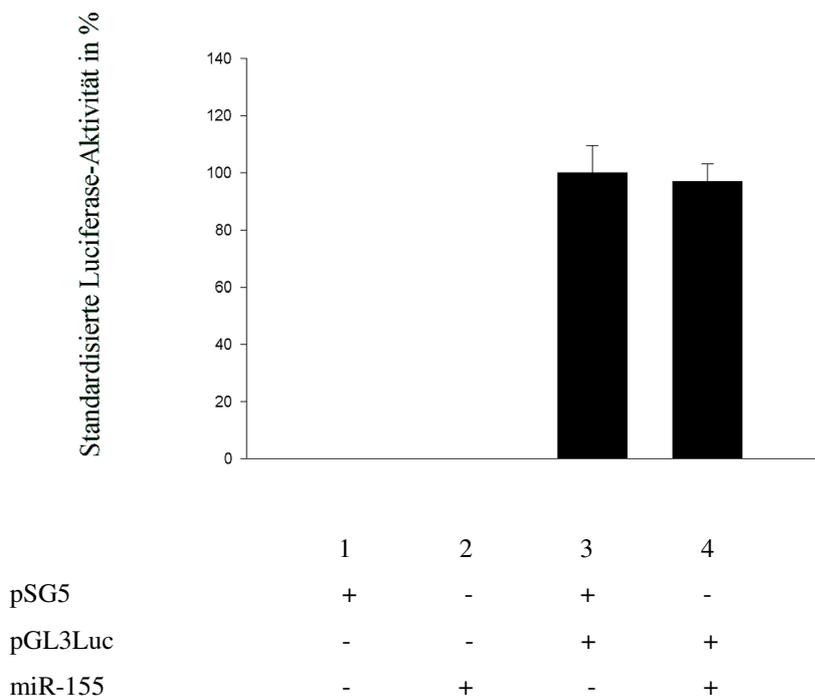


Abb. 39a: Keine Regulation der BFLF2-3'UTR durch miR-155

Transfektion von 293T-Zellen mit 0,2 µg pEGFP-C1 und verschiedenen Kombinationen aus 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmiden (x-Achse). Die standardisierte relative Luciferase-Aktivität ist auf der y-Achse aufgetragen. Der Wert für pGL3-Luc und pSG5 wurde auf 100% gesetzt. Die Balken stellen Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit je 2 Ansätzen dar. Der mittlere Fehler des Mittelwertes ist als T-Wert angegeben.

Interne Kontrollen zu diesem Versuchsaufbau: Die Effektorplasmide alleine zeigen keine Luciferase-Aktivität. Die Zugabe von miR-155 zu pGL3-Luciferase zeigt keine statistisch signifikante Veränderung.

Die Abbildung 39b zeigt den eigentlichen Versuch. Wieder wird gezeigt, dass die Effektorplasmide (pSG5, pSG5-miR-155) alleine keine Luciferase-Aktivität besitzen (Balken 1+2). Die BFLF2-3'UTR-Luciferase wurde auf 100% gesetzt (Balken 3). Bei Transfektion von pGL3-BFLF2-3'UTR-Luciferase zusammen mit miR-155 kommt es zu einer geringen Erhöhung der Luciferase-Aktivität (Balken 4), die jedoch statistisch nicht signifikant ist. Dies demonstriert, dass diese microRNA keine negativ-regulierende Wirkung auf die BFLF2-Expression hat.

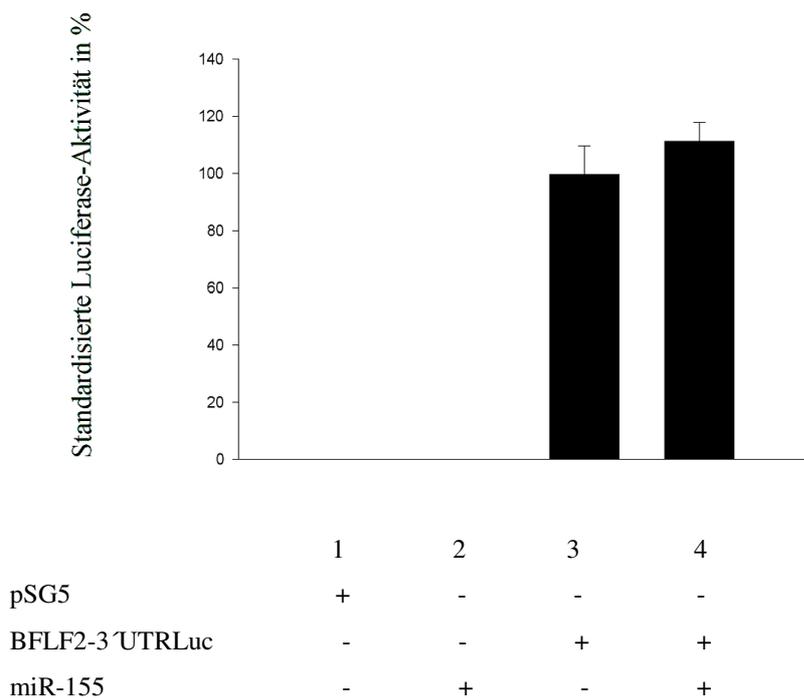


Abb. 39b: Keine Regulation der BFLF2-3'UTR durch miR-155

Transfektion von 293T-Zellen mit 0,2 µg pEGFP-C1 und verschiedenen Kombinationen aus 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmiden (x-Achse). Die standardisierte relative Luciferase-Aktivität ist auf der y-Achse aufgetragen. Die Balken stellen Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit je 2 Ansätzen dar. Der mittlere Fehler des Mittelwertes ist als T-Wert angegeben.

Eigentlicher Versuch: Wieder wird gezeigt, dass die Effektorplasmide (pSG5, pSG5-miR-155) alleine keine Luciferase-Aktivität besitzen (Balken 1+2). Die BFLF2-3'UTR-Luciferase wurde hier auf 100% gesetzt (Balken 3). Die Zugabe von miR-155 zu BFLF2-3'UTR-Luciferase zeigt keine statistisch signifikante Veränderung.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der EBV-kodierten BHRF1 microRNAs analysiert. MicroRNAs sind negative Regulatoren der Zelle, die auf Grund ihrer Komplementarität zu Bereichen der 3'UTR ihrer Ziel-mRNAs an diese binden und so zur Inhibierung der Translation und in selteneren Fällen zur Degradation der Ziel-mRNA führen (Bartel 2004). In beiden Fällen kommt es zu einer Abnahme der Proteinmenge. Die potentiellen Zielgene der EBV-kodierten microRNAs wurden über bioinformatische Methoden vorausgesagt (Pfeffer, Zavolan et al., 2004). Darunter fallen sowohl zelluläre Proteine - die eine Rolle in der Regulation der Zellproliferation und Apoptose spielen - als auch B-Zell-spezifische Chemokine und Cytokine sowie Transkriptionsfaktoren und Komponenten von Signaltransduktionswegen. Auf viraler Seite gehören dazu auch Proteine, die für eine lytische Vermehrung des EBV notwendig sind. Die regulatorische Funktion der EBV-kodierten microRNAs miR-BHRF1-2 und miR-BHRF1-3 auf deren potentielles Zielgen BFLF2 wurde in Luciferase-Assays untersucht. Die microRNAs sind auf dem Gegenstrang der BFLF2-3'UTR kodiert. Um den Effekt der miRNAs zu testen, wurden eukaryote Expressionsvektoren zur Expression dieser miRNAs sowie von Kontroll-miRNAs hergestellt. Als Testsystem diente ein Vektor, welcher die 3'UTR des BFLF2-Gens am 3'-Ende des Luciferase-Gens trug. Bei einer Bindung an die 3'UTR dieses Konstrukts sollte die Menge an Luciferase, welche optisch leicht zu bestimmen ist, abnehmen. Das BFLF2-Gen des EBV kodiert für ein Protein, das zusammen mit dem BFRF1-Genprodukt an der Umhüllung der Kapside der Epstein-Barr-Virionen an der Kernmembran beteiligt ist (Gonella, Farina et al., 2005). Es wird früh während der lytischen Infektion exprimiert. Man geht davon aus, dass BFLF2 während der latenten Infektion durch EBV-kodierte microRNAs herunterreguliert wird, was einen wesentlichen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Latenz leistet. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Kremmer (GSF, München) wurden monoklonale Antikörper gegen dieses EBV-eigene BFLF2-Protein hergestellt. Diese Antikörper wurden in Immunfluoreszenzen eingesetzt, um die genaue Lokalisation von BFLF2 aufzuzeigen. In noch ausstehenden Experimenten sollen sie genutzt werden, um die BFLF2-Regulierung auch auf Proteinebene im Western Blot zu zeigen.

