

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

**Expression und Analyse der nicht-kodierenden EBER
Transkripte des Epstein-Barr Virus (EBV)**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2016

Vorgelegt von: Moritz Johannes Wolff
geb. am 01.02.1986 in Herrenberg

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2	SUMMARY	2
3	EINLEITUNG.....	3
3.1	Das Epstein-Barr Virus.....	3
3.1.1	Die Epstein-Barr Virus Infektion.....	4
3.1.2	Epstein-Barr Virus assoziierte Tumorerkrankungen	5
3.1.2.1	Burkitt Lymphom.....	5
3.1.2.2	Hodgkin-Lymphom.....	6
3.1.2.3	Lymphoproliferative Erkrankungen unter Immunsuppression	6
3.1.2.4	Nasopharynxkarzinom	7
3.1.2.5	NK/T-Zell Lymphome.....	7
3.1.3	Die EBV kodierten RNAs EBER1 und EBER2.....	8
3.1.3.1	Struktur und Lokalisation der EBER1/2 RNAs	8
3.1.3.2	Funktion der EBER1/2 RNAs	9
3.2	RNA-Interferenz	12
3.2.1	microRNAs	12
3.2.2	microRNAs und Onkogenese	13
3.2.3	SEC23A-Proteine	14
3.2.4	microRNA-200c	15
3.3	Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit.....	16
4	MATERIAL	17
4.1	Geräte	17
4.2	Software.....	18
4.3	Chemikalien, Membranen, Filter	18
4.4	Puffer und Lösungen.....	20
4.5	Enzyme	26

4.6	Größen- und Molekulargewichtsstandards.....	26
4.6.1	DNA-Größenstandard.....	26
4.6.2	Protein-Molekulargewichtsmarker.....	27
4.7	Antikörper.....	27
4.7.1	Primärantikörper.....	27
4.7.2	Sekundärantikörper.....	28
4.8	Bakterienstämme.....	28
4.9	Adhärente Zelllinien.....	28
4.10	Nähr- und Kulturmedien.....	28
4.10.1	Nährmedium für Bakterien.....	28
4.10.2	Kulturmedium für Säugerzellen.....	29
4.11	Vektoren.....	29
4.11.1	pGEM®-T.....	29
4.11.2	pSG5.....	30
4.11.3	Expressionsplasmide.....	30
4.12	Oligonukleotide.....	31
4.12.1	Primer zum Klonieren der Fragmente EBER2 und EBER1 Mut 5-10.....	31
4.12.2	Sonden für Northern Blots.....	31
5	METHODEN.....	32
5.1	Bakterielle Zellkultur.....	32
5.1.1	Aufzucht und Lagerung von Bakterien.....	32
5.1.2	Herstellung kompetenter Bakterien (Rubidium-Methode).....	32
5.1.3	Transformation kompetenter Bakterien.....	33
5.1.4	Blau-Weiß-Selektion.....	33

5.2	Eukaryotische Zellkultur	34
5.2.1	Monolayer Zellkultur	34
5.2.2	Transfektion eukaryotischer Zellen mit PolyFect	34
5.3	DNA-Techniken.....	35
5.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	35
5.3.1.1	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA (Boiling Präparation)	35
5.3.1.2	Präparative DNA-Isolierung (NucleoBond™-Präparation)	35
5.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung	36
5.3.3	Polymerase-Kettenreaktion	37
5.3.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	39
5.3.5	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	40
5.3.6	Dephosphorylierung von Vektoren.....	41
5.3.7	Ligation von DNA-Fragmenten	42
5.3.8	Ligation von PCR-Fragmenten in pGEM®-T Vektor	42
5.4	RNA-Techniken.....	43
5.4.1	RNA-Isolation	43
5.4.2	Northern Blot	44
5.4.2.1	Herstellung des Urea-Polyarylamidgels	44
5.4.2.2	RNA-Transfer und chemisches Crosslinken.....	45
5.4.2.3	Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde	45
5.4.2.4	Nachweis spezifischer RNA	47
5.5	Proteintechniken	47
5.5.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten	47
5.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	48
5.5.3	Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels.....	49
5.5.4	Western Blot (Immunoblot).....	49
5.5.4.1	Proteintransfer	50
5.5.4.2	Immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen.....	50
5.6	Dual-Luciferase® Reporter Assay.....	51

6	ERGEBNISSE	52
6.1	Fragestellung	52
6.2	Klonierung des EBER2 Fragments	53
6.2.1	Amplifizierung des EBER2 aus dem EBER1/2 Fragment	53
6.2.2	Ligation in pGEM-T und pSG5 Vektoren	54
6.2.3	Transformation in pMOS Bakterien.....	55
6.2.4	Expressionskontrollen.....	57
6.3	Effekte der EBER-RNAs auf die SEC23A 3'-UTR.....	58
6.4	Effekt der EBER-RNAs auf die Proteinmenge von SEC23A.....	61
6.5	Klonierung eines mutierten EBER Fragments.....	64
6.6	Nachweis der EBER Mutation in 23nt langen Fragmenten	
	im Northern Blot	66
7	DISKUSSION	67
8	ANHANG.....	71
8.1	Sequenzen.....	71
8.2	Abkürzungsverzeichnis	72
9	DANKSAGUNG.....	74
10	LEBENS LAUF.....	75
11	LITERATURVERZEICHNIS	76

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaues eines Herpesvirion.....	3
Abbildung 2: A) Nasales NK/T-Zell Lymphom mit Infiltration des Integuments. B) CT-Transversalschnitt: Infiltration in den rechten Sinus maxillaris/u. sphenoidalis, sowie den Siebbeinzellen (HUANG et al., 2016)	7
Abbildung 3: Sekundärstruktur von EBER1 und EBER2 (IWAKIRI, 2014)	9
Abbildung 4: Sekundärstruktur von EBER1/2 und Orte der Protein Interaktion mit LA, PKR und L22 (TAKADA, 2012).....	10
Abbildung 5: 1kb Plus Leiter (Quelle: thermofisher.com)	26
Abbildung 6: Vektorkarte von pGEM®-T (Quelle: promega.com).....	29
Abbildung 7: Vektorkarte von pSG 5 (Quelle: genomics.agilent.com)	30
Abbildung 8: Schematische Darstellung des EBER1/2 Fragments in Bezug auf die Bindungsstellen von Forward und Reverse Primern für das EBER2 Fragment.....	53
Abbildung 9: Sequenz von EBER1/2	53
Abbildung 10: „Colony-PCR“ von EBER2	55
Abbildung 11: Kontrollverdau des pSG5-EBER2 Klon Nr.2	56
Abbildung 12: Analyse zweier EBER2 Expressionsklone im Northern Blot	57
Abbildung 13: Luciferase Assay von EBER1 und EBER2 mit/ohne Koexpression von miR-200c	58
Abbildung 14: Einfluss von EBER1+EBER2 auf die 3'UTR-SEC23A	60
Abbildung 15: Nachweis der Expression von miR-200c zur Transfektionskontrolle	61
Abbildung 16: Western Blot zur Analyse der Proteinmenge von SEC23A.....	62
Abbildung 17: EBER-RNAs haben keinen Einfluss auf die Proteinmenge von SEC23A	63
Abbildung 18: Schematische Abbildung beider Amplifikate und deren SacI Lokalisation	64
Abbildung 19: Kontrollverdau der EBER1 Mut 5-10 Klone	65
Abbildung 20: Expressionsnachweis des mutierten EBER1 Fragment im Northern Blot.....	66

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Expressionsprofile der EBV-Latenztypen und der assoziierten Erkrankung	5
Tabelle 2: Proteine des „LMW-Molekularmarker“	27
Tabelle 3: Übersicht der PCR-Primer	31
Tabelle 4: Übersicht der Northern Blot-Sonden	31
Tabelle 5: Schema eines 50 µl PCR-Ansatzes	37
Tabelle 6: PCR-Programm	38
Tabelle 7: Schema eines Colony-PCR Mastermix Ansatzes für 12 Bakterienkolonien inklusive +/- Kontrolle.....	38
Tabelle 8: Geräteeinstellung für eine Colony-PCR	39
Tabelle 9: Agarosekonzentration für die entsprechenden Fragmentgrößen.....	39
Tabelle 10: Standard-Restriktionsansatz	41
Tabelle 11: Pipettierschema zweier Ligationsansätze.....	42
Tabelle 12: Standard-Ligationsansatzes für pGEM®-T Ligation	43
Tabelle 13: Bestandteile eines 12% Urea-Polyarylamidgels	44
Tabelle 14: Zusammensetzung der Komponenten zur Herstellung eines dsTemplate für RNA-Sonde	45
Tabelle 15: Weitere Reagenzien für die Herstellung eines dsDNA zur Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde	46
Tabelle 16: Bestandteile der <i>in vitro</i> Transkription einer Northern Blot Sonde	46
Tabelle 17: Komponenten und Volumina zur Herstellung eines 10%-iges Polyacrylamidgels	49

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Epstein-Barr Virus ist an einer Vielzahl von humanen Malignomen ursächlich beteiligt. Das Virus exprimiert neben einer Reihe von microRNAs auch zwei nicht kodierende RNAs, die als EBER1 und EBER2 bezeichnet werden. Die EBER-RNAs spielen in der Tumorgenese eine wichtige Rolle, obgleich eine genaue Wirkungsweise bisher noch nicht vollständig geklärt wurde. Vorausgegangene Experimente konnten zeigen, dass die EBER-RNAs zu kleinen ca. 23nt langen Fragmenten prozessiert werden. Die Größe dieser Fragmente ließ eine gewisse Ähnlichkeit zu microRNAs vermuten. Ein Western Blot EBV infizierter, miR-200c exprimierender Zellen zeigte zudem eine reduzierte Proteinmenge des SEC23A Proteins im Vergleich zu nicht infizierten Zellen. Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob die EBER-RNAs analog zu microRNAs die Genexpression selbst oder im Sinne einer Ko-Repression bekannter Zielstrukturen anderer microRNAs regulieren.

Zunächst wurden die Fragmente von EBER1 und EBER2 in pSG5 Vektoren kloniert. In Luciferase Assays wurde anschließend die Regulation der SEC23A-3'UTR durch EBER1 bzw. EBER2 mit oder ohne Koexpression von miR-200c überprüft. Die Kombination aus den Einzelfragmenten EBER1+EBER2 und des Volllängen Konstrukts EBER1/2 wurden ebenfalls untersucht.

Es zeigte sich, dass die Kombination von EBER1+EBER2 bereits ohne Koexpression von miR-200c die relative Luciferase Aktivität reduziert. Eine Koexpression mit miR-200c zeigte keine additiven Effekte der EBER-RNAs auf die miR-200c induzierte Reduktion der Luciferase Aktivität.

Im Anschluss wurde mit Hilfe von Western Blots eine mögliche Veränderung der Proteinmenge in Anwesenheit der EBER-RNAs untersucht. Hier konnte keine signifikante Reduktion der SEC23A Proteinmenge gezeigt werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein EBER1/2 Fragment mit einer Mutation in der potentiellen „Seed“-Sequenz des EBER1 Fragment kloniert. Die Expression der mutierten EBER1-RNA in Northern Blot Analysen auf Höhe des EBER1₂₃ Fragments konnte bestätigt werden.

2 SUMMARY

The Epstein-Barr virus is involved in causing a variety of human malignant tumors. It encodes not only microRNAs but also two non-coding RNAs called EBER1 and EBER2. The EBER-RNAs are a contributing factor in tumor development although the exact process is yet to be identified.

Prior experiments showed the EBER-RNAs are processed to small 23nt long fragments. The size of these fragments led to speculate that they might function like a microRNA. A Western Blot with EBV infected, miR-200c expressing cells showed a reduced amount of the SEC23A protein compared to non-infected cells. These results raised the question whether the EBER-RNAs by analogy with microRNA regulate gene expression themselves or co-repress known target structures of other microRNA.

First, fragments of EBER1 and EBER2 were cloned in pSG5 expression vectors. Then the regulation of the SEC23A-3'UTR through EBER 1 and EBER2 was assayed in Luciferase Assays. Also the combination of the single fragments EBER1+EBER2 and the full length construct EBER1/2 were analyzed.

Results showed that the combination of EBER1+EBER2 already reduces the luciferase activity without co-expression of miR-200c. A co-expression in conjunction with miR-200c showed no additive effects of the EBER-RNA on the miR-200c induced reduction of the luciferase activity. Following this a possible change in protein amount in presence of EBER-RNA was tested by Western Blot analysis. A significant reduction of the SEC23A protein amount could not be shown. In the second part of the analysis a EBER1/2 fragment was cloned with a mutation in the potential „seed“-sequence. The expression of the mutated EBER1-RNA in Northern Blot Analysis probing for the 5'-derived EBER1₂₃ fragment of 23nt could be confirmed.