5.1 Herstellung des GST-BFLF2-Konstruktes und Expression des Fusionsproteins in Bakterien

Die kodierende Sequenz des BFLF2-Gens - C-terminal versehen mit einem HA-„Tag“- konnte mit spezifischen Primern in einer PCR-Reaktion amplifiziert und in das Leseraster des pGEX-4T-1-Vektors kloniert werden. Dieses Konstrukt wurde zur Expression eines N-terminal mit GST markierten Fusionsproteins in Bakterien verwendet. Wie in Abbildung 18 sichtbar, wurde das BFLF2-Fragment in der zu erwartenden Größe amplifiziert, und die Negativkontrolle war negativ. Im Kontrollverdau - ebenfalls abgebildet in Abbildung 18 - konnten mehrere Konstrukte mit dem gewünschten Insert gezeigt werden. Die Sequenzierung von dem pGEX-BFLF2-HA-Konstrukt zeigte endgültig, dass das Plasmid die kodierende Sequenz in richtiger Orientierung und im Leseraster aufgenommen hat. Die Expression des Fusionsproteins wurde in *E. coli* BL21/DE3 durch IPTG induziert und ist in Abbildung 19 sichtbar. Vor der Induktion wird das Fusionsprotein nur schwach exprimiert. Das GST-BFLF2-HA Fusionsprotein besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von etwa 62,7 kDa, sein immunologischer Nachweis erfolgt im Western Blot mit einem GST-spezifischen Antikörper, dargestellt in Abbildung 20. Vor der Induktion zeigt das Lysat eine sehr schwache Bande in Höhe des gewünschten Proteins, welche nach Induktion enorm verstärkt auftritt. Allerdings ist nach unten hin fast die komplette Spur unspezifisch schwarz gefärbt. Dies kann entweder auf Kreuzreaktionen durch den GST-Antikörper im induzierten Extrakt zurückgeführt werden oder es werden Abbauprodukte des Fusionsproteins erkannt. Die Expression des GST-BFLF2-HA Fusionsproteins kann auf Grund des Nachweises im Coomassie-Gel und im Western Blot sowie der Sequenzierung als erfolgreich angesehen werden. Mittels eines präparativen PAA-Gels wurde das Fusionsprotein aus dem Proteingemisch isoliert und über eine Gel-Filtrations-Chromatographie aufgereinigt. Durch Gefriertrocknung der Lösung und Aufnahme in einem geringeren Volumen wurde eine Aufkonzentrierung erreicht. In Abbildung 21 und 22 ist die Aufreinigung und Aufkonzentration von GST-BFLF2-HA und der Erfolg der Proteinaufarbeitung in den Lysozymextrakten gezeigt. Im Lysozymextrakt 1 und 2 lässt sich die Bande des gewünschten Fusionsproteins innerhalb des Proteingemischs in der Coomassie-Färbung (Abbildung 21) deutlich erkennen. Der Lysozymextrakt 3 zeigt wie erwartet nur eine geringe Proteinmenge, weswegen nur die beiden ersten Lysozymextrakte zum Testen der von Frau Doktor Kremmer hergestellten Antikörper im ELISA verwendet wurden. Der Nachweis mit dem GST-spezifischen Antikörper im Western Blot (Abbildung 22) zeigt für die Lysozymextrakte 1 und 2 eine Bande bei etwa 62 kDa, was der Größe des kompletten Fusionsproteins entspricht. Allerdings ist auch eine schwächere Bande bei etwa

26 kDa nachweisbar, wobei es sich entweder um GST alleine oder - wovon in diesem Fall auszugehen ist - um ein Abbauprodukt handelt. Im 3. Extrakt war auch hier nur eine sehr schwache Bande detektierbar. Es wurde also gezeigt, dass die Proteinextraktion mit Lysozym erfolgreich war und die Extrakte 1 und 2 das Fusionsprotein enthalten. Die Aufreinigung und Aufkonzentrierung des Fusionsproteins, welches zur Immunisierung von Ratten verwendet wurde, konnte ebenfalls dargestellt werden. Aber auch hier wurden Abbaubanden des kompletten Fusionsproteins sichtbar.

Etwa 4 Monate nach der Immunisierung der Ratten konnten die ersten monoklonalen BFLF2-Antikörper getestet werden.

5.2 Eukaryotische Expression des BFLF2-Proteins mit C-terminalem HA-„Tag“

Die von Frau Doktor Elisabeth Kremmer hergestellten Antikörper wurden im Western Blot auf ihre Spezifität getestet. Dazu wurde ein Vektor pSG5-abgeleitetes Konstrukt hergestellt, welches zur Expression von C-terminal mit HA-markiertem BFLF2-Protein in Säugerzellen diente. Die Abbildung 23 zeigt, dass die Klonierung dieses Konstruktes erfolgreich war. Zum Testen der Antikörper wurden COS-Zellen (Affennierenzellen) verwendet, welche das HA-„getagte“ BFLF2-Protein transient exprimieren. Wie in Abbildung 24 zu sehen, erbringen fast alle getesteten Antikörper im Western Blot ein positives Ergebnis: Die Positivkontrolle mit einem HA-spezifischen Antikörper weist eine Bande bei circa 36 kDa auf, diese ist auch bei fast allen getesteten Antikörpern detektierbar. Neben dieser ist aber auch eine etwa 10 kDa höher liegende Bande sichtbar. Hierbei könnte es sich um eine schwache Kreuzreaktivität mit einem Zellprotein handeln.

5.3 Nachweis von endogenem BFLF2 in B-Zellen

Ausgesuchte Antikörper wurden auf die Antigenerkennung von endogenem BFLF2 in B-Zellen getestet. BFLF2 wird früh im lytischen Replikationszyklus des EBV exprimiert und wird daher in latent infizierten B-Zellen schwach oder gar nicht exprimiert. Dagegen exprimieren EBV-positive B-Zellen, welche nach TPA-Induktion den lytischen Zyklus

durchlaufen, verstärkt BFLF2. Als Negativkontrolle wurden EBV-negative BL41-Zellen, die kein BFLF2 enthalten, eingesetzt. Der COS-Zellextrakt mit HA-markiertem BFLF2 wurde als Positivkontrolle eingesetzt und mit HA-Antikörper nachgewiesen. Wie in Abbildung 25 zu sehen, zeigten die beiden Antikörper 7H11 und 3F3 das erwartete Bandenmuster. Endogenes BFLF2 mit einer Größe von etwa 35 kDa wurde in den TPA-behandelten, EBV-positiven Raji-Zellen nachgewiesen. In einem letzten Western Blot wurden diese zwei Antikörper erneut auf Antigenerkennung getestet. Hierbei wurden sowohl aus den EBV-positiven Zelllinien Raji und B95.8 sowie aus humanen 293T-Zellen, welche unmarkiertes BFLF2 (das heißt ohne HA-„Tag“) exprimieren, Extrakte verwendet. In Abbildung 26 ist gezeigt, dass diese beiden Antikörper spezifisch BFLF2 erkannten. Das endogene BFLF2 mit einem Molekulargewicht von ungefähr 35 kDa konnte in den TPA-induzierten B-Zellextrakten nachgewiesen werden, während in den unbehandelten Zellen keine Bande sichtbar ist. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Alberto Faggioni überein (Gonnella, Farina et al., 2005). Auch im 293T-Zellextrakt - diese Zellen exprimieren BFLF2 transient - konnte das BFLF2-Protein nachgewiesen werden. Diese beiden Antikörper konnten nun genutzt werden, um Immunfluoreszenzen durchzuführen. Im Weiteren stehen sie für Untersuchungen zur Regulation der BFLF2-Proteinexpression durch die miR-BHRF1-2 und miR-BHRF1-3 zur Verfügung. Es ist zu erwarten, dass diese microRNAs - wenn sie exprimiert werden - zu einer Abnahme der BFLF2-Proteinmenge führen.