3 EINLEITUNG

3.1 Das Epstein-Barr Virus

Der englische Chirurg Dennis Burkitt beschrieb 1958 erstmalig ein bei Kindern endemisch in Gelbfieber- und Malariagebieten vorkommendes Lymphom. Angesichts der geographischen Prävalenz in Zentral- und Ostafrika, vermutete er ein infektiöses Agens als Auslöser (BURKITT, 1958). Acht Jahre später gelang der elektronenmikroskopische Nachweis des Epstein-Barr-Virus in *in vitro* kultivierten Burkitt-Lymphom Zellen (EPSTEIN et al., 1964). Henle et al. entdeckten später, dass das Virus im Stande ist, B-Lymphozyten *in vitro* zu transformieren (HENLE et al., 1967).

Das Epstein-Barr Virus (oder auch humanes Herpesvirus 4 =HHV-4 genannt) gehört zur Familie der γ -*Herpesviridae* und wird in die Gattung der *Lymphocryptoviridae* eingeordnet. Es ist humanpathogenes doppelsträngiges DNA-Virus mit einem Genom von ca. ein 172 kbp und kommt ausschließlich bei Menschen vor. Die DNA wird von einem Nukleokapsid in Form eines Ikosaeders umgeben, das etwa 100 nm im Durchmesser misst. Das Nukleokapsid wird aus 162 Kapsomeren aufgebaut und ist seinerseits von einer proteinreichen Matrix, dem Tegument, und einer mit Glykoproteinen bestückten Lipidmembran (=envelope) umschlossen (RICKINSON, 2001; THOMPSON, KURZROCK, 2004).

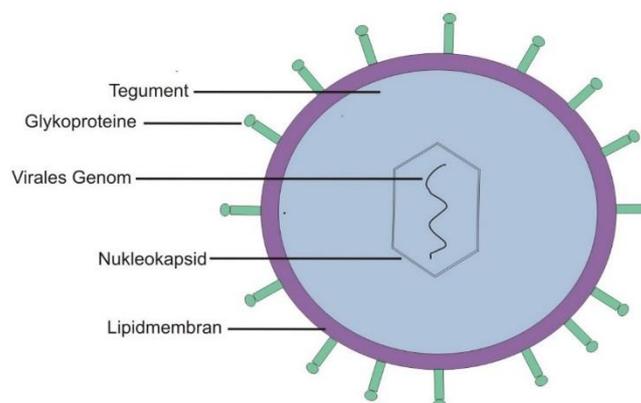


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaues eines Herpesvirion

3.1.1 Die Epstein-Barr Virus Infektion

Das Epstein-Barr Virus wird meistens durch Tröpfcheninfektionen übertragen. Im Laufe des Lebens infizieren sich ca. 95 % der Weltbevölkerung (THORLEY-LAWSON, 2005). Epstein-Barr Viren zeigen einen ausgeprägten Tropismus für CD 21+ Zellen. Dieser Rezeptor wird vor allem auf unreifen B-Zellen exprimiert. Aber auch in Epithelzellen des Pharynx kommt dieser in geringer Dichte vor (NIEDOBITEK et al., 1997; SIXBEY et al., 1984). Das Virus dockt über die viralen Glykoproteine gp220/350 an den CD21 Rezeptor an und wird über Endozytose aufgenommen. Zuerst infiziert das Virus die Epithelzellen, repliziert sich dort und infiziert anschließend die B-Gedächtniszellen, wo es ein Leben lang persistiert (BABCOCK et al., 1998; THORLEY-LAWSON, 2005). Während im Kindesalter die Primärinfektion meist asymptomatisch verläuft, manifestiert sich eine Infektion im Jugend- und Erwachsenenalter häufig als Pfeifferisches Drüsenfieber (infektiöse Mononukleose=IM). Die Patienten leiden an Fieber, cervical betonter Lymphadenopathie und einer Monozytenangina mit flächigen Belägen. Sporadisch treten auch Splenomegalie und Exantheme auf. Die Symptomatik ist auf eine überschießende T-Zell Antwort gegen infizierte B-Zellen zurückzuführen (HENLE et al., 1967).

Wie schon erwähnt persistieren die Epstein-Barr Viren in B-Gedächtniszellen. Diese EBV-Latenz wird u.a. durch das EBNA1 Protein (=EBV-determined nuclear antigen 1) ermöglicht, das für die Weitergabe des Virusgenoms an Tochterzellen während der Zellteilung sorgt. Infizierte naive B-Zellen werden durch zytotoxische T-Zellen der Immunabwehr erkannt und eliminiert. In B-Gedächtniszellen jedoch bleibt das EB-Virus aufgrund der eingeschränkten viralen Genexpression unerkannt. Deshalb versucht das Virus durch Expression latenter Virusgene, eine sonst Antigen induzierte Differenzierung der B-Zelle zu erreichen. Es erfolgen die Aktivierung der B-Zelle, Proliferation und somatische Hypermutation der Immunglobuline. Aus jedem dieser Differenzierungsschritte lassen sich EBV-assoziierte Tumore ableiten (Tabelle 1). Je nach Differenzierungsschritt werden *in vitro* 11 unterschiedliche Gene exprimiert. Diese kommen in den verschiedenen Phasen der Latenz in unterschiedlichen Kombinationen vor.

Tabelle 1: Expressionsprofile der EBV-Latenztypen und der assoziierten Erkrankung

Latenz-Typ	Expressionsprofil	Zuordnung
0	EBER1/2	B-Gedächtniszellen
I	EBER1/2 EBNA1	BL, NK/T-Zell Lymphom
II	EBER1/2 EBNA1 LMP (1, 2A, 2B)	NPC, HL, NK/T-Zell Lymphom
III	EBER1/2 EBNA (1,2,3A,3B,3C, LP) LMP (1,2A,2B)	IM, PTLD, HIV-assoziierte B-Zell Lymphome

EBER1/2 wird in allen vier Latenztypen exprimiert. EBNA 1 wird in den Latenztypen I-III exprimiert. Die latenten Membranproteine (LMP) werden sowohl in Latenztyp II als auch in Latenztyp III gebildet. Der dritte Typ exprimiert alle 11 latenten Gene des Epstein-Barr Virus (BABCOCK et al., 2000).

3.1.2 Epstein-Barr Virus assoziierte Tumorerkrankungen

Trotz der hohen Durchseuchungsrate der Bevölkerung und des onkogenen Potentials des Epstein-Barr Virus *in vitro* sind nur ca. 1 % aller Malignome EBV assoziiert. Ein erheblicher Risikofaktor stellt hierbei die Immunsuppression dar (DELECLUSE et al., 2007). Im Folgenden wird näher auf EBV-assoziierte Tumore eingegangen.

3.1.2.1 Burkitt Lymphom

Das sehr schnell wachsende Burkitt Lymphom (=BL) gehört zu den B-NHL und wird nach der WHO in einen endemischen, sporadischen und HIV assoziierten Typ eingeteilt (JAFFE, 2009). Der endemische Typ ist nahezu 100 % EBV-positiv und zeigt eine Genexpression des Latenztyps I (CARBONE et al., 2008). Welche Rolle das Virus in der Onkogenese spielt ist noch nicht vollständig geklärt. Durch EBV immortalisierte B-Zellen in Kombination mit einer Immunschwäche durch Malariainfektion scheinen eine Rolle zu spielen.

Der entscheidende Schritt stellt aber eine Translokation des c-myc Gens in den Immunglobulin Genlocus dar, was eine Überexpression dieses Onkogens zur Folge hat (YOUNG, RICKINSON, 2004).

In unseren Breitengraden stellt das HIV-/Immunsuppression-assoziierte Burkitt Lymphom den häufigsten Typ dar. Dieser zählt zu den AIDS-definierenden Erkrankungen.

3.1.2.2 Hodgkin-Lymphom

Das Hodgkin Lymphom (=HL) ist ein maligner Tumor des Lymphsystems und durch mehrkernige Sternberg Reed Zellen charakterisiert. Durch diese wird es von den Non Hodgkin Lymphomen (=NHL) abgegrenzt. Dieser Zelltyp findet sich auch in frühen Stadien der Mononukleose (YOUNG, RICKINSON, 2004). Eine durchgemachte infektiöse Mononukleose erhöht das Risiko an einem HL zu erkranken um das Vierfache (KIEFF, RICKINSON, 2007). Es gibt zwei Krankheitsgipfel. Einen um das dritte Lebensjahrzent und ein kleinerer um das siebte Lebensjahrzent. Hodgkin Lymphome sind zu ca. 40% mit EBV assoziiert (YOUNG, RICKINSON, 2004). Das Expressionsmuster lässt sich dem Latenztyp II zuordnen (GRASSER et al., 1994).

3.1.2.3 Lymphoproliferative Erkrankungen unter Immunsuppression

Eine verminderte Anzahl CD4+ Zellen bei AIDS (=Acquired immunodeficiency syndrome) oder aber die Unterdrückung der CD8+ T-Zell Antwort im Rahmen der Immunsuppression führt zu einer unkontrollierten Proliferation EBV infizierter B-Zellen. Folglich steigt das Risiko lymphoproliferativer Erkrankungen stark an. Die Post-transplant lymphoproliferative Disease (=PTLD) im Rahmen der Immunsuppression kann sich durch eine Primärinfektion mit EBV oder aber durch eine Reaktivierung von polyklonalen EBV-positiven B-Zellen entwickeln (HANTO et al., 1981). Nahezu alle Post-Transplantationslymphome der frühen Phase sind EBV assoziiert und exprimieren den Latenztyp III (CARBONE et al., 2008; KUTOK, WANG, 2006). AIDS Patienten dagegen entwickeln meist Burkitt-Lymphome mit dem Latenztyp I. Diese sind bis zu 40 % EBV assoziiert (CARBONE et al., 2008).

3.1.2.4 Nasopharynxkarzinom

Weltweit gesehen stellt das Nasopharynxkarzinom (=NPC) eine seltene Tumoridentität dar. Im Südostasiatischen Raum, vor allem in Südchina und Taiwan kommt es jedoch endemisch vor. Mit einer Inzidenz von 20-30/100.000 stellt es dort die häufigste Todesursache junger Männer dar (YU, YUAN, 2002). Neben der geographischen und genetischen Disposition steht das NPC auch in Zusammenhang mit Umweltfaktoren und dem Genuss von gesalzenem Fisch (enthält Nitrosamine) während der Kindheit (POIRIER et al., 1987; YU, YUAN, 2002). Undifferenzierte NPC sind zu 100% EBV assoziiert und exprimieren den Latenztyp II. LMP1 und LMP2A sind jedoch nicht immer nachweisbar (KUTOK, WANG, 2006; YOUNG, RICKINSON, 2004).

3.1.2.5 NK/T-Zell Lymphome

Das NK/T-Zell Lymphom (=NKTL) wird den NHLs zugeordnet. Ähnlich den NPC's sind diese nahezu alle EBV assoziiert. Die Erkrankung tritt hauptsächlich in Asien, Süd- und Mittelamerika auf (OSHIMI, 2007; RUDIGER et al., 2007). Am häufigsten manifestiert es sich im Nase-Rachen Raum.

Aber auch ein extranodaler Befall des Gastrointestinaltraktes, der Haut, Hoden, Leber oder Milz ist möglich. Die Patienten leiden unter großflächigen, z.T nekrotisierenden, destruierenden Läsionen, welche eine Gewebegewinnung erschweren.