5.4 Subzelluläre Lokalisation von BFLF2

Mit Hilfe von Zellfraktionsexperimenten und Immunlokalisationen konnte gezeigt werden, dass BFLF2 früh im lytischen Zyklus repliziert wird und wie sein Homolog BFRF1 in der Kernmembran, vorzugsweise in Gebieten, wo die Knospung der Kernkapside stattfindet, lokalisiert ist (Farina, Santerelli et al., 2000). In den hier durchgeführten Immunfluoreszenzen (Abbildung 27) sollten die Ergebnisse von Gonnella et al. bestätigt werden und die von Frau Dr. Kremmer hergestellten monoklonalen BFLF2 Antikörper 7H11 und 3F3 - die im Western Blot positive Ergebnisse zeigten - hinsichtlich ihrer Funktionalität in Immunfluoreszenzen überprüft werden. Die Kerne wurden immer mit einem ersten Antikörper gefärbt und dann mit DAPI gegengefärbt. Als Sekundärantikörper wurde ein TRITC-konjugierter anti-Ratte IgG Antikörper genutzt. Ein HA-spezifischer Antikörper 3F10, der das „HA“-Tag des mit

HA-markierten BFLF2 erkannte, diente als Positivkontrolle. Hier (Reihe 1 der Abb. 27) wie auch im Versuch mit dem von Frau Gonella zur Verfügung gestellten Antikörper C1 (Reihe 2 der Abb.27) sowie mit den Antikörpern 3F3 (Reihe 3 der Abb. 27) und 7H11 (Reihe 4 der Abb.27) konnte gezeigt werden, dass BFLF2 im Kern lokalisiert ist. Die beiden Antikörper 3F3 und 7H11 brachten in den Immunfluoreszenzen ein zufriedenstellendes Ergebnis.

5.5 Herstellung der miR-BHRF1 und miR-155 Effektorstrukture und Expression der microRNAs in eukaryotischen Zellen

Durch Hybridisierung zweier einzelsträngiger Oligonukleotide konnten doppelsträngige Fragmente, die die Sequenz der pre-miR-BHRF1-1, der pre-miR-BHRF1-2 beziehungsweise der pre-miR-BHRF1-3 inklusive geeigneter Restriktionsschnittstellen enthielten, in den Vektor pCEP4 kloniert werden. In Abbildung 28 ist zu sehen, dass für die miR-BHRF1-2 zwei und für die miR-BHRF1-3 ein positiver Klon gefunden wurde. Die Sequenzierung dieser Konstrukte konnte dies weiterhin bestätigen.

Im Weiteren wurden die miR-BHRF1-1, 1-2, 1-3 und miR-155 in den pSG5-Vektor einkloniert. Hiermit sollte gezeigt werden, dass die gefundenen Effekte der microRNAs miR-BHRF1-2 und 1-3 auf die BFLF2-Expression weder unspezifisch noch vektorspezifisch sind. Es wurden jeweils die Vorläufer-microRNAs sowie etwa 120 bp flankierend zu jeder Seite in den Vektor kloniert. Daraus folgt, dass die miR-BHRF1-2 und 1-3 nur zusammen kloniert werden können, da sie im Genom nicht weit genug auseinander liegen. Die Abbildung 34 zeigt die positiven Klone für die miR-BHRF1-2 und 1-3 zusammen. Die Sequenzierung konnte dies weiterhin bestätigen. Ein positiver Klon der miR-155 ist in Abbildung 35 zu sehen und auch dieses Ergebnis wurde durch die Sequenzierung bestätigt.

Um zu testen, ob die hergestellten Konstrukte in der Lage sind, eine Expression der microRNAs in Zellen zu bewerkstelligen, wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Eingesetzt wurden hierbei 293T-Zellen, die zuvor mit den Konstrukten pCEP4-BHRF1-1, pCEP4-BHRF1-2 beziehungsweise pCEP4-BHRF1-3 transfiziert wurden. Der Nachweis erfolgte mit spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Sonden. Es wurde sowohl eine Negativkontrolle als auch eine Positivkontrolle durchgeführt. Bei einem positiven Ergebnis sind pro Spur zwei Banden zu erwarten: Zum einen der microRNA-Vorläufer mit einer Größe von etwa 63 nt und zum anderen die reifen microRNAs mit einer Größe von 21 nt. Wie Abbildung 36 zu entnehmen ist, konnte die Expression der miR-BHRF1-1, 1-2 und 1-3 in den

EBV-positiven B95.8 Zellen und in den transfizierten 293T-Zellen nachgewiesen werden. Die B95.8 Zellen dienten als positive Kontrolle.

5.6 Herstellung des *BFLF2*-Luciferase-Reportergenkonstruktes

Der Bereich der 3'UTR des *BFLF2*-Gens, in dem sich die potentiellen Bindungsstellen für die miR-BHRF1-2 und 1-3 befinden, konnte mittels PCR amplifiziert werden, was in Abbildung 29 gezeigt ist. Die Negativkontrolle zeigt keine Bande. Das Fragment wurde über geeignete Restriktionsstellen in den pGL3-Promotor direkt 3' hinter das Luciferase-Leseraster kloniert. In Abbildung 30 ist der Orientierungsverdau dargestellt, in dem sich ein positiver Klon zeigt. Der Erfolg dieser Klonierung konnte durch die Sequenzierung bestätigt werden.

5.7 Regulation der *BFLF2*-3'UTR durch die miR-BHRF1-2 und 1-3

In der vorliegenden Arbeit wurde die regulatorische Funktion der für *BFLF2* spezifischen miR-BHRF1-2 und miR-BHRF1-3 auf die *BFLF2*-Expression in Luciferase-Assays untersucht. Hierfür wurde das Reporterkonstrukt - welches die 3'UTR des *BFLF2*-Zielgens hinter dem Luciferase ORF besitzt - zusammen mit Effektorplasmiden - die für die entsprechenden microRNAs kodierten - in 293T-Zellen kotransfiziert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Diese wurde dann mit der im FACS gemessenen Transfektionseffizienz verrechnet und standardisiert. Die so gewonnenen Werte wurden als Balkendiagramme dargestellt und miteinander verglichen. Der mittlere Fehler des Mittelwertes ist als T-Wert angegeben. Die Abbildung 31 zeigt das Ergebnis mit den pCEP4-Effektorplasmiden. Die internen Kontrollen dieses Versuchsaufbaus (Abbildung 31a) zeigen, dass die Effektorplasmide alleine keine Luciferase-Aktivität besitzen. Die Transfektion von pGL3 und pCEP4 zeigt eine relativ hohe Luciferase-Aktivität, welche auf hundert Prozent gesetzt wurde und somit als Vergleichswert diente. Durch Zugabe der miR-BHRF1-3 kommt es zu einer Erhöhung der Luciferase-Aktivität. Die Zugabe der miR-BHRF1-2 verursacht eine Reduktion der Luciferase-Aktivität um circa 5 Prozent, welche statistisch signifikant ist. Die Coexpression von pGL3-*BFLF2*-3'UTR und pCEP4 (wird nicht gezeigt im Balkendiagramm) führt zu einer Reduktion um fünfzig Prozent. Die Abnahme in der Luciferase-Aktivität durch

die Anwesenheit der 3'UTR im Reporterkonstrukt kann auf die regulierenden Eigenschaften von 3'UTRs zurückgeführt werden. So können Proteine an 3'UTRs binden und spezielle Funktionen verrichten. Außerdem kann die Sekundärstruktur der 3'UTR einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der mRNA ausüben. Im eigentlichen Versuch (Abbildung 31b) wurde nun dieser Wert auf 100% gesetzt. Bei Transfektion der miR-BHRF1-2 beziehungsweise miR-BHRF1-3 mit pGL3-BFLF2-3'UTR kommt es zu einer Abnahme der Luciferase-Aktivität um je circa fünfunddreißig Prozent. Dies zeigt, dass beide micro RNAs alleine eine spezifische Reduktion der BFLF2-Expression verursachen. Werden beide micro RNAs zusammen mit pGL3-BFLF2-3'UTR transfiziert, nimmt die Luciferase-Aktivität um circa fünfzig Prozent ab. Beide micro RNAs gemeinsam haben also eine stärkere Reduktion zur Folge als die einzelnen micro RNAs.