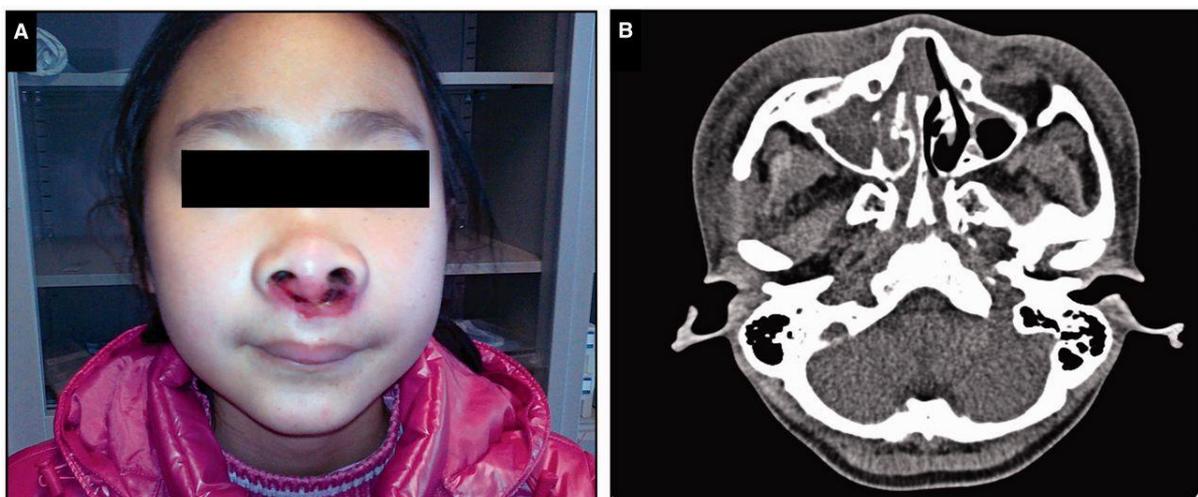


Abbildung 2: A) Nasales NK/T-Zell Lymphom mit Infiltration des Integuments. B) CT-Transversalschnitt: Infiltration in den rechten Sinus maxillaris/u. sphenoidalis, sowie den Siebbeinzellen (HUANG et al., 2016)

Die Nekrosen werden von den zytotoxischen Proteinen Granzym B und Perforin hervorgerufen (AOZASA et al., 2008). Von welcher Zelllinie das Lymphom abstammt ist noch nicht vollständig geklärt. Der Großteil scheint aber von NK-Zellen auszugehen (SUZUMIYA et al., 1994). Es ist ebenfalls nicht abschließend geklärt, wie es zu einer Infektion der Zellen durch EBV kommt. T-Zellen weisen zwar nur eine geringe Dichte an CD21 auf, lassen sich aber *in vitro* infizieren (KANEGANE et al., 1996; TSOUKAS, LAMBRIS, 1993). NK-Zellen lassen sich sogar trotz der Abwesenheit von CD21 *in vitro* infizieren. Der genaue Ablauf der Infektion ist weitgehend unbekannt (ISOBE et al., 2004). Es gibt Theorien, dass die Infektion nur rein zufällig während der Bekämpfung infizierter Zellen passiert (MEIJER et al., 1996). Die aus NK/T-Zellen gewonnenen EBV-Episome sind monoklonalen Ursprungs. Dies würde für eine Infektion in einem frühen Stadium der Erkrankung sprechen. Sowohl Latenztyp I als auch Latenztyp II sind in den Lymphomzellen zu finden (XU et al., 2001).

3.1.3 Die EBV kodierten RNAs EBER1 und EBER2

3.1.3.1 Struktur und Lokalisation der EBER1/2 RNAs

Das Epstein-Barr Virus codiert neben den viralen miRNAs noch für zwei weitere nicht codierende RNAs namens EBER1 und EBER2 (=EBV encoded RNAs). Diese sind 167 bzw. 172 +/- 1 Nukleotide lang. Beide Gene werden durch 161 Basenpaare voneinander auf einem gemeinsamen Vorläufertranskript getrennt (ROSA et al., 1981). Sie stellen den Großteil der viralen Transkripte in latent EBV infizierten Zellen dar und werden vom selben Primärtranskript durch die RNA-Polymerase III synthetisiert. Sowohl EBER1 als auch EBER2 enthalten hierfür eine intragenetische Transkriptions-Kontrollregion.

Obwohl sich die Primärsequenz zwischen EBER1 und EBER2 nur zu 54% deckt, sind die Sekundärstrukturen erstaunlich hoch konserviert. Die Sekundärstrukturen ähneln sich vor allem in mehreren kurzen *hairpins*, zahlreichen intramolekularen Basenpaaren, der am 5'-Ende befindlichen „pppAGGAC“-Sequenz sowie den vier Uridinresten am 3'-Ende (Abbildung 3). Die Polyadenylierung des 3'-Ende fehlt, da die EBER-RNAs nicht in Proteine translatiert werden. Ähnliche Sekundärstrukturen finden sich ebenfalls bei den von Adenoviren gebildeten RNAs VA1 und VA2 (ROSA et al., 1981).

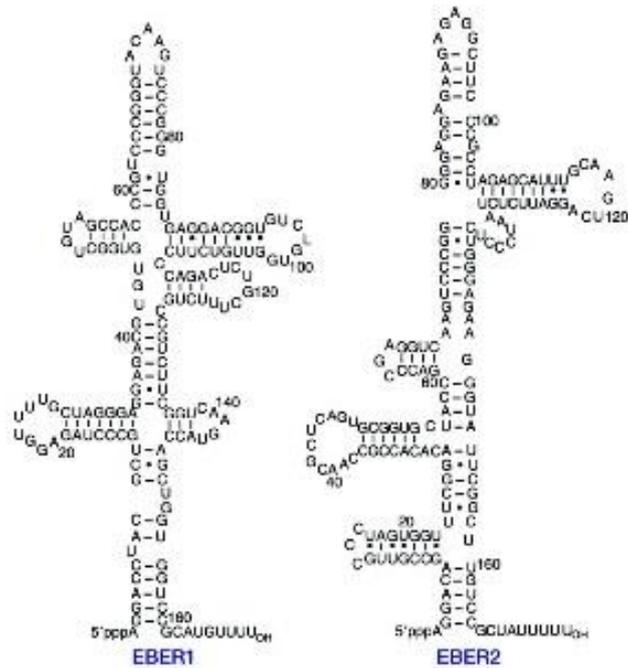


Abbildung 3: Sekundärstruktur von EBER1 und EBER2 (IWAKIRI, 2014)

Mittels in situ Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die EBER-RNAs vor allem im Nucleus zu finden sind. Im Cytoplasma konnte man sie ebenfalls in geringen Mengen nachweisen (CHANG et al., 1992; SCHWEMMLE et al., 1992). In EBV infizierten Zellen kommen die EBER Transkripte in hoher Zahl vor (10^7 Kopien). Damit werden sie von allen viralen RNAs am stärksten exprimiert und kommen in vergleichbaren Mengen wie DNA-Moleküle der gleichen Zelle vor (ARRAND, RYMO, 1982; LERNER et al., 1981).

EBER1 und EBER2 werden zu gleichen Mengen transkribiert. Die Menge an prozessiertem EBER1 ist jedoch in zehnfach höheren Konzentrationen zu finden. Wahrscheinlich ist dies auf die kürzere Halbwertszeit von EBER2 zurückzuführen (CLARKE et al., 1992).

3.1.3.2 Funktion der EBER1/2 RNAs

Trotz der Abweichungen in der Primärsequenz, weisen die hohen Strukturhomologien der EBER-RNAs auf eine wichtige Rolle im Lebenszyklus der Epstein-Barr Viren hin. Obwohl die EBER-RNAs nicht zwangsläufig benötigt werden, fördern diese eine Transformation von B-Zellen, sowie eine Infektion durch EBV. (SWAMINATHAN et al., 1991; YAJIMA et al., 2005). Für viele Viren spielen die Sekundärstrukturen der RNAs eine wichtige Rolle.

Vor allem in der Regulation der Genexpression (GIEDROC, CORNISH, 2009) und in den Wechselwirkungen zwischen Viren mit dem Immunsystem eines Wirtes (MALATHI et al., 2010).

Dennoch gibt es keine genauen Aussagen über die Wirkungsweise der EBER-RNAs während der EBV-Infektion und im Rahmen der Karzinogenese. Hinweise ergeben sich durch die Proteininteraktion von EBER1/2. Studien haben gezeigt, dass verschiedene Proteine die EBERs binden (Abbildung 4).

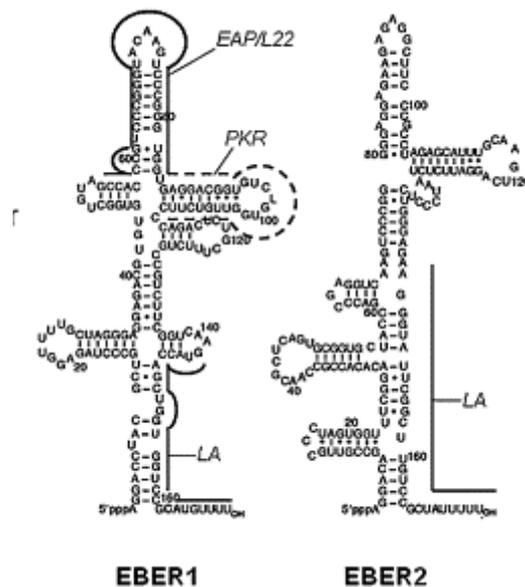


Abbildung 4: Sekundärstruktur von EBER1/2 und Orte der Protein Interaktion mit LA, PKR und L22 (TAKADA, 2012)

Das Lupus-Antigen (=LA) bindet an die Poly-U-Reste des 3'-Endes der RNA-Polymerase III Transkripte (TEPLOVA et al., 2006). Lerner et al entdeckten EBER1 und EBER2 zusammen mit LA in nukleären Ribonukleoproteinkomplexen (=RNP) (LERNER et al., 1981). Zunächst wurde vermutet, dass die EBERs ausschließlich im Nucleus vorkommen. Es zeigte sich aber, dass die EBER-RNAs in diesem Komplex mit LA in das Zytoplasma pendeln und mittels Exosomen den Extrazellulärbereich erreichen (BACHMANN et al., 1989; IWAKIRI, 2014). Ein weiteres Protein, das mit den EBERs interagiert, ist die RNA-dependent protein kinase (=PKR). Diese Serin-/Threoninkinase wird in Gegenwart von Interferonen durch Autophosphorylierung aktiviert und vermittelt antivirale Reaktionen (MEURS et al., 1990; SHARP et al., 1993). Sie phosphoryliert die α -Untereinheit von eIF2 (eukaryotic translation initiation factor 2), wodurch diese blockiert wird und die Inhibition der Proteinsynthese durch dsRNA verhindert.

EBER-RNAs können *in vitro* PKR binden und die Aktivierung durch Autophosphorylierung verhindern.

Das hat zur Folge, dass die α -Untereinheit des eIF2 nicht mehr phosphoryliert wird, womit eIF2 in der Rolle als TF keine inhibierende Funktion mehr ausübt (CLARKE et al., 1990; SHARP et al., 1993). *In vivo* konnte die Hemmung der Aktivierung von PKR durch EBER dagegen nicht nachgewiesen werden. Das ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Lokalisation von EBER-RNA und der PKA zurückzuführen (RUF et al., 2005).

Neben den genannten Proteinen interagiert noch das ribosomale Protein L22 mit den EBER-RNAs. EBER1 besitzt mehrere Bindungsdomänen für L22 (DOBBELSTEIN, SHENK, 1995). Es wird vermutet, dass fast alle EBER1 RNAs von mehreren L22-Molekülen gebunden werden und es die Translation von Proteinen beeinflussen könnte (FOK et al., 2006). Auch einen protektiven Effekt auf die mögliche Eigenschaft der Transformation von Zellen durch EBER1 wird diskutiert, da L22 und PKR um Bindungsstellen an EBER1 konkurrieren könnten (DOBBELSTEIN, SHENK, 1995; ELIA et al., 2004).

Ein weiteres Protein stellt das RIG-I dar. Es gehört zu der RLR (RIG-1 like *receptor*) Familie, erkennt virale dsRNA-Strukturen anhand der 5'-Triphosphate und wird bei Bindung von dsRNA aktiviert. Die Aktivierung initiiert Signalwege in deren Rahmen Typ-I Interferone und inflammatorische Zytokine gebildet werden. Auch NF- κ B (=nuclear factor) und IRF3 (=interferon regulatory factor 3) werden aktiviert (KANG et al., 2002; KAWAI et al., 2005). EBER1 wird aufgrund der doppelsträngigen Sekundärstruktur ebenfalls erkannt (SAMANTA et al., 2006) und induziert durch RIG-I vermittelten IRF-3 das antiinflammatorische Cytokin IL-10. IL-10 wurde als autokriner Wachstumsfaktor in Burkitt Lymphomen identifiziert (KITAGAWA et al., 2000; SAMANTA et al., 2008). Eine Transfektion von EBER1/2 in EBV-negative BL-Zelllinien führt zu verstärkter Zellproliferation und verminderter Apoptose (KOMANO et al., 1999). Auch das IL-9 kann durch die EBERs induziert werden.

IL-9 wirkt als Wachstumsfaktor auf die T-Zell Proliferation und könnte in der Entwicklung von T-Zell Lymphomen eine Rolle spielen (YANG et al., 2004). Ferner konnte festgestellt werden, dass EBER1/2 über den Insulin-like-growth-factor (=IGF1) die Proliferation von Zellen in Nasopharynxkarzinomen und Magenkarzinomen fördert (GREGOROVIC et al., 2011; IWAKIRI et al., 2003; IWAKIRI et al., 2005).

3.2 RNA-Interferenz

3.2.1 microRNAs

MicroRNAs sind kleine ~23 Nukleotide lange RNAs und spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung der Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene. Erstmals wurden microRNAs 1993 durch Lee et al. beschrieben, welche ein 22nt langes Transkript in *C.elegans* entdeckten, dass komplementäre Sequenzen zu der 3'-UTR (=untranslated region) einer mRNA besaß und diese degradierte (LEE et al., 1993). Später wurde erstmals der Begriff microRNA verwendet (LAU et al., 2001). In den folgenden Jahren wurden viele tausend miRNAs in unterschiedlichen Organismen identifiziert. Darunter auch Säugetiere, Fische, Insekten und Viren (BARTEL, 2004). Ca. 3 % aller humanen Gene kodieren für miRNAs, welche ungefähr 30 % des menschlichen Genoms, meist durch Hemmung der Translation regulieren (SEN et al., 2009). Diese Gene liegen sowohl in Introns als auch Exons kodierender bzw. nicht kodierender Gene (RODRIGUEZ et al., 2004). Das Epstein-Barr Virus selbst kodiert für 44 reife microRNAs.

Die Transkription der miRNA-Gene erfolgt im Nucleus durch die RNA-Polymerase II, seltener auch durch die RNA-Polymerase III. Daraus entsteht ein Primärtranskript, die sogenannte pri-miRNA, welche charakteristische Strukturen aufweist. Es enthält eine Haarnadelstruktur mit einem poly-A-Schwanz am 3'-Ende und einer m7G-Cap-Struktur am 5'-Ende (BORCHERT et al., 2006; LEE et al., 2003). Das Primärtranskript wird anschließend durch einen Komplex, bestehend aus der „Drosha“ RNase III und dem Protein DGCR8 (=Di-George Syndrom critical region gen 8) weiter prozessiert. Das 5'-Ende mit der Cap Struktur, sowie die poly-A-Strukturen am 3'-Ende werden abgespalten (CAI et al., 2004). Danach liegt ein 60 nt langer Strang vor, der mittels Exportin-5 und RAN-GTP den Nucleus verlässt und ins Cytoplasma gelangt (YI et al., 2003; ZENG, CULLEN, 2004). Hier findet ein weiterer Prozessierungsschritt durch die „Dicer“ RNase III und das Protein TRBP (=immunodeficiency virus transactivating response RNA binding protein) statt. Sie schneiden die terminale Haarnadelstruktur und es entsteht ein 22 nt langer miRNA-Doppelstrang (HUTVAGNER et al., 2001). Der Strang mit der schwächeren Basenpaarung am 5'-Ende wird als reife miRNA via Ago2 dem RISC-Komplex (=RNA induced silencing complex) angefügt (SCHWARZ et al., 2003).

Ist die Sequenz der miRNA mehr oder weniger komplementär zu Sequenzen an den 3'-UTR von mRNAs, werden diese abgebaut. Sollten in seltenen Fällen die Sequenzen absolut komplementär vorliegen, kommt es zur Degradierung der mRNA (BARTEL, 2004). Bei unvollständiger Komplementarität findet dagegen eine Repression der Translation statt (ENGELS, HUTVAGNER, 2006). Schlussendlich führt die Bindung der microRNA zu einem Abbau der Ziel mRNA (PFAFF, MEISTER, 2013).

Eine entscheidende Rolle bei der Bindung zwischen miRNA und mRNA spielt die sogenannte „Seed-Sequenz“, welche innerhalb der Nukleotide 2-7 des 5'-Endes einer miRNA lokalisiert ist (LEWIS et al., 2005). Der Vorgang der Repression ist aktuell noch nicht vollständig bekannt. Mögliche Deadenylierung der mRNA, proteolytische Spaltung oder das Schneiden des 5'-Cap Ende werden diskutiert. Es gibt Hypothesen, nach denen untranslatierte mRNAs P-Bodies (=processing bodies) speichern und diese dann zu einem späteren Zeitpunkt translatiert werden (BHATTACHARYYA et al., 2006; LIU et al., 2005).

3.2.2 microRNAs und Onkogenese

In einer Vielzahl von Tumoridentitäten werden microRNAs abnormal exprimiert. Unter anderem wurde sowohl eine Überexpression von microRNAs in Prostatakarzinomen (SZCZYRBA et al., 2011) als auch eine Repression in Mammakarzinomen nachgewiesen. (GREGORY et al., 2008a; GREGORY et al., 2008b). So scheint die abnormale Expression von microRNAs in malignen Tumoren eher die Regel als die Ausnahme zu sein (CROCE, 2009). Dies könnte damit zusammenhängen, dass microRNAs in fragilen Gegenden des Genoms lokalisiert sind, die anfällig für Deletionen oder Amplifikation während der Onkogenese sind (CALIN et al., 2004). So können microRNAs als Onkogen oder als Tumorsuppressor fungieren. Das Verhalten von malignen Zellen in Proliferation, Apoptose, Angiogenese und die Neigung zur Metastasierung werden durch microRNAs beeinflusst (JANSSON, LUND, 2012). Ferner wird zunehmend versucht, sich die Expressionsprofile als Biomarker in der klinischen Diagnostik zu Nutze zu machen, um Tumore zu klassifizieren, oder die Prognose abschätzen zu können (IORIO, CROCE, 2012; LU et al., 2005).

3.2.3 SEC23A-Proteine

SEC23A ist ein Protein, welches vom gleichnamigen Gen SEC23A codiert wird. Es ist eine wichtige Komponente des COP II vermittelten Transports von Proteinen zwischen dem endoplasmatischen Retikulum (=ER) und dem Golgi-Apparat (=GA) (BARLOWE et al., 1994). COP II Vesikel werden aus der GTPase Sar1a und einem heterodimeren Proteinkomplex, bestehend aus SEC23 und SEC24, aufgebaut. Die äußere Proteinhülle wird aus SEC13 und SEC31 gebildet (MATSUOKA et al., 1998). Es existieren zwei homologe Untereinheiten des SEC23 in Säugerzellen, genannt SEC23A und SEC23B. Sie stimmen zu 85% überein und sind das funktionelle Gegenstück zu sec23p, welches in Hefezellen entdeckt wurde (BEDNAREK et al., 1995; PACCAUD et al., 1996; SZCZYRBA et al., 2011).

SEC23A ist hauptsächlich für die Auswahl der Proteine, welche in die COP II Vesikeln inkorporieren, verantwortlich. Dies geschieht durch Bindung an die cytoplasmatische Domäne des ER, die für den anterograden Transport in Richtung Golgi-Apparat zuständig ist (FROMME et al., 2008).

Mutationen im SEC23A-Gen führen zum Boyadjiev-Jabs Syndrom (Kranio-lentikulösuturale Dysplasie =CLSD), das durch eine Störung des Kollagen Transports im COP II-Weg charakterisiert ist (FROMME et al., 2007; LANG et al., 2006). Ferner hat sich herausgestellt, dass MHC I Moleküle im Rezeptor vermittelten Transport zwischen GA und ER mit dem SEC23-SEC24 Komplex interagieren (CHO et al., 2011). Eine Herunterregulierung von SEC23A könnte zu einer Abnahme der MHC I Expression an der Zelloberfläche führen und damit zu einer Verringerung der Immunogenität führen. Es hat sich gezeigt, dass eine Abnahme der MHC I Expression in Prostatakarzinomen vorkommt. Dies erschwert die Erkennung von entarteter Zellen durch T-Zellen (BLADES et al., 1995).

3.2.4 microRNA-200c

Die miR-200c gehört zur microRNA-200 Familie, die in zwei Gruppen je nach ihrer Lokalisation im menschlichen Genom eingeteilt sind. Es existieren zwei Cluster auf Chromosom 1 und 12, die für insgesamt fünf microRNAs codieren. Die miR-200c ist auf Chromosom 12 lokalisiert und wird vor allem in epithelialen Geweben exprimiert (PARK et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von miR-200c die Epithelial-mesenchymale Transition (=EMT) induziert und damit eine wichtige Rolle in der Metastasierung von Tumoren spielt. Die Expression des Adhäsionsmolekül E-Cadherin korreliert über den Transkriptionsfaktor ZEB1 mit der Expression von miR-200c (CHRISTOFFERSEN et al., 2007; HURTEAU et al., 2007; Korpala et al., 2008). Eine gestörte Expression von miR-200c konnte in vielen Tumorentitäten nachgewiesen werden und geht in der Regel mit einer schlechteren Prognose einher (Spizzo et al., 2009). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die 3'-UTR von SEC23a ein Ziel von miR-200c ist. Eine Überexpression von miR-200c in Prostatakarzinomen führt zu einer Abnahme des SEC23A Gehalts (SZCZYRBA et al., 2011).

3.3 Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob die nicht-codierenden RNAs EBER1 und EBER2 des Epstein-Barr Virus die Proteinexpression des SEC23A Gens beeinflussen.

Es ist bekannt, dass die EBER-RNAs mit verschiedenen Proteinen interagieren können. Ebenfalls bekannt ist der Einfluss einer Überexpression von miR-200c auf die SEC23A Protein-Konzentrationen (SZCZYRBA et al., 2011) und dass EBER-RNAs keinen Einfluss auf die Expression von miR-200c ausüben (Linda Schlegel, Diplomarbeit, Universität des Saarlandes, „Analysis of non-coding RNAs in nasal NK/T-cell lymphomas“, 2014). Ein Western Blot EBV-infizierter miR-200c exprimierender Zellen zeigte eine reduzierte Proteinmenge des SEC23A Proteins. Es stellte sich daher die Frage, ob EBER-RNAs im Rahmen einer Koexpression mit miR-200c einen additiven Effekt auf die Abnahme der SEC23A Menge ausüben.

In Luciferase Assays sollte die Regulation der SEC23A-3'UTR durch EBER1 bzw. EBER2 mit oder ohne Koexpression von miR-200c überprüft werden. Auch die Kombination aus den Einzelfragmenten EBER1+EBER2, sowie der Vollängen Konstrukts EBER1/2 sollten untersucht werden. Mit Hilfe von Western Blots wurde zusätzlich geprüft, ob sich die Proteinmenge in Anwesenheit der EBER-RNAs verändert.

Frau Dipl. Biol. Linda Schlegel konnte in ihrer Diplomarbeit (s.o.) kurze, prozessierte Fragmente von ca. 23 Nukleotiden Länge der EBER1-RNA in EBV positiven Tumorklinen nachweisen. Die Größe dieser Fragmente ließ eine Ähnlichkeit zu miRNAs vermuten. Es existieren Studien, dass virale „small-non-coding RNAs“ die Degradierung von miRNAs und mRNAs der Wirtszelle durch Bindung der „Seed“-Sequenz lenken (CAZALLA, STEITZ, 2010; CAZALLA et al., 2010). Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die potentielle „Seed“ Sequenz der EBER1-RNA verändert und der Frage nachgegangen, ob sich die Expression kleiner Fragmente dieser Mutante im Northern Blot nachweisen lässt. Es sollte anschließend untersucht werden, ob diese Mutation Einfluss auf die Proteinexpression von SEC23A hat.