Es muss nun gezeigt werden, dass der demonstrierte Effekt nicht vektorspezifisch ist und dass die micro RNAs miR-BHRF1-2 und 1-3 einen spezifischen Effekt auf die BFLF2-3'UTR ausüben, der von unspezifischen micro RNAs nicht ausgeführt wird. Deswegen wurde derselbe Versuch mit pSG5-Effektorstrukturen durchgeführt. Da hier jedoch nicht nur die Vorläufer-microRNAs, sondern diese mit zu jeder Seite circa 120 flankierenden Basenpaaren verwendet wurden, konnten die miR-BHRF1-2 und 1-3 nur gemeinsam kloniert werden. Das Balkendiagramm dieses Luciferase-Assays ist in Abbildung 37 zu sehen. Auch hier zeigen die Effektorstrukturen in den internen Kontrollen (Abbildung 37a) alleine keine Luciferase-Aktivität, und die Luciferase-Aktivität von pGL3 und pSG5 wurde auf hundert Prozent gesetzt. Durch Zugabe der beiden microRNAs miR-BHRF1-2 und 1-3 zusammen zu pGL3 zeigt sich zwar im Balkendiagramm eine Reduktion, diese ist aber statistisch nicht signifikant. Im eigentlichen Versuch (Abbildung 37b) wurde dieser Wert wieder auf 100% gesetzt. Bei Zugabe der microRNAs zusammen zu pGL3-BFLF2-3'UTR kommt es auch hier zu einer Abnahme der Luciferase-Aktivität um circa fünfzig Prozent. Somit ist bewiesen, dass die gezeigten Effekte der microRNAs miR-BHRF1-2 und 1-3 auf die BFLF2-Expression nicht vektorspezifisch sind.

Derselbe Versuch wird jetzt zunächst mit der für BFLF2-3'UTR unspezifischen miR-BHRF1-1 (Abbildung 38) und dann mit der für BFLF2-3'UTR unspezifischen miR-155 durchgeführt (Abbildung 39). Die Ausgangssituation ist hier wie oben. In den internen Kontrollen (Abbildung 38a und 39a) zeigen die Effektorplasmide alleine keine Luciferase-Aktivität und die Luciferase-Aktivität von pGL3 und pSG5 wurde auf hundert Prozent gesetzt. Die Zugabe der miR-BHRF1-1 beziehungsweise der miR-155 zu pGL3-Luc führt zu einer nicht signifikanten Erhöhung der Luciferase-Aktivität. Im eigentlichen Versuch wurde BFLF2-

3'UTR-Luciferase wieder auf 100% gesetzt. Bei der Transfektion von miR-BHRF1-1 zusammen mit pGL3-BFLF2-3'UTR ist eine Erhöhung der Luciferase-Aktivität zu sehen (Abbildung 38b). Bei der Transfektion von miR-155 zusammen mit pGL3-BFLF2-3'UTR kommt es zu keiner Veränderung hinsichtlich der Luciferase-Aktivität (Abbildung 39b). Dies zeigt, dass die miR-BHRF1-2 und 1-3 für BFLF2-3'UTR spezifische microRNAs sind, da die unspezifischen microRNAs miR-BHRF1-1 und miR-155 keinen runterregulierenden Einfluss auf die BFLF2-Expression haben.

5.8 Ausblick

Da die posttranskriptionelle Runterregulierung der Genexpression durch microRNAs zum einen als Spaltung und Degradierung der mRNA und zum anderen als translationale Repression ablaufen kann, sollte geklärt werden, wie dies in diesem Fall geschieht. Dies ist abhängig vom Ausmaß der Sequenzkomplementarität von miRNA und mRNA. Liegt eine ausreichend hohe Sequenzkomplementarität zwischen 3'UTR- Bereichen der mRNA und der miRNA vor, kommt es zur Spaltung der Ziel-mRNA. Bei ungenügender Komplementarität zwischen miRNA und 3'UTR-Bereichen der mRNA erfolgt eine translationale Repression. Dies bedeutet, dass die Proteinmenge bei gleichbleibender mRNA-Menge abnimmt.

Um zu zeigen, dass es sich bei der Runterregulierung von BFLF2 um Spaltung und Degradierung handelt, wurden RT-PCRs durchgeführt. Es sollte gezeigt werden, dass die mRNA-Menge bei Zugabe der microRNAs zu der BFLF2-3'UTR abnimmt. Deswegen wurde sowohl mit GAPDH- als auch mit Luciferase-Primern gearbeitet. Jedoch konnte bei diesem Versuchsaufbau die Reduktion nicht gezeigt werden. In weiteren Experimenten sollen nun die monoklonalen BFLF2-Antikörper genutzt werden, um die BFLF2-Regulierung auf Proteinebene zu zeigen.

6. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss der Epstein-Barr kodierten microRNAs EBV-miR-BHRF1-1-3 auf die Expression des EBV-kodierten BFLF2 Proteins zu untersuchen. BFLF2 ist zusammen mit BFRF1 während der lytischen Replikation des EBV an der Umhüllung der Kapsidproteine an der Kernmembran beteiligt. Die BFLF2-mRNA wurde als potentiell Ziel der miR-BHRF1-2 und 1-3 mit Hilfe bioinformatischer Analysen vorhergesagt (Pfeffer, Zavolan et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation von BFLF2 durch die microRNA miR-BHRF1-2 und 1-3 experimentell gezeigt. Hierzu wurden Vektoren zur Expression dieser microRNAs hergestellt. Northern Blot Analysen zeigten, dass die pCEP4-BHRF1-Konstrukte in der Lage waren, reife microRNAs zu exprimieren. Das Reporterkonstrukt pGL3-BFLF2-3'UTR, welches den Teil der BFLF2-3'UTR mit den Bindungsstellen für die microRNAs enthielt, wurde zum Nachweis der Regulierung von BFLF2 durch die spezifischen microRNAs genutzt. In den Luciferase-Assays konnte gezeigt werden, dass die für BFLF2 spezifischen microRNAs miR-BHRF1-2 und 1-3 einzeln zu einer Reduktion der Luziferaseaktivität um 25% führen. Bei gemeinsamer Transfektion lag die Reduktion sowohl im pCEP4-Vektor als auch im pSG5-Vektor bei 30%. Dahingegen hatten die für BFLF2 unspezifischen microRNAs miR-BHRF1-1 und miR-155 keine regulatorische Auswirkung auf die BFLF2-Expression. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit aus Zeitmangel aber nicht auf Proteinebene bestätigt, so dass der endgültige Beweis einer Herabregulierung von BFLF2 durch miR-BHRF1-2 und 1-3 noch nicht erbracht wurde.

Zur Durchführung von Immunfluoreszenzen und für spätere Untersuchungen hinsichtlich der BFLF2-Proteinexpression wurden monoklonale Antikörper gegen das virale BFLF2-Protein hergestellt. Western Blot Analysen zeigten, dass die in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Elisabeth Kremmer (Helmholtz Zentrum München) hergestellten Antikörper spezifisch das BFLF2-Protein erkannten. Endogenes BFLF2 war in den untersuchten EBV-positiven B-Zelllinien Raji und B95.8 nach Induktion des lytischen Replikationszyklus mit TPA nachweisbar. Latent infizierte Raji- und B95.8-Zellen hingegen enthielten erwartungsgemäß kein nachweisbares BFLF2. Diese Beobachtungen stimmten mit denen der Arbeitsgruppe von Alberto Faggioni (Universität Rom) überein (Gonnella, Farina et al., 2005). Mit diesen Antikörpern konnte des Weiteren in Immunfluoreszenzen gezeigt werden, dass BFLF2 im Kern lokalisiert ist.