4 MATERIAL

4.1 Geräte

Belichter	810-UNV Image Eraser Light Box (Amersham Biosciences)
Blotkammer	2005 Transphor Electro Blotting Unit (LKB Bromma)
Elektrophorese-Netzgerät	Consort EV-231 (Consort bvba)
Heizschüttler	Thermomixer Compact (Eppendorf)
Hybridisierungssofen	UM 400B Hyb (Bachhofer)
Luminometer	Lumat LB 9501 (Berthold Technologies GmbH & Co)
PCR-Maschine	Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research)
Phosphoimager	Phosphoimager™-Typhoon (Molecular Dynamics, Amersham)
Photometer	NanoDrop™ 2000c (PEQLAB)
Semi-Dry Blotter	2117 Multiphor (LKB Bromma)
Ultraschallgerät	Sonifier 250 (Branson)
UV-Dokumentation	ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad)
Zentrifugen	Megafuge 1,0 R mit Kühlung (Heraeus) 202 MK mit Kühlung (Sigma)

4.2 Software

CorelDRAW X3™	Bildbearbeitung und Grafikerstellung
Quantity One	Quantifizierung von Western Blots
Microsoft Word 2016	Textverarbeitung
Microsoft Excel 2016	Tabellenkalkulation
	Auswertung: Western Blot und Luciferase Assay
NCBI (ncbi.nlm.nih.gov)	Nukleotid-Sequenzabgleiche (BLAST)
Quantity One (Biorad)	Bearbeitung von Northern Blots
SigmaPlot	Balkendiagramme und Statistik

4.3 Chemikalien, Membranen, Filter

Acrylamid	Roth
Agarose	BD
Amidoschwarz	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampicillin (Binotal™)	Bayer
Bisacrylamid	Serva
Bovines Serumalbumin (TAKAGI et al.)	New England Biolabs
Bromphenolblau	Serva
Blockreagenz	Boehringer
Denhardt's Solution (50x)	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
EDC-Hydrochlorid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Ethanol	Roth

Material

Ethidiumbromid	Sigma
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH
Gamma UT ³² P (3000 Ci/mol)	Hartmann Analytics
Glycin	Serva
Hybond™-N-Membran	Amersham Biosciences
Hyperfilm ECL™	Amersham Biosciences
Isopropanol	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Novagen
Kb plus Leiter	New England Biolabs
LB-Agar	Becton Dickinson
Magermilchpulver	Töpfer
Nanofectin™	PAA Laboratories GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
N,N,N',N'Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva
NucleoBond®	Machery-Nagel
NucleoSpin Extract™	Macherey-Nagel
Nukleotide (dNTPs)	PEQLAB
Nukleotide (NTPs)	Invitrogen
PeqGOLD TriFast™	PEQLAB
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories
PonceauS™	Sigma
PolyFect	QIAGEN
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
Röntgen-Fixier-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
SequaGel UreaGel System	National Diagnostics

Material

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva
Trypsin/EDTA	GE Healthcare
Tween®20	Serva
X-Gal	Sigma
Zellulosefilter Whatman™	Herolab

4.4 Puffer und Lösungen

Amidoschwarz-Färbelösung	Isopropanol	25,0% (v/v)
	Essigsäure	10,0% (v/v)
	Amidoschwarz	0,1% (w/v)
Blaumarker	Bromphenolblau	0,25%(w/v)
	Glycerol	50% (v/v)
	EDTA	50 mM
Blockingpuffer	Magermilchpulver in PBS	5% (w/v)
Crosslinkreagenz	Methylimidazol	245 µl
	EDC-Hydrochlorid	0,75 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 24 ml
50x Denhardt´s Lösung	Albumin fraction V	1%
	Ficoll 400	1%
	Polyvinylpyrrolidon K30	1%
dNTPs	dATP, dCTP	je 10 mM
	dGTP, dTTP	je 10 mM
ECL-Lösung A	Luminol in DMSO	250 mM
ECL-Lösung B	p-Coumarsäure in DMSO	90 mM

	Material	
ECL-Lösung C	Tris HCL pH 8,5	1 M
ECL-Lösungs-Mix	Lösung A	2,5 ml
	Lösung B	1,13 ml
	Lösung C	2 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 250 ml
Entfärbelösung	Isopropanol	10% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid in H ₂ O	10 mg/ml
Hybridisierungspuffer	20xSSC	7,5 ml
	1M Na ₂ HPO ₄	0,6 ml
	10%SDS	21 ml
	50x Denhardt´s Solution	0,6 ml
	Blockreagenz	wenige mg
MgCl ₂	(2M) MgCl ₂ x 6 H ₂ O	20,33 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	24,65 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml
	sterilfiltrieren	
5xMSE	1 M MOPS	200 ml
	0,3 M NAAc	16,7 ml
	0,5M EDTA	10 ml
	H ₂ O _{bidest}	Ad1000 ml
N2 – Puffer	Tris	100 mM
	Ethanol	15% (v/v)
	KCl	900 mM
	Triton X-100	0,15% (v/v)
	pH 6,3 mit H ₃ PO ₄	

Material

N3 – Puffer	Tris	100 mM
	Ethanol	15% (v/v)
	KCl	1,15 M
	pH 6,3 mit H ₃ PO ₄	
N5 – Puffer	Tris	100 mM
	Ethanol	15% (v/v)
	KCl	1 M
	pH 8,5 mit H ₃ PO ₄	
PBS	NaCl	140 mM
	KCl	25 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
	CaCl ₂	1 mM
	Na-K-Phosphat	10 mM
PBS für Zellkulturen	NaCl	8 g/l
	KCl	0,2 g/l
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,9 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
	pH 7,4	
10×PCR-Reaktionspuffer	KCl	500 mM
	Tris-HCl, pH 8,3	100 mM
	Gelatine	1 mg/ml
RNA Ladepuffer II	Foramid	750 µl
	5x MSE	150 µl
	Formaldehyd	240 µl
	50% Glycerol	200 µl
	Bromphenolblau	Eine Prise
	Xylen-Cyanol FF	Eine Prise
	H ₂ O _{bidest}	160 µl

	Material	
S1-Puffer	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
	pH 8.0	
S2-Puffer	NaOH	200 mM
	SDS	1% (w/v)
S3-Puffer	Kaliumacetat	2,8 M
	pH 5.1	
Sammelgelstock	Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
	SDS	0,4% (w/v)
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)
SDS-Laufpuffer	Tris	0,025 M
	SDS	0,1% (w/v)
	Glycin	0,2 M
SOB-Medium	Trypton	20,0 g
	Hefe-Extrakt	5,0 g
	NaCl	0,6 g
	KCl	0,5 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml
	Autoklavieren	
	Zugabe von 20 mM MgCl ₂	

Material

20xSSC	NaCl	3 M
	Tri-Natriumcitrat-2-hydrat	0,3 M
STET-Puffer	Tris (pH 8,0)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	50 mM
	Triton X-100	0,5% (v/v)
	Saccharose	8% (w/v)
	0,5mg/ml Lysozym vor	Gebrauch
Stripping Puffer	Tris/HCL pH8	0,05 M
	EDTA	0,2 M
	Natrium-Pyrophosphat	0,05% (v/v)
	Denhardt´s-Solution	0,1x
T4-Ligasepuffer (10x)	ATP	10 mM
	MgCl ₂	50 mM
	DTT	10 mM
	Tris/HCl (pH 7,5)	660 mM
TAE-Puffer 50x	Tris	2 M
	Natriumacetat	25 mM
	EDTA	0,5 M
	pH 7,8 mit Essigsäure	
TE-Puffer	Tris/HCL	10 mM
	EDTA	1 mM
	pH 7,6 mit Essigsäure	
Transferpuffer	Tris/HCl	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20% (v/v)
	SDS	0,05%(w/v)

Material

Transformationspuffer 1	RbCl	0,10 M
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,05 M
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,01 M
	CH ₃ COOH (pH 7)	0,03 M
	Glycerol	15% (v/v)
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml
	sterilfiltriert pH 5,8 mit 0,2 M CH ₃ COOH	
Transformationspuffer 2	MOPS (pH 6,8)	0,5 M
	RbCl	0,01 M
	CaCl ₂ x H ₂ O	0,075 M
	Glycerin	15% (v/v)
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml
	Sterilfiltriert	
Trenngelstock	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
	SDS	0,4% (w/v)
Waschpuffer 1 (Hochsalz)	SSC	5x
	SDS	1%
Waschpuffer 2 (Niedrigsalz)	SSC	1x
	SDS	1%

4.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs
DNase I (Amplification Grade)	Invitrogen
Klenow Fragment	Fermentas
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Sigma-Aldrich
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
T7-RNA-Polymerase	New England Biolabs
<i>Taq</i> - Polymerase	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	GE Healthcare

4.6 Größen- und Molekulargewichtsstandards

4.6.1 DNA-Größenstandard

Die Größenbestimmung der amplifizierten DNA Fragmente erfolgte mit Hilfe des 1 Kb Plus DNA-Ladder von Life Technologies, welches die Fragmentgrößen von 100bp bis 12.000bp umfasst.

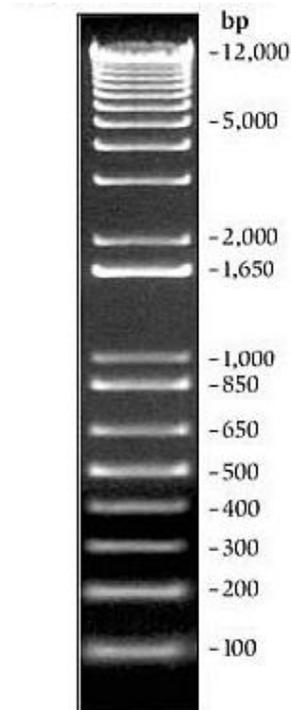


Abbildung 5: 1kb Plus Leiter (Quelle: thermofisher.com)

4.6.2 Protein-Molekulargewichtsmarker

Die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen in der SDS-PAGE erfolgte mit dem „Low molecular weight marker“ (LMW-Marker) von Sigma Aldrich. Folgende Proteine sind darin enthalten.

Tabelle 2: Proteine des „LMW-Molekularmarker“

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

4.7 Antikörper

4.7.1 Primärantikörper

In dieser Arbeit wurden zwei primäre Antikörper in folgenden Verdünnungen eingesetzt.

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller	Name/Klon	Organismus
α -GAPDH (monoklonal)	1:5000 in PBS	Cell Signaling	14C10	Kaninchen
α -SEC23A (monoklonal)	1:5 in PBS +Tween	Szczyrba,J (SZCZYRBA et al., 2011)	2H4	Ratte

4.7.2 Sekundärantikörper

Die Sekundärantikörper α -Ratte und α -Kaninchen waren an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Die Verdünnung betrug 1:5000.

4.8 Bakterienstämme

*E.coli*pMOSBlue: Die Vermehrung rekombinanter DNA geschah mit Hilfe dieses *E.coli*-Stamms der Firma Amersham. Er eignet sich auch für eine Blau-Weiß-Selektion im Rahmen der Erfolgskontrolle einer Ligation.

4.9 Adhärenzte Zelllinien

293T: 293T-Zellen sind eine Variante der HEK-293-Zelllinie, welche aus humanen embryonalen Nierenzellen besteht und durch das humane Adenovirus 5 transformiert wurde. Sie exprimieren das große T-Antigen des SV40, das die Expression von episomalen Plasmiden mit SV40 Replikationsursprung ermöglicht (SHEIN et al., 1962).

4.10 Nähr- und Kulturmedien

4.10.1 Nährmedium für Bakterien

Die Bakterien wurden in autoklaviertem 2,5% (w/v) LB-Medium (Luria Broth Base (GIBCO)) an gezüchtet und anschließend auf Agarplatten mit autoklaviertem 3,75% (w/v) Luria Agar (GIBCO) ausgestrichen. Die Petrischalen wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Zur Selektion von transformierten Bakterienstämmen wurden die Medien mit 0,1% (v/v) Ampicillin versetzt.

4.10.2 Kulturmedium für Säugerzellen

DMEM: 293T-Zellen wurden in „Dulbecco´s Modified Eagles Medium (DMEM) kultiviert. Dem Medium wurde 10% fötales Kälberserum (FKS) und ein 4er-Antibiotikum bestehend aus 40U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/µl Neomycinsulfat und 50 µg/µl Streptomycinsulfat hinzugefügt.

4.11 Vektoren

4.11.1 pGEM®-T

Der pGEM®-T Vektor der Firma Promega wurde als Zwischenvektor für die Klonierung verwendet. Durch Restriktion mit EcoRV liegt dieser als linearisierter pGEM®-5Zf(+) vor. Eine Rezirkularisierung wird durch Thymidine an beiden terminalen 3´-Enden verhindert. In der PCR fügt die *Taq*-Polymerase dem Insert Adenosin Überhänge an, welche komplementär zu Thymidin sind. Dies ermöglicht eine direkte Ligation der PCR-Produkte. Flankiert von den T7- und SP6-RNA-Polymerase-Promotoren liegt die Multiple-Cloning-Site innerhalb des β -Galaktosidase-Gens, welches durch den Einbau eines Inserts zerstört wird und eine Blau-Weiß-Selektion auf X-Gal-haltigem Agar erlaubt. Des Weiteren enthält der Vektor ein β -Lactamase-Gen, das die Selektion auf Ampicillin-haltigem Agar ermöglicht.