Summary

The aim of this thesis was to examine the effect of the microRNAs encoded by Epstein-Barr virus BHRF1 gene on the expression of the viral BFLF2 protein. The BFLF2-mRNA was predicted to be a potential target of miR-BHRF1-2 and miR-BHRF1-3 but not BHRF1-1 by bioinformatical analyses (Pfeffer, Zavolan et al., 2004). Here we show the BFLF2-3'UTR is indeed a target for the microRNAs miR-BHRF1-2 and 1-3. Vectors for the expression of these microRNAs were generated. Northern Blot analyses showed that different miR-BHRF1 expression constructs were able to express mature microRNAs. The reporter construct pGL3-BFLF2-3'UTR, which contains the target sequence on the BFLF2-3'UTR for the BHRF1 microRNAs was cloned behind the firefly luciferase gene and was used in the subsequent assays. It could be shown, that the microRNAs miR-BHRF1-2 and 1-3 were able to individually down-regulate the luciferase activity of the reporter by 25%. When they are transfected together, the down-regulation by miR-BHRF1-2 and 1-3 was 30%. In contrast, the microRNAs miR-BHRF1-1 and miR-155 did not have an impact on the BFLF2-3'UTR. The effects of the miRNAs on the BFLF2 protein level were not analyzed. This will be carried out in future studies.

For immunofluorescence and western blot analysis, BFLF2-specific monoclonal antibodies using a bacterially expressed GST-BFLF2-fusion protein were produced in cooperation with Mrs. Dr. Elisabeth Kremmer (Helmholtz Zentrum München, Munich, Germany). Western Blot analysis showed that the antibodies recognized the BFLF2-protein specifically. Endogenous BFLF2 was traceable in the examined EBV-positive B-cell lines Raji and B95.8 upon induction of the replication cycle with TPA. As expected, latently infected Raji- and B95.8 cells on the contrary didn't contain traceable BFLF2. These studies reproduced the results of the team of Alberto Faggioni (University Rome) (Gonnella, Farina et al., 2005). Furthermore, immunofluorescence analysis showed that BFLF2 is located in the cell nucleus.

7. Literaturverzeichnis

- Abrahante, J. E., A. L. Daul, et al. (2003). "The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs." *Dev Cell* **4**(5): 625-637.
- Ambros, V., B. Bartel, et al. (2003). "A uniform system for microRNA annotation." *Rna* **9**(3): 277-279.
- Aravin, A. A., M. Lagos-Quintana, et al. (2003). "The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development." *Dev Cell* **5**(2): 337-350.
- Arrand, J. R., L. Rymo, et al. (1981). "Molecular cloning of the complete Epstein-Barr virus genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments." *Nucleic Acids Res* **9**(13): 2999-3014.
- Babcock, G. J., L. L. Decker, et al. (1998). "EBV persistence in memory B cells in vivo." *Immunity* **9**(3): 395-404.
- Baehrecke, E.H. (2003). "miRNAs: micro managers of programmed cell death." *Curr Biol* **13**: 473-475.
- Baer, R., A. T. Bankier, et al. (1984). "DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome." *Nature* **310**(5974): 207-211.
- Bagert, B.A.(2009). "Epstein-Barr virus in multiple sclerosis." *Curr Neurol Neurosci Rep* **9**(5): 405-410.
- Barad, O., E. Meiri, et al. (2004). "MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues." *Genome Res* **14**(12): 2486-2494.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* **116**(2): 281-297.
- Barth,S.,T. Pfuhl, A.Mamiani, C. Ehses, K. Roemer, E. Kremmer, c. Jaker, J. Hock, G. Meister, and F. A. Graesser (2008)"Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA poloymerase BALF5." *Nucliec Acids Res* **36**: 666-675.
- Bashirullah, A., A. E. , et al. (2003). "Coordinate regulation of small temporal RNAs at the onset of *Drosophila* metamorphosis." *Dev Biol* **259**(1): 1-8.
- Basyuk, E., F. Suavet, et al. (2003). "Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products." *Nucleic Acids Res* **31**(22): 6593-6597.

- Bauer, G., P. Hofler, et al. (1982). "Epstein-Barr virus induction by a serum factor. I. Induction and cooperation with additional inducers." *Virology* **121**(1): 184-194.
- Beisel, C., J. Tanner, et al. (1985). "Two major outer envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus are encoded by the same gene." *J Virol* **54**(3): 665-674.
- Burkitt, D. (1958). "A sarcoma involving the jaws in African children." *Br J Surg* **46**(197): 218-223.
- Cai, X., A. Schäfer, S. Lu, J.P.Bilello, R.C.Desrosiers, R. Edwards, N. Raab-Traub and B.R. Cullen (2006). "Epstein-Barr Virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed." *PLoS Pathog* **2**(3): 236-247.
- Calin, G. A., C. G. Liu, et al. (2004). "MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(32): 11755-11760. Epub 2004 Jul 29.
- Chan, J.A., M. Krichevsky, and K.S. Kosik (2005). "MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells." *Cancer Res.* **65**: 6029-6033.
- Chavrier, P., H. Gruffat, et al. (1989). "The Epstein-Barr virus (EBV) early promoter DR contains a cis-acting element responsive to the EBV transactivator EB1 and an enhancer with constitutive and inducible activities." *J Virol* **63**(2): 607-614.
- Chevallier-Greco, A., H. Gruffat, et al. (1989). "The Epstein-Barr virus (EBV) DR enhancer contains two functionally different domains: domain A is constitutive and cell specific, domain B is transactivated by the EBV early protein R." *J Virol* **63**(2): 615-623.
- Chevallier-Greco, A., E. Manet, et al. (1986). "Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter." *Embo J* **5**(12): 3243-3249.
- Cimmino, A., G.A. Calin, M. Fabbri, M.V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S.E. Wojcik, R.I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Adler, S. Volinia, C.G. Liu, T.J. Kipps, M. Negrini, and C.M. Croce (2005). "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 13944-13949.
- Clifford, P. (1970) "A review on the epidemiology of nasopharyngeal carcinoma." *Int J Cancer* **5**: 287-309
- Countryman, J. and G. Miller (1985). "Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA." *Proc Natl Acad Sci USA* **82**(12): 4085-4089.

- Cullen, B. R. (2004). "Transcription and processing of human microRNA precursors." Mol Cell **16**(6): 861-865.
- Deacon, E.M., G. Pallesen, G. Niedobitek, J. Crocker, L. Brooks, A.B. Rickinson and L.S. Young (1993). "Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells." J Exp. Med. **177**: 339-349.
- Elbashir, S. M., J. Martinez, et al. (2001). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate." Embo J **20**(23): 6877-6888.
- Enright, A. J., B. John, et al. (2003). "MicroRNA targets in *Drosophila*." Genome Biol **5**(1): 12.
- Epstein, M. A., B. G. Achong, et al. (1964). "Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma." Lancet **15**: 702-703.
- Epstein, M. A., A. J. Morgan, et al. (1985). "Protection of cottontop tamarins against Epstein-Barr virus-induced malignant lymphoma by a prototype subunit vaccine." Nature **318**(6043): 287-289.
- Esquela-Kerschner, A., and F.J. Slack (2006). "Oncomirs- microRNAs with a role in cancer." Nat Rev Cancer **6**: 259-269.
- Evans, A. S. (1982). "The clinical illness promotion factor: a third ingredient." Yale J Biol Med **55**(3-4): 193-199.
- Fahraeus, R., H. L. Fu, et al. (1988). "Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in nasopharyngeal carcinoma." Int J Cancer **42**(3): 329-338.
- Farina, A., G. Cardinali, R. Santarelli, R. Gonnella, J. Webster-Cyriaque, R. Bei, R. Muraro, L. Frati, A. Faggioni and A. Angeloni (2004). "Intracellular localization of the Epstein-Barr virus BFRF1 gene product in lymphoid cell lines and oral hairy leukoplakia lesions." J Med Virol **72**(1): 102-111.
- Farina, A., R. Feederle, S. Raffa, R. Gonnella, R. Santarelli, L. Frati, A. Angeloni, M.R. Torrisi, A. Faggioni, H.J. Delecluse (2005). "BFRF1 of Epstein-Barr virus is essential for efficient primary viral envelopment and egress." J Virol **79**(6): 3703-3712.
- Farina, A., R. Santarelli, R. Gonnella, R. Bei, R. Muraro, G. Cardinali, S. Uccini, G. Ragona, L. Frati, A. Faggioni A. and Angeloni (2000). "The BFRF1 gene of Epstein-Barr virus encodes a novel protein." Journal of Virology **74**(7): 3235-3244.
- Farrell, P. J., D. T. Rowe, et al. (1989). "Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos." Embo J **8**(1): 127-132.

- Feederle, R., M. Kost, et al. (2000). "The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators." Embo J **19**(12): 3080-3089.
- Fuchs, W., B.G. Klupp, H. Ganzow, N. Osterrieder, and T.C. Mettenleiter. (2002). "The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions." J Virol **76**: 364-378
- Furnari, F. B., M. D. Adams, et al. (1993). "Unconventional processing of the 3' termini of the Epstein-Barr virus DNA polymerase mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 378-382.
- Gerber, P., S. Lucas, et al. (1972). "Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis." Lancet **2**(7785): 988-989.
- Gergely, L., G. Klein, et al. (1971). "Host cell macromolecular synthesis in cells containing EBV-induced early antigens, studied by combined immunofluorescence and radioautography." Virology **45**(1): 22-29.
- Geser, A., G.M. Lenoir, M. Anvret, G. Bornkamm, G. Klein, E.H. Williams, D.H. Wright and G. De-The (1983). "Epstein-Barr virus markers in a series of Burkitt's lymphomas from the West Nile District, Uganda". Eur J Cancer Clin Oncol **19**:1393-1404.
- Golden, H. D., R. S. Chang, et al. (1973). "Leukocyte-transforming agent: prolonged excretion by patients with mononucleosis and excretion by normal individuals." J Infect Dis **127**(4): 471-473.
- Gonnella, R., A. Farina, et al. (2005). "Characterization and intracellular localization of the Epstein-Barr virus protein BFLF2: interactions with BFRF1 and with the nuclear lamina." J Virol **79**(6): 3713-3727.
- Graesser, F.A., P.G. Murray, E. Kremmer, K. Klein, K. Remberger, W. Feiden, G. Reynolds, G. Niedobitek, L.S. Young and N. Mueller-Lantsch, N. (1994). "Monoclonal antibodies directed against the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 (EBNA1): immunohistologic detection of EBNA1 in the malignant cells of Hodgkin's disease." Blood **84**:3792-3798.
- Granato, M., A. Farina, R. Gonnella, R. Santarelli, L. Frati, A. Faggioni, A. Angeloni (2006). "Regulation of the expression of the Epstein-Barr virus early gene BFRF1." Virology **347**(1): 109-116.
- Granzow, H. F. Weiland, A. Jons, B.G. Klupp, A. Karger, T.C. Mettenleiter (1997). "Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment." J Virol **71**(3): 2072-2082.

- Gratama, J. W., M. A. Oosterveer, et al. (1988). "Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(22): 8693-8696.
- Greenspan, J. S., D. Greenspan, et al. (1985). "Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion." N Engl J Med **313**(25): 1564-1571.
- Gregory, R. I., K. P. Yan, et al. (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." Nature **432**(7014): 235-240.
- Grundhoff, A., C.S. Sullivan, D. Ganem (2006). "A combined computational and microarray - based approach identifies novel micro RNAs encoded by gamma-herpesviruses." RNA **12**(5): 733-750.
- Hadar, T., Rakina, M. and Kata, E. (1986) "Significance of specific Epstein-Barr virus IgA and elevated IgG antibodies to viral capsid antigen in nasopharyngeal carcinoma patients". J Med Virol **20**:329-339.
- Hammerschmidt, W. and B. Sugden (1988). "Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus." Cell **55**(3): 427-433.
- Han, J., Y. Lee, et al. (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." Genes Dev **18**(24): 3016-3027.
- Hanto, D.W., G. Frizzera, D.T. Purtilo, K. Sakamoto, J.L. Sullivan, A.K. Saemundsen, G. Klein, R.L. Simmons and J.S. Najarian (1981). "Clinical spectrum of lymphoproliferative disorders in renal transplant recipients and evidence for the role of Epstein-Barr virus." Cancer Res **41**: 4253-4261.
- Hardwick, J. M., P. M. Lieberman, et al. (1988). "A new Epstein-Barr virus transactivator, R, induces expression of a cytoplasmic early antigen." J Virol **62**(7): 2274-2284.
- Hayward, S. D. and E. Kieff (1977). "DNA of Epstein-Barr virus. II. Comparison of the molecular weights of restriction endonuclease fragments of the DNA of Epstein-Barr virus strains and identification of end fragments of the B95-8 strain." J Virol **23**(2): 421-429.
- Henderson, A., S. Ripley, et al. (1983). "Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(7): 1987-1991.
- Henderson, B.E., E. Louie, J.J. SooHoo, P. Buell and M.B. Gardner (1976). "Risk factors associated with nasopharyngeal carcinoma." N Engl J Med **295**: 1101-1106.

- Henle, G., W. Henle, et al. (1969). "Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups." J Natl Cancer Inst **43**(5): 1147-1157.
- Henle, G., W. Henle, et al. (1968). "Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-ypete virus to infectious mononucleosis." Proc Natl Acad Sci U S A **59**(1): 94-101.
- Henle, W., V. Diehl, et al. (1967). "Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells." Science **157**(792): 1064-1065.
- Herbst, H., F. Dallenbach, G. Niedobitek, I. Anagnostopoulos, M. Hummel, T. Finn, G. Jautzke, N. Mueller-Lantsch and H.Stein (1991). "Expression of latent membrane proteins (LMP) of Epstein-Barr virus in malignant lymphomas." Verh Dtsch Ges Pathol **75**: 175-178.
- Hirayama, T. and Y. Ito (1981). "A new view of the etiology of nasopharyngeal carcinoma." Prev Med **10**: 614-622.
- Houbaviy, H. B., M. F. Murray, et al. (2003). "Embryonic stem cell-specific MicroRNAs." Dev Cell **5**(2): 351-358.
- Hudewentz, J., H. Delius, et al. (1982). "Two distant regions of the Epstein-Barr virus genome with sequence homologies have the same orientation and involve small tandem repeats." Embo J **1**(1): 21-26.
- Hutvagner, G. and P. D. Zamore (2002). "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." Science **297**(5589): 2056-2060. Epub 2002 Aug 1.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura (1983). "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." J Bacteriol **153**: 163-168.
- Jones, J.F., S. Shurin, C. Abramowsky, R.R. Tubbs, C.G. Sciotto, R. Wahl, J. Sands, D. Gottman, B.Z. Katz and J. Sklar (1988). "T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections." N Engl J Med **318**: 733-741.
- Kieff, E. (1996). "Epstein-Barr Virus and its replication." Fields Virology. B. Fields, D. Knipe and P. Howley. Philadelphia, Lippincott-Raven. **2**: 2343-2396.
- Kikuta,H., Y. Taguchi, K. Tomizawa, K. Kojima, N. Kawamura, A. Ishizaka, Y. Sakiyama, S. Matsumoto, S. Imai, T. Kinoshita and et all (1988)." Epstein-Barr virus genome - positive T lymphocytes in a boy with chronic active EBV infection associated with Kawasaki-like disease." Nature **333**: 455-457.
- Kim Do, N., H.S. Chae, S.T. Oh, J.H. Kang, C.H. Park, W.S. Park, K. Takada, J.M. Lee, and S.K.Lee (2007). "Expression of viral micro RNAs in Epstein-Barr virus -associated gastric carcinoma." J.Virol. **81**: 1033-1036.