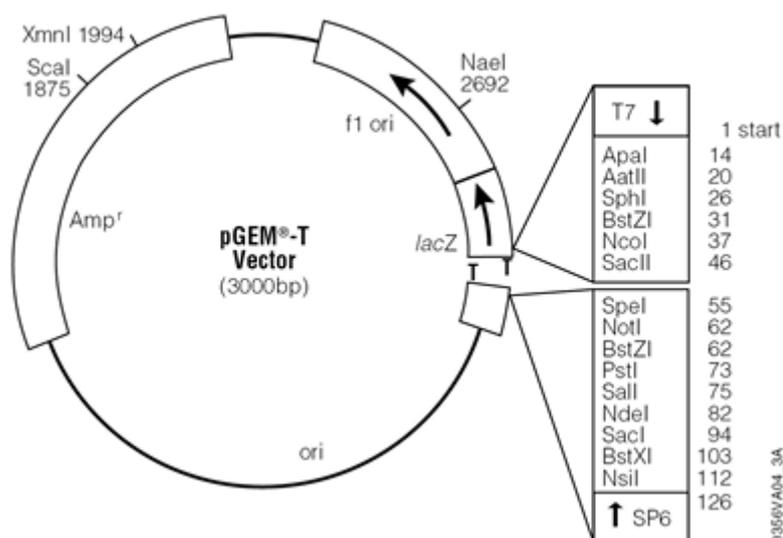


Abbildung 6: Vektorkarte von pGEM®-T (Quelle: promega.com)

4.11.2 pSG5

Dieser Vektor der Firma Agilent-Technologies wird sowohl zur *in vitro* als auch zur *in vivo* Expression eingesetzt. Hierfür trägt er ein β -Globin-Intron, ein SV-40 Promoter und einen SV40 Polyadenylierungssignal, sowie einen T7-Promoter, der für eine effiziente *in vitro* Transkription sorgt. Ein prokaryotischer Replikationsursprung (pUC ori) ermöglicht autonome Replikation in Bakterien, welche mit Hilfe des im Vektor enthaltenen Ampicillinresistenzgens selektiert werden können. Die „multiple-cloning-site“ beinhaltet Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *BamHI* und *BglII*, welche für die Klonierungen verwendet wurden.

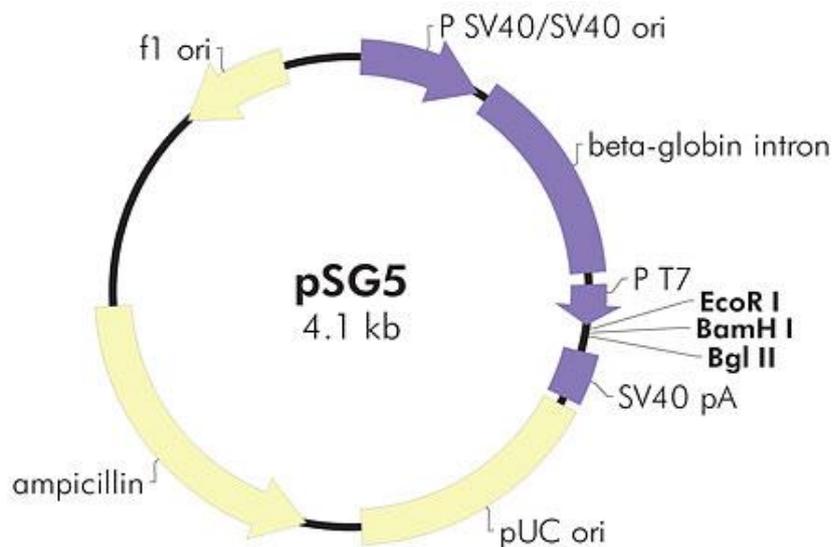


Abbildung 7: Vektorkarte von pSG 5 (Quelle: genomics.agilent.com)

4.11.3 Expressionsplasmide

Die Vektoren pSG5-EBER1/2, pSG5-EBER1 sowie pSG5-miR-200c waren im Labor vorhanden und wurden mir für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Der pSG5-EBER1/2-Vektor wurde von Frau Dipl. Biol. Linda Schlegel kloniert (Analysis of non-coding RNAs in nasal NK/T-cell Lymphomas, 2013). Das pSG5-EBER1 Konstrukt wurde von Frau Dr. Julia Alles kloniert (Alles und Grässer, unpublished). Der pSG5-miR-200c-Vektor wurde von Herrn Dr. Jaroslaw kloniert (SZCZYRBA et al., 2011).

4.12 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden alle von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen. Alle Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

4.12.1 Primer zum Klonieren der Fragmente EBER2 und EBER1 Mut 5-10

Tabelle 3: Übersicht der PCR-Primer

Primer	Sequenz
EcoRI-EBER1-FOR:	5' <u>GGAATTC</u> CCATAGGCAACCCCCGCCTAC 3'
EcoRI-Pm11-EBER2-FOR:	5' <u>GGAATTC</u> CCACGTGGATCCAACTTTAGTTTTAGGAT TTATGCATCC 3'
EBER2-BamHI-REV:	5' <u>CGGGATCC</u> GGGTGTCCAGGAAACCCCGTC 3'
EBER1-Mut 5-10-FOR:	5'CTGCAAACCTCAGGAG <u>AGCTC</u> CCTGCCCTAGAGGTT TTGC 3'
EBER1-Mut 5-10-REV-BglII:	5' <u>GGAAGATCT</u> TCCGCAAACCTCTAGGGCAGGAGCTC TCCTGAGGTTTTGCAG 3'

4.12.2 Sonden für Northern Blots

Tabelle 4: Übersicht der Northern Blot-Sonden

RNA-Sonde	ssDNA-Template
EBER 1 (D1H1)	5' AGGACCTACGCTGCCCTAGACCTGTCTC 3'
EBER 2	5' AGAAGGGTATTCGGCTTGCCGCTGTTTCCTGTCTC 3'
EBER1 Mut 5-10	5' AGGAGAGCTCCTGCCCTAGACCTGTCTC 3'
miR-200c	5' TAATACTGCCGGGTAATGATGGACCTGTCTC 3'

5 METHODEN

5.1 Bakterielle Zellkultur

5.1.1 Aufzucht und Lagerung von Bakterien

Die Plasmide wurden mittels Transformation in kompetente Bakterien eingebracht und mit Hilfe dieser amplifiziert. Durch Ausplattieren der Bakteriensuspension auf LB-Amp-Agarplatten und anschließender Inkubation über Nacht bei 37°C, wurden transformierte Bakterienkolonien selektiert. Diese wurden am folgenden Tag mit 2 ml LB-Medium (plus 0,1% (w/v) Ampicilin) beimpft und wiederum über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die LB-Amp-Agarplatten können für einige Wochen bei 4°C gelagert werden.

Zur weiteren Amplifikation kann 100 ml LB-Amp-Medium mit einer Bakterienkolonie beimpft und bei 37°C auf dem Schüttler über Nacht im Brutraum inkubiert werden. Dadurch lassen sich größere Mengen Plasmid-DNA gewinnen. Die selektierte Bakterienkolonie lässt sich dauerhaft konservieren. In diesem Falle wird 400 µl der Bakteriensuspension mit 20% (v/v) DMSO gemischt und bei -70°C gelagert. Mit Hilfe dieser DMSO-Stammlösung lässt sich alternativ 100 ml LB-Medium beimpfen.

5.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien (Rubidium-Methode)

(KUSHNER, 1978)

Gewöhnlich nehmen *E.coli* Bakterien keine Fremd-DNA auf. Sie haben Schutzmechanismen entwickelt um fremde DNA anhand ihres Methylierungsmusters zu erkennen und mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen abzubauen. Das kompetent machen der Bakterien erfolgt mit Hilfe von Chemikalien. In dieser Arbeit wurde dafür die Rubidium-Methode verwendet.

Zuerst wurden 30 ml SOB-Medium (pur) mit 300 µl MgCl₂-Lösung versetzt. Anschließend wurde 50 µl einer *E.coli*-pMOS-Suspension auf Eis aufgetaut, das SOB-Medium damit beimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am folgenden Tag wurden 200 ml SOB-Medium mit 8 ml der Vorkultur beimpft und bei 37°C geschüttelt. Dies geschah so lange bis die Suspension eine OD bei 550 nm von 0,3 hatte. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension 15 min auf Eis abgekühlt, in 4 Falcons aufgeteilt und 10 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Den Bakterienpellets fügte man je 16 ml Transformationspuffer 1 hinzu und inkubierte sie erneut 15 min auf Eis. Nach 10 min Zentrifugation bei 3000 rpm und 4°C wurden die Bakterienpellets mit je 4 ml Transformationspuffer 2 resuspendiert. Je 150 µl der Bakteriensuspension wurden in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Daraufhin erfolgte die Lagerung der nun kompetenten pMOS Bakterien bei -70°C.

5.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

(LEDERBERG, COHEN, 1974)

Mit Hilfe der Transformation lässt sich fremde DNA in kompetente Bakterien überführen. Dies geschieht auf 2 unterschiedliche Weisen. Durch Hitzeschock oder Elektroporation. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Hitzeschock-Transformation angewendet. Dazu wurden 5 µl eines Ligationsansatzes zu 50 µl pMOS-Bakterien gegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Phase lagert sich das Plasmid an die Zellwand an. Im Anschluss erfolgte der Hitzeschock für 90 sec. in einem Wasserbad bei 42°C. Aufgrund kurzzeitiger Permeabilitätsstörungen der Zellwand gelangt die DNA in das Cytosol. Nach Kühlung auf Eis wurde 100 µl LB-Medium ohne Zusatz von Ampicilin hinzupipettiert und 60 min bei 37°C im Brutraum inkubiert. Danach wurde die gesamte Vorkultur auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Nicht transformierte Bakterien verfügen über kein Resistenzgen (Beta-Lactamase). Somit werden diese durch das dem Agar zugesetzte Ampicillin ausselektiert.

5.1.4 Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion dient der Erfolgskontrolle einer Ligation. Hierfür wurden auf die LB-Agarplatte 35 µl x-Gal, sowie 20 µl IPTG ausplattiert. Im Anschluss folgte das Ausplattieren von 55 µl pMOS Bakterien inklusive des Ligationsansatzes. Das Enzym β -Galaktosidase wandelt nach Induktion durch IPTG das künstliche Substrat X-Gal in einen blauen Farbstoff und Galaktose um. Damit sich die Ligation kontrollieren lässt bestehen 2 Voraussetzungen. Der Bakterienstamm muss beta-Galaktosidase-defizient sein (z.B pMOS) und das Plasmid muss eine „multiple cloning site“ innerhalb des Galaktosidase-kodierenden-Gens tragen.

Ist die Ligation erfolgreich wird das lacZ-Gen durch das Insert unterbrochen und ist nicht mehr funktionsfähig. Das IPTG kann nun nicht mehr zu einem blauen Farbstoff + Galactose hydrolysiert werden. Weiße Kolonien enthalten somit das gewünschte Insert, blaue Kolonien dagegen nicht.

5.2 Eukaryotische Zellkultur

5.2.1 Monolayer Zellkultur

In dieser Arbeit wurde mit 293T-Zellenlinien gearbeitet. Diese wachsen als Monolayer adhärent auf einer Unterlage. Als Medium wurde DMEM verwendet, dem 10% FKS und 0,1% 4er-Antibiotikum zugesetzt wurden. Die Zellen wuchsen in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank. Alle 3-4 Tage, in der Regel montags und donnerstags wurden die Zellen unter der Sterilbank in neue Flaschen passagiert. Nach Abnahme des Mediums wurde der Zellrasen mit 1 ml Trypsin/EDTA gespült und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA ca. 5 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In dieser Zeit spaltet die Protease Trypsin Zelloberflächenproteine, was die Ablösung des Zellrasens ermöglicht. Anschließend wurden 9 ml DMEM-Medium hinzugegeben, um die Trypsin-Reaktion zu beenden. Aus dieser Zellsuspension wurde 1 ml in eine neue Flasche überführt und diese auf 20 ml mit DMEM-Medium aufgefüllt. Die Verdünnung erfolgte je nach Zelldichte. Meistens jedoch wurden die Zellen mindestens 1:10 gesplittet.

5.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mit PolyFect

Die Transfektionen erfolgten mit Hilfe des PolyFect Transfection Reagent (Qiagen). Dieses Reagenz ist als Dendrimer aufgebaut. Von einem zentralen Kern gehen Verzweigungen ab, welche an ihrem Ende positiv geladene Aminogruppen aufweisen. Es bindet die kompakte DNA und ermöglicht die Aufnahme in eukaryotische Zellen mittels unspezifischer Endozytose. Ein Abbau durch Endonukleasen wird durch Abpufferung des lysosomalen pH-Wertes verhindert. Für die Transfektion wurden 293T Zellen in 6-Well Mikrotiterplatten ausgesät und nach 24h mit der jeweiligen DNA transfiziert. Nach weiteren 48h konnten diese geerntet werden und Proteinextrakte hergestellt werden. Es wurden je 2 µl DNA mit 20 µl Polyfect pro Well verwendet.

5.3 DNA-Techniken

5.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

5.3.1.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA (Boiling Präparation)

(modifiziert nach (BIRNBOIM, DOLY, 1979))

Dieses Verfahren wurde für die Isolation und Analyse kleiner DNA-Mengen verwendet. Dafür wurden 2 ml LB-Ampicilin-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Überführung in 1,5 ml Reaktionsgefäße, zehnminütiger Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C fand die Resuspendierung der Bakterienpellets mit STET-Puffer, sowie 1 µl Lysozym (0,5 mg/ml) statt. Anschließend inkubierten die Proben 5 min auf Eis, bevor sie 45 sec. bei 98,5°C im Wasserbad kochten. Danach folgte eine weitere Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm. Das aus Zelltrümmern bestehende Proteinpellet wurde mit einem Zahnstocher entfernt. Unter Hinzugabe von 200 µl Isopropanol und Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm für 30 min wurde die DNA gefällt. Nach Verwerfung des Überstands trocknete das DNA-Pellet an der Luft bevor es in 20 µl S1-Puffer (mit RNase) bei 37°C 10 min inkubiert wurde um die RNA abzubauen. Anschließend folgte die Lösung der DNA bei 55°C für 5 Minuten.

5.3.1.2 Präparative DNA-Isolierung (NucleoBond™-Präparation)

Größere Mengen an Plasmid DNA lassen sich mit Hilfe von Anionen-Austauschersäulen der Firma Marchery-Nagel (NucleoBond™) aufreinigen. Diese ermöglichen 100 ml einer Übernachtsbakterienkultur aufzureinigen.

Die Suspension wurde hierzu in zwei 50 ml Reaktionsgefäße überführt und 15 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in einem neuen Gefäß mit 4 ml S1 Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml S2 Puffer wurden die Zellen lysiert. Das darin enthaltene SDS denaturiert die Plasmid-DNA, chromosomale DNA und Proteine. Nach 4 min erfolgte die Zugabe von S3 Puffer und 5-minütige Inkubation auf Eis. Dies ermöglicht den Plasmiden die Rehybridisierung. Die größere chromosomale DNA jedoch bleibt einzelsträngig und die Proteine denaturiert. Anschließend wurden die Falcons abermals zentrifugiert (25 min, 6000 rpm, 4°C).

Während dieses Schrittes wird eine NucleoBond™-AX 100-Säule mit 2,5 ml N2 Puffer equilibriert. Der Überstand mit dem darin gelösten Plasmid wird nun auf die Säule gegeben. Die negativ geladene DNA bindet an die Säule. Die ebenfalls negativ geladene RNA wurde mit 2x5 ml N3 Puffer von der Säule entfernt und die DNA mit 5 ml N5 Puffer eluiert. Durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und 30 min Zentrifugation bei 6000 rpm und 4 °C erfolgte die Fällung der DNA. Das Pellet wurde mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen (30 min, 6000 rpm) und über Kopf getrocknet. Das Pellet wurde je nach Größe in 50-100 µl TE Puffer aufgenommen. Zum Schluss erfolgte die Lösung der Plasmid DNA im Wasserbad (50°C) für 1 Stunde und die photometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration mittels Nanotrop®.

5.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

(MANIATIS et al., 1989)

Konzentration, sowie Reinheitsgrad der DNA wurden am NanoDrop™2000c® (PEQLAB) bestimmt. Nukleinsäuren absorbieren Licht der Wellenlänge von 260 nm. Deshalb lässt sich durch die Absorption der DNA Gehalt einer Lösung ableiten. Bei einer optischen Dichte (OD) von 1,0 bei 260 nm wird von einer Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA ausgegangen. Im Unterschied dazu absorbieren Proteine Licht der Wellenlänge 280 nm. Daher kann der Quotient $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ als Maß für die Reinheit einer Probe verwendet werden. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Bei einem Wert $<1,8$ liegt höchstwahrscheinlich eine Verunreinigung mit Proteinen vor.

5.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

(MULLIS et al., 1986)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht eine in Länge und Sequenz definierte Nukleinsäure (DNA) *in vitro* zu vervielfältigen. Mit Hilfe einer *Taq*-Polymerase lassen sich ausgehend von einem 3'-OH-Ende eines Templates komplementäre DNA-Stränge bilden. Die PCR arbeitet in Zyklen. Denaturierung→Annealing→Elongation. Zuerst wird das doppelsträngige Template bei 95°C denaturiert. Die Wasserstoffbrücken werden aufgebrochen und das Template liegt nun als Einzelstrang vor. Nach der Abkühlung auf 50-65°C können sich synthetisch hergestellte Oligonukleotide, sogenannte Primer welche der DNA Sequenz komplementär sind, anlagern.

Die Temperatur hierfür ist abhängig von dem Guanin/Cytosin Gehalt und der Länge der Primer. Die Temperatur für die folgende Elongation beträgt 72°C. Der Startpunkt der Polymerase ist das 3'-OH-Ende der Primer. Sie baut nun die dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) an. In den darauffolgenden Zyklen können diese nun ebenfalls als Template dienen. Es entsteht eine nahezu exponentielle Vermehrung der DNA-Sequenz.

Tabelle 5: Schema eines 50 µl PCR-Ansatzes

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
dNTP's	2 µl	Je 100 mM
10xReaktionspuffer	5 µl	1x
5'-Primer	1 µl	25 µM
3'-Primer	1 µl	25 µM
EBER1/2 Template	0,5 µl	0,5 µg
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl	5 U
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl	

In dieser Arbeit wurde die *Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Sie besitzt die Eigenschaft auch bei hohen Temperaturen noch zu arbeiten. Bei der Auswahl der Primer muss auf Sequenzhomologien geachtet werden, damit eine Primerdimerbildung verhindert wird.

Tabelle 6: PCR-Programm

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	
Prädenaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	50 sec	}x 39
Annealing	60°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Es wurde der Peltier Thermal Cycler 200® verwendet. Das Programm richtet sich nach den Primern. Als Polymerase wurde ausschließlich die *Taq*-Polymerase verwendet. Die finale Elongationszeit richtet sich nach der Länge des Template und dient dazu, einzelsträngig verbliebende DNA-Stränge zu Doppelsträngen zu polymerisieren.

Zu jedem Ansatz wurde eine Wasserprobe ohne Template mitgeführt um Verunreinigungen während des Pipettierens auszuschließen. Zum Erfolgsnachweis wurden im Anschluss je 25 µl des Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Bei der Colony-PCR diente eine Bakterienkolonie als Template. Die hierfür verwendeten pSG5-Sequenzierungsprimer wurden von der Firma Eurofins MWG bezogen.

Tabelle 7: Schema eines Colony-PCR Mastermix Ansatzes für 12 Bakterienkolonien inklusive +/- Kontrolle

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
dNTP's	32 µl	Je 100 mM
10xReaktionspuffer	80 µl	1x
Sequenzierungsprimer pSG FOR	16 µl	25 µM
Sequenzierungsprimer pSG REV	16 µl	25 µM
Bakterienkolonie	1-5 µl	100-500 ng
Taq-Polymerase	7 µl	5 U
H ₂ O _{bidest}	ad 800 µl	

Tabelle 8: Geräteeinstellung für eine Colony-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Prädenaturierung	94°C	2 min
Denaturierung	94°C	50 sec
Annealing	58°C	1 min
Elongation	72°C	1,45 min
Finale Elongation	72°C	5 min

} x39

5.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

(MANIATIS et al.; 1989)

Das Verfahren der Gelelektrophorese ermöglicht das Auftrennen der DNA-Fragmente nach ihrer Sequenzlänge. DNA besitzt eine negative Nettoladung und wandert in einem elektrischen Feld in Richtung der positiv geladenen Anode. Das Agarosegel fungiert hierbei als Molekularsieb. Kleine Fragmente wandern schneller durch die Poren als große Fragmente. Die Agarosekonzentration bestimmt die Größe der Poren. Folglich wird die Konzentration der Agarose den zu auftrennenden Fragmenten angepasst.

Tabelle 9: Agarosekonzentration für die entsprechenden Fragmentgrößen

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

Je nach gewünschter Konzentration wird die entsprechende Menge Agarose zu 1xTAE-Puffer hinzugegeben und in der Mikrowelle erhitzt. Die Lösung kühlt auf dem Magnetrührer auf ca. 60°C ab und wird dann mit 23 µl Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml in H₂O) zu versetzt.

Im Anschluss wurde die Lösung auf eine 24,5 x 24,5 cm große Glasplatte gegossen, welche zuvor mit einem 1 cm hohen Messingrahmen und 1% Agarose abgedichtet wurde. Das Gel wurde nach dem Auspolymerisieren in Frischhaltefolie verpackt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Auftrennung wurde das Gel je nach gewünschter Taschenzahl zurechtgeschnitten und in die mit 1xTAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Zu der 50 µl DNA-Probe wurden 10 µl Blaumarker zugegeben um das Verfolgen der Lauffront im Gel zu ermöglichen.

Für die Größenbestimmung wurde 10 µl eines Molekulargewichtsstandard (1Kb Plus DNA-Ladder) aufgetragen, sowie eine H₂O Kontrolle. Je 25 µl einer Probe wurden nun in die Geltaschen gefüllt und mit Hilfe eines elektrischen Feldes (150V/400mA für 1h) aufgetrennt. Das zugesetzte Ethidiumbromid interkaliert mit der Doppelstrang-DNA und ermöglicht nach Abschluss der Elektrophorese die Dokumentation der Banden unter 254 nm UV-Licht. Kurzwelliges Licht schädigt jedoch die DNA. Deshalb wurden DNA-Fragmente für Klonierungen bei 365 nm sichtbar gemacht und das gewünschte Fragment mit einem Skalpell herausgeschnitten um es für die Reisolierung vorzubereiten.

5.3.5 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

(MANIATIS et al., 1989)

Bakterien schützen sich mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen gegen eindringende Fremd-DNA. Anhand ihres Methylierungsmusters erkennen die Enzyme Fremd-DNA und schneiden diese im Bereich von palindromischen DNA-Sequenzen, welche zwischen vier und acht Basenpaaren groß sind. Bei der Klonierung werden in der Regel Restriktionsenzyme der Klasse II verwendet. Geschnitten wird auf zwei verschiedene Weisen. Ein Schnitt glatt durch den Doppelstrang erzeugt ein stumpfes Ende (sog. „blunt end“), ein versetzter Schnitt jedoch erzeugt ein überhängendes Ende (sog. „sticky end“) an dem 5' oder 3'-Ende. Sticky ends werden bevorzugt, da diese einfacher hybridisieren und ein gerichteter Einbau leichter ist.

Restriktionsenzyme werden in Units(U) angegeben. Eine Unit kann unter optimalen Bedingungen 1 µg DNA pro Stunde vollständig verdauen. Die Anzahl der eingesetzten Units variierten je nach Enzym zwischen 2-10 U/µg DNA. Der Verdau wurde nach den Vorgaben des Herstellers (New England Biolabs) durchgeführt.

Tabelle 10: Standard-Restriktionsansatz

Restriktionsenzym(e)	Je 1 U
DNA	1-2 µg
10x Restriktionspuffer	2 µl
geg. 10x BSA	2 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

Je nach Restriktionsenzym wurde BSA dazugegeben. Meist wurde ein Doppelverdau mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen, die gleichzeitig schneiden, durchgeführt. Hierbei wurde ein Restriktionspuffer verwendet, in welchem beide Enzyme optimale Aktivität aufweisen. Nach zusammen-pipettieren aller Komponenten wurde der Ansatz gut gemischt, abzentrifugiert und für mindestens 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Kontrolle des Verdauens mit einer Agarose-Gelelektrophorese. Verwendete Restriktionsendonukleasen: EcoRI, BamHI, Bgl II, SacI.