- Kintner, C. R. and B. Sugden (1979). "The structure of the termini of the DNA of Epstein-Barr virus." Cell **17**(3): 661-671.
- Kluiver, J., S. Poppema, D. de Jong, T. Blokzijl, G. Harms, S. Jacobs, B.J. Kroesen, and A. van den Berg (2005). "BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas." J. Pathol. **207**: 243-249.
- Klupp, B.G., H. Granzow and T.C. Mettenleiter (2000). "Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product." J Virol **74**: 10063-10073.
- Knecht, H., B.F. Odermatt, E. Bachmann, S. Teixeira, R. Sahli, D. Hayoz, P. Heitz and F. Bachmann (1991). "Frequent detection of Epstein-Barr virus DNA by the polymerase chain reaction in lymph node biopsies from patients with Hodgkin's disease without genomic evidence of B- or T-cell clonality." Blood **78**: 760-767.
- Krichevsky, A. M., K. S. King, et al. (2003). "A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development." Rna **9**(10): 1274-1281.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, et al. (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science **294**(5543): 853-858.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, et al. (2003). "New microRNAs from mouse and human." Rna **9**(2): 175-179.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, et al. (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." Curr Biol **12**(9): 735-739.
- Lai, E. C., P. Tomancak, et al. (2003). "Computational identification of Drosophila microRNA genes." Genome Biol **4**(7): 42.
- Landgraf, P., M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovono, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A.O. Kamphorst, M. Landthaler, C. Lin, N.D. Socci, L. Hermida, v. Fulci, S. Chiaretti, R. Foa, j. Schliwka, U. Fuchs, A. Novosel, R.U. Muller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D.B. Weir, R. Choksi, G. De Vita, D. Frezzetti, H.I. Trompeter, V. Hornubg, G. Teng, G. Hartmann, M. Benzing, P. Lichter, W. Tam, M.J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, J.J. Russo, C. Sander, M. Zavolan and T. Tuschl. (2007). "A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing." Cell **129**: 1401-1414.
- Lau, N. C., L. P. Lim, et al. (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*." Science **294**(5543): 858-862.
- Lee, R. C. and V. Ambros (2001). "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*." Science **294**(5543): 862-864.

- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-854.
- Lee, Y., C. Ahn, et al. (2003). "The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-419.
- Lee, Y., K. Jeon, et al. (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." Embo J **21**(17): 4663-4670.
- Lewis, B. P., C. B. Burge, et al. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.
- Lewis, B. P., I. H. Shih, et al. (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." Cell **115**(7): 787-798.
- Lim, L. P., M. E. Glasner, et al. (2003). "Vertebrate microRNA genes." Science **299**(5612): 1540.
- Lim, L. P., N. C. Lau, et al. (2003). "The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*." Genes Dev **17**(8): 991-1008.
- Lin, S. Y., S. M. Johnson, et al. (2003). "The *C. elegans* hunchback homolog, *hbl-1*, controls temporal patterning and is a probable microRNA target." Dev Cell **4**(5): 639-650.
- Lindahl, T., A. Adams et al. (1976). "Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line." J Mol Biol **102**(3): 511-530.
- Lindahl, T., G. Klein, B.M. Reedman, B. Johansson and S.Singh (1974). "Relationship between Epstein-Barr virus (EBV) DNA and the EBV-determined nuclear antigen (EBNA) in Burkitt lymphoma biopsies and other lymphoproliferative malignancies." Int J Cancer **13**: 764-772.
- Lund, E., S. Guttinger, et al. (2004) "Nuclear export of microRNA precursors." Science **303**(5654): 95-98.
- Maniatis, T., J. Sambrook and E.F. Fritsch (1989). "Molecular cloning, a laboratory manual." Cold Spring Harbor, Laboratory Press **1-3**.
- Mattick, J.S., and I.V. Makunin (2005). "Small regulatory RNAs in mammals." Hum Mol Genet **14**: 121-132.
- Mettenleiter, T.C. (2002): "Herpesvirus assembly and egress." J Virol **76**: 1537-1547.
- Minarovits, J., L.F. Hu, S. Imai, Y. Harabuchi, A. Kataura, S. Minarovits-Kormuta, T. Osato and G. Klein (1994). "Clonality, expression and methylation patterns of the Epstein-Barr virus genomes in lethal midline granulomas classified as peripheral angiocentric T cell lymphomas." J Gen Virol **75 (Pt 1)**: 77-84.

- Miska, E. A., E. Alvarez-Saavedra, et al. (2004). "Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain." Genome Biol **5**(9): R68.
- Miyashita, E. M., B. Yang, et al. (1997). "Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell." J Virol **71**(7): 4882-4891.
- Miyashita, E. M., B. Yang, et al. (1995). "A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo." Cell **80**(4): 593-601.
- Morgan, D. G., J. C. Niederman, et al. (1979). "Site of Epstein-Barr virus replication in the oropharynx." Lancet **2**(8153): 1154-1157.
- Mourelatos, Z., J. Dostie, et al. (2002). "miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs." Genes Dev **16**(6): 720-728.
- Mueller-Lantsch (1985). "Monoclonal antibodies and viruses: Application to the Epstein-Barr virus system. Handbook of monoclonal antibodies." S. Ferrone and M. P. Dierich. New Jersey, USA, Noyes Publications: **221-234**.
- Muranyi, W., J. Haas, M. Wagner, G. Krohne and U.H. Koszinowski (2002). "Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina." Science **297**(5582): 854-857.
- Neubauer, A., J. Rudolph, C. Brandmuller, F.T. Just, and N. Osterrieder (2002). "The equine herpesvirus 1 UL34 gene product is involved in an early step in virus egress and can be efficiently replaced by a UL34-GFP fusion protein." Virology **300**: 189-204.
- Niedobitek, G., A. Agathangelou, et al. (1997). "Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells." J Pathol **182**(2): 151-159.
- Nonoyama, M., C.H. Huang, J.S. Pagano, G. Klein and S. Singh (1973). "DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma." Proc Natl Acad Sci USA **70**: 3265-3268.
- Okamura, K., and Lai, E.C. (2008). "Endogenous small interfering RNAs in animals." Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **9**(9): 673-678.
- Olsen, P. H. and V. Ambros (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): 671-680.
- Pallesen, G., S.J. Hamilton-Dutoit, M. Rowe and L.S. Young (1991). "Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease." Lancet **337**: 320-322.

- Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, et al. (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." Nature **408**(6808): 86-89.
- Pfeffer, S., M. Zavolan, et al. (2004). "Identification of virus-encoded microRNAs." Science **304**(5671): 734-736.
- Pohl, D. (2009). "Epstein-Barr virus and multiple sclerosis." J Neurol Sci. **286**(1-2): 62-64.
- Polack, A., G. Hartl, et al. (1984). "A complete set of overlapping cosmid clones of M-ABA virus derived from nasopharyngeal carcinoma and its similarity to other Epstein-Barr virus isolates." Gene **27**(3): 279-288.
- Pope, J. H., M. K. Horne, et al. (1968). "Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus." Int J Cancer **3**(6): 857-866.
- Pratt Zachary, L., m. Kuzembayeva, S. Sengupta, and B. Sugden (2009). "The microRNAs of Epstein-Barr Virus are expressed at dramatically differing levels among cell lines." Virology **386**: 387-397.
- Pritchett, R. F., S. D. Hayward, et al. (1975). "DNA of Epstein-Barr virus. I. Comparative studies of the DNA of Epstein-Barr virus from HR-1 and B95-8 cells: size, structure, and relatedness." J Virol **15**(3): 556-559.
- Purtilo, D.T., K. Sakamoto and A.K. Saemundsen (1981). "Documentation of Epstein-Barr virus infection in immunodeficient patients with life threatening lymphoproliferative disease by clinical, virological and immunopathological studies." Cancer Res **41**: 4226-4235.
- Raab-Traub, N., R. Hood, et al. (1983). "Epstein-Barr virus transcription in nasopharyngeal carcinoma." J Virol **48**(3): 580-590.
- Rawlins, D. R., G. Milman, et al. (1985). "Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region." Cell **42**(3): 859-568.
- Reinhart, B. J. and D. P. Bartel (2002). "Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats." Science **297**(5588): 1831.
- Reinhart, B. J., F. J. Slack, et al. (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." Nature **403**(6772): 901-906.
- Reynolds, A.E., B.J. Ryckman, J.D. Baines, Y. Zhou, L. Liang, and R.J. Roller (2001). "U(L) 31 and U(L) 34 proteins of herpes simplex virus type 1 from a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids." J. Virol. **75**: 8803-8817.

- Rickinson, A. B. and E. Kieff (1996). Epstein-Barr Virus. Fields Virology. B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott-Raven. **2**: 2397-2446.
- Rickinson, A. B., L. S. Young, et al. (1987). "Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells." J Virol **61**(5): 1310-1317.
- Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, et al. (2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." Genome Res **14**(10A): 1902-1910.
- Roizman, B. (1990). "Whither herpesviruses?" Adv Exp Med Biol **278**: 285-291.
- Rowe, M., H. S. Evans, et al. (1987). "Monoclonal antibodies to the latent membrane protein of Epstein-Barr virus reveal heterogeneity of the protein and inducible expression in virus-transformed cells." J Gen Virol **68** (Pt 6): 1575-1586.
- Rowe, M., L. S. Young, et al. (1989). "Distinction between Epstein-Barr virus type A (EBNA 2A) and type B (EBNA 2B) isolates extends to the EBNA 3 family of nuclear proteins." J Virol **63**(3): 1031-1039.
- Sample, J., L. Young, et al. (1990). "Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes." J Virol **64**(9): 4084-4092.
- Schepers, A., D. Pich, et al. (1993). "A transcription factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr virus." Embo J **12**(10): 3921-3929.
- Schmittgen, T. D., J. Jiang, et al. (2004). "A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors." Nucleic Acids Res **32**(4): e43.
- Seggerson, K., L. Tang, et al. (2002). "Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation." Dev Biol **243**(2): 215-225.
- Sempere, L. F., S. Freemantle, et al. (2004). "Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation." Genome Biol **5**(3): R13.
- Sempere, L. F., N. S. Sokol, et al. (2003). "Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-Complex gene activity." Dev Biol **259**(1): 9-18.
- Seto, E., A. Moosmann, S. Grömminger, N. Walz, A. Grundhoff and W. Hammerschmidt (2010). "Micro RNAs of Epstein-Barr Virus Promote Cell Cycle Progression and Prevent Apoptosis of Primary Human B Cells." Plos Pathogens **6**(8): 1001063.

- Sewer, A., N. Paul, P. Landgraf, A. Aravin, S. Pfeffer, M.J. Brownstein, T. Tuschl, E. van Nimwegen and M. Zavolan (2005). "Identification of clustered micro RNAs using an ab initio predictions method." BMC Bioinformatics **6**: 267.
- Shiba, C., T. Daikoku, F. Goshima, H. Takakuwa, Y. Yamauchi, O. Koiwai, and Y. Nishiyama (2000). "The UL34 gene product of herpes virus type 2 is a tail-anchored type II membrane protein that is significant for virus envelopment." J Gen Virol **81**: 2397-2405.
- Sixbey, J. W., J. G. Nedrud, et al. (1984). "Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells." N Engl J Med **310**(19): 1225-1230.
- Skare, J. and J. L. Strominger (1980). "Cloning and mapping of BamHI endonuclease fragments of DNA from the transforming B95-8 strain of Epstein-Barr virus." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(7): 3860-3864.
- Slack, F. J., M. Basson, et al. (2000). "The lin-41 RBCC gene acts in the C. elegans heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor." Mol Cell **5**(4): 659-669.
- Smith, P.R. and B.E. Griffin (1992). "Transcription of the Epstein-Barr virus gene EBNA-1 from different promoters in nasopharyngeal carcinoma and B-lymphoblastoid cells." J Virol **66**: 706-714.
- Stark, A., J. Brennecke, et al. (2003). "Identification of Drosophila MicroRNA targets." PLoS Biol **1**(3): E60.
- Sugihara, K., H. Reupke, et al. (1990). "Negative staining EM for the detection of Epstein-Barr virus in oral hairy leukoplakia." J Oral Pathol Med **19**(8): 367-370.
- Sullivan, C.S., A.T. Grundhoff, S. Tevethia, J.M. Pipas and D. Ganem (2005). "SV40 - encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells." Nature **435**(7042): 682-686.
- Takada, K., J. Komano, et al. (1999). "[The role of Epstein-Barr virus in oncogenesis]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **44**(16): 2565-2574.
- Takada, K., N. Shimizu, et al. (1986). "trans activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment." J Virol **57**(3): 1016-1022.
- Tanner, J., Y. Whang, et al. (1988). "Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes." J Virol **62**(12): 4452-4464.
- Toussiot, E. and Roudier, J. (2008). "Ebstein-Barr virus in autoimmune diseases." Best Pract Res Clin Rheumatol **22**: 883-896.

- Trivedi, P., M. G. Masucci, et al. (1991). "The epstein-Barr-virus-encoded membrane protein LMP but not the nuclear antigen EBNA-1 induces rejection of transfected murine mammary carcinoma cells." Int J Cancer **48**(5): 794-800.
- Uccini, S., F. Monardo, A. Stoppacciaro, A. Gradilone, A.M. Agliano, A. Faggioni, V. Manzari, L. Vago, G. Costanzi and L.P. Ruco (1990): "High frequency of Epstein-Barr virus genome detection in Hodgkin´s disease of HIV-positiv patients." Int J Cancer **46**: 581-585.
- Wightman, B., T. R. Burglin, et al. (1991). "Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during Caenorhabditis elegans development." Genes Dev **5**(10): 1813-1824.
- Wightman, B., I. Ha, et al. (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans." Cell **75**(5): 855-862.
- Xu, P., M. Guo, and B.A. Hay (2004). "MicroRNAs and the regulation of cell death." Trends Genet. **20**: 617-624.
- Yamauchi, Y., C. Shiba, F. Goshima, A. Nawa, T. Murata, and Y. Nishiyama (2001). "J Gen Virol **82**: 1423-1428.
- Yates, J., N. Warren, et al. (1984). "A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(12): 3806-3810.
- Ye, G.J., B. Roizman (2000). "The essential protein encoded by the UL31 gene of herpes simplex virus 1 depends for its stability on the presence of UL34 protein." Proc Natl Acad Sci USA **97**(20): 11002-11007.
- Yoshiyama, H., Shimizu, N. and Takada, K. (1995) Persistent Epstein-Barr virus infection in a human T-cell line: unique program of latent virus expression. EMBO J **14**: 3706-3711.
- Young, L. S., C. W. Dawson, et al. (1988). "Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma." J Gen Virol **69** (Pt 5): 1051-1065.
- Zalani, S., E. Holley-Guthrie, et al. (1995). "The Zif268 cellular transcription factor activates expression of the Epstein-Barr virus immediate-early BRLF1 promoter." J Virol **69**(6): 3816-3823.
- Zeng, Y. and B. R. Cullen (2003). "Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells." Rna **9**(1): 112-123.

-
- Zeng, Y., R. Yi, et al. (2005). "Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha." *Embo J* **24**(1): 138-148.
- Zhu, Jia Yun, t. Pfuhl, N. Motsch, S. Barth, J. Nichollis, F. Grässer, and G. Meister (2009). "Identification of Novel Epstein-Barr Virus MicroRNA Genes from Nasopharyngeal Carcinomas." *Journal of Virology* **83**(7): 3333-3341.
- zur Hausen, H., F. J. O'Neill, et al. (1978). "Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA." *Nature* **272**(5651): 373-375.
- zur Hausen, H., H. Schulte-Holthausen, G. Klein, W. Henle, G. Henle, P. Clifford and L. Santesson (1970). "EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx." *Nature* **228**: 1056-1058.

Lebenslauf

Name, Vorname	Fluck, Petra
Adresse	Zollstockstraße 8 66955 Pirmasens
Geburtstag	22.01.1980
Geburtsort	Rodalben
Geburtsname	Goutier
Eltern	Dr. Klaus Goutier, Rechtsanwalt und Steuerberater Traudel Goutier, Verwaltungsangestellte i. R.
Geschwister	Ralf Goutier, Dipl. Ingenieur
Besuchte Schulen	1986-1990 Robert-Schumann-Grundschule, Pirmasens 1990-1999 Hugo-Ball-Gymnasium, Pirmasens
Hochschule	1999-2005 Justus-Liebig-Universität, Gießen
März 2005 bis Juni 2006	Experimentelle Promotionsarbeit in Homburg bei Prof. Grässer, Institut für Infektionsmedizin, Abteilung Virologie,
Juli 2006 bis Juni 2007	Zusammenstellung der Arbeit und Fertigstellung der Versuche
Tätigkeit	seit 1.1.2007 angestellte Tierärztin in der Tierklinik Dr. Meisel-Gehl, Zweibrücken