5.3.6 Dephosphorylierung von Vektoren

(BOLIVAR et al., 1977; CHACONAS, VAN DE SANDE, 1980)

Gleichzeitig zur enzymatischen Restriktion des Inserts wurde die Vektor-DNA linearisiert. Dies geschah mit denselben Restriktionsendonukleasen. Aufgrund der Möglichkeit einer Rezirkularisierung, bzw. einer Konkatemerisierung des Vektors wurde die am 5' Ende befindliche reaktive Phosphatgruppe mit Hilfe von 1 µl alkalischer Phosphatase (CIP, calf intestinal phosphatase) abgespalten. Die alkalische Phosphatase wurde mit 2 µl AP-Puffer dem Restriktionsansatz hinzugefügt. Es folgte die Inkubation über mindestens 3 Stunden, mit anschließender Gelelektrophorese und Reisolierung (NucleoSpin®).

5.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

(DUGAICZYK et al., 1975; SGARAMELLA et al., 1970)

Eine Ligation beschreibt das Verknüpfen zweier DNA-Fragmenten mit Hilfe einer Ligase. Dieses Enzym wurde aus *E.coli* Bakterien isoliert, welche mit dem Bakteriophagen T4 infiziert waren. Unter Verbrauch von ATP katalysiert die T4-Ligase *in vitro* die Bildung von Phosphodiesterasebindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe mit einer freien 3'-OH-Gruppe in Doppelstrang-DNA. Beide Enden müssen hierfür kompatibel sein und die eingesetzten Konzentrationen an Vektor- und Insert-DNA des Reaktionsansatzes sollten äquimolar sein. Zwei Ligationsansätze sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 11: Pipettierschema zweier Ligationsansätze

Komponente	Ansatz 6:2	Ansatz 5:3
Vektor dephosphoryliert	2 µl	3 µl
Insert	6 µl	5 µl
10x T4-Ligasepuffer	1 µl	1 µl
T4-Ligase	1 µl	1 µl

Der Ansatz wurde mindestens 3h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden 5 µl des Ligationsansatzes in pMOS-Bakterien transformiert. Die andere Hälfte wurde für Wiederholungsversuche bei 4°C gelagert. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Dephosphorylierung des Vektors wurde ein Ansatz ohne Insert mitgeführt.

5.3.8 Ligation von PCR-Fragmenten in pGEM®-T Vektor

Der pGEM®-T-Vektor dient zur direkten Ligation von PCR-Produkten ohne vorherigen Restriktionsverdau. Während der PCR polymerisiert die *Taq*-Polymerase Adenin-Überhänge am 3'-Ende. Der pGEM®-T-Vektor besitzt am 3' Thymin-Überhänge, welche eine Ligation ohne vorherige Modifikation ermöglicht. Diese Zwischenklonierung erhöht die Erfolgsrate in der darauffolgenden direkten Ligation in den Zielvektor.

Tabelle 12: Standard-Ligationsansatzes für pGEM®-T Ligation

Komponente	Volumen
Insert	3 µl unverdaut
pGEM®-T-Vektor	1 µl
2x Ligasepuffer	5 µl
T4-Ligase (1U/µl)	1 µl

Jeder Ansatz inkubierte bei 4°C über Nacht und wurde anschließend zu 5 µl in pMOS-Bakterien transformiert und auf LB-Agarplatten ausplattiert. Der Ligationserfolg wurde mit der Blau-Weiß-Selektion kontrolliert.

5.4 RNA-Techniken

5.4.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe des Reagenz peqGOLD TriFast™ der Firma PEQLAB durchgeführt. Die in diesem Reagenz enthaltenden Komponenten Guanidinisothiocyanat und Phenol erlauben die gleichzeitige Extraktion von Proteinen, DNA und RNA. Durch Zugabe von Chloroform mit anschließender Zentrifugation bei 6000 rpm für 30 min trennte sich das Homogenat in drei Phasen auf. Die obere farblose wässrige Phase enthielt die RNA, die mittlere Interphase die DNA und die untere rot gefärbte Phase die Proteine. Die RNA in der oberen Phase wurde mit Isopropanol gefällt und in DEPC-H₂O gelöst. Die Extraktion wurde mit Ausnahme zweier Abwandlungen nach dem Standardprotokoll von peqGOLD TriFast™ durchgeführt. Um den Verlust kleiner RNAs zu vermeiden, wurde auf das Waschen der gefällten RNA mit 75% Ethanol verzichtet. Außerdem wurde die Zentrifugation in der Phasentrennung mit 6000 rpm für 30 min anstelle von 12000 rpm für 5 min durchgeführt, da die Megazentrifuge nur auf 6000 rpm beschleunigen konnte. Anschließend wurden die Proben auf 1 µg/µl verdünnt.

5.4.2 Northern Blot

Mit dem Northern Blot lassen sich RNA-Moleküle nachweisen. Hierzu wird die RNA auf einem Gel nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss auf eine Membran transferiert. Nach chemischer Fixation wird diese mit Hilfe einer radioaktiv markierten spezifischen Sonde, welche komplementär zur RNA-Sequenz ist, detektiert.

5.4.2.1 Herstellung des Urea-Polyarylamidgels

Die Auftrennung der RNA wurde in einem 12%igem Polyacrylamidgels von SequaGel® (National Diagnostics) durchgeführt. In diesem Kit ist u.a. Harnstoff enthalten, welcher die Sekundärstruktur der RNA auflöst. Weitere Komponenten sind Puffer, Verdünner und Konzentrat, die in Tabelle 13 aufgelistet sind.

Tabelle 13: Bestandteile eines 12% Urea-Polyarylamidgels

Komponente	Volumen
SequaGel-Puffer	5 ml
SequaGel-Verdünnung	21 ml
SequaGel-Konzentrat	24 ml
APS	400 µl
TEMED	20 µl

Zwei saubere 24 x 26,5 cm große Platten wurden mit Sigmacote® eingerieben und durch 1,5 mm dicke Spacer voneinander getrennt. Abgedichtet wurde mit 2%iger Agarose. Alle Komponenten wurden in oben gezeigter Reihenfolge zusammen pipettiert, zwischen die Glasplatten gegossen und mit einem 16er Kamm versetzt.

Die RNA Proben wurden zu je 20 µl mit 7 µl Ladepuffer versetzt und in die mit 1xTBE-Puffer gespülten Taschen pipettiert. Die Elektrophorese lief für ca. 3 Stunden bei 20 Watt, bis die Lauffront ca. $\frac{3}{4}$ des Gels passiert hatte. Danach wurde das Gel in einer Ethiumbromidlösung (100 ml 1xTBE versetzt mit 10 µl Ethidiumbromid) für 10 min inkubiert und das Ergebnis unter einem UV-Tisch dokumentiert (Wellenlänge: 254 nm).

5.4.2.2 RNA-Transfer und chemisches Crosslinken

Die RNA wurde mit einer Semi-Dry-Blotting-Kammer (StarLab) auf eine Nylonmembran (HybondTM-N+, Amersham) übertragen. Fünf Lagen Whatman-Papier wurden mit H₂O_{bidest} angefeuchtet und möglichst blasenfrei übereinander auf die Anode gelegt. Darüber wurde die Nylonmembran und das Gel aufgelegt und wiederum mit fünf Lagen Whatman-Papier abgedeckt. Alles war ausreichend mit H₂O_{bidest} bedeckt. Der Deckel mit der Kathode wurde mittels 3 Schrauben verschlossen und 30-45 Minuten bei 15 Volt geblotet. Danach erfolgte das chemische Crosslinken um auch kleine RNA-Moleküle auf der Membran zu fixieren. Hierfür wurde die Membran mit 3 in Crosslinkreagenz getränkten Whatmann-Papieren luftdicht in Frischhaltefolie verpackt und 2 Stunden bei 55°C im Ofen inkubiert. Das Reagenz bestand aus 245 µl Methylimidazol und 750 mg EDC-Hydrochlorid, welches auf 24 ml mit H₂O_{bidest} aufgefüllt wurde.

5.4.2.3 Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde

RNA-Sequenzen lassen sich mit Hilfe einer radioaktiv markierten DNA-Sonde detektieren. Diese wurde mit Hilfe des mirVanaTM miRNA Probe Construction-Kit von Ambion hergestellt. Dafür wird ein ssDNA-Oligonukleotid benötigt, welches zu einem Teil aus der nachzuweisenden Sequenz besteht und an dessen 3' Ende eine 8 Basen lange Sequenz (5'-CCTGTCT-3') hängt. Diese sogenannte T7-Ankersequenz ist komplementär zu dem 3' Ende eines T7-Promoter-Primer. Dadurch kann dieser an die RNA-Sequenz binden und das Klenow-Enzym ein dsDNA-Template synthetisieren, das für die Sonde von Nöten ist.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Komponenten zur Herstellung eines dsTemplate für RNA-Sonde

Komponente	Volumen
T7-Promoter Primer (100µM)	2 µl
ssDNA Oligonukleotid-Template (100 µM)	2 µl
H ₂ O (aus Kit)	6 µl

Alle Komponenten des Hybridisierungsansatzes wurden zusammen zunächst 5 min bei 70°C inkubiert und weitere 5 min bei Raumtemperatur. In dieser Zeit fand die Hybridisierung von Primer und Template statt. Anschließend wurden dem Ansatz weitere Reagenzien (aufgelistet in Tabelle 15) beigelegt.

Tabelle 15: Weitere Reagenzien für die Herstellung eines dsDNA zur Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde

Komponenten	Volumen
10x Klenow-Puffer	20 µl
10x dNTP-Mix	2 µl
Nuklease-freies H ₂ O	4 µl
Exo-Klenow	2 µl

Nach der Zugabe der übrigen Reagenzien inkubierte der Ansatz weitere 30 min bei 37°C, damit das Klenow-Enzym die dsDNA synthetisiert. Dieses Template wurde nun für die Transkription der Sonde verwendet.

Tabelle 16: Bestandteile der *in vitro* Transkription einer Northern Blot Sonde

Komponente	Volumen
dsDNA-Template	1 µl
10x RNA-Polymerase-Puffer	2 µl
Nuklease freies H ₂ O	7 µl
10 mM ATP/CTP/GTP	Je 1µl
Komponenten im Isotopenlabor	Volumen
T7-Polymerase	2 µl
UTP P ³² (radioaktiv)	5 µl

Zuerst wurden dsDNA-Template, RNA-Polymerase, NTPs (ohne U) und Nuklease freies H₂O zusammen pipettiert. Alle anderen Komponenten wurden im Isotopen Labor hinzugefügt, gemischt, abgefugt und 10 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Das mit P³² markierte UTP wurde nun mittels der T7-RNA-Polymerase in den RNA Strang eingebaut. Das verbliebene dsDNA-Template wurde unter Zugabe von 1 µl DNase bei 37°C für 10 min abgebaut.

5.4.2.4 Nachweis spezifischer RNA

Zunächst erfolgte die Prähybridisierung. Die Nylonmembran wurde in einen mit 15 ml Hybridisierungspuffer gefüllten Glaszylinder überführt und 30 min bei 50°C im Ofen inkubiert. Der Ofen verfügt über ein Drehrad, welches den Glaszylinder in ständiger Rotation hält. Anschließend konnte die radioaktiv markierte Sonde hinzu pipettiert werden. Es folgte die Inkubation über Nacht bei 50°C. Am folgenden Tag wurde der Hybridisierungspuffer verworfen und die Nylonmembran mit 2 bei 50°C vorgewärmten Waschpuffern für je 2x 15 min gewaschen. Zunächst erfolgten zwei Waschgänge mit 30 ml Hochsalzpuffer (5xSSC, 1%SDS) und anschließend zwei Waschgänge mit Niedrigsalzpuffer (1xSSC, 1%SDS).

Danach konnte die Membran eingepackt in Frischhaltefolie auf dem Phosphorscreen über Nacht exponiert werden und am darauffolgenden Tag konnten die Banden mit Hilfe des Phosphoimager™-Typhoon (Molecular Dynamics) detektiert werden.

5.5 Proteintechniken

5.5.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

(MANIATIS et al., 1989)

Zuerst wurde das Kulturmedium abpipettiert und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in 1500 µl PBS abgewaschen. Es folgte eine zehnmütige Zentrifugation bei 1200 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen. Je nach Größe des Pellets wurde 2x Sample Puffer hinzugegeben. In der Regel wurden 40-60 µl pro Well (6 Well-Platte) verwendet. Anschließend mussten die Proben unverzüglich auf Eis gelagert werden bevor sie einer Ultraschallbehandlung unterzogen wurden. Danach konnte die Denaturierung der Proteine bei 99°C im Wasserbad für 10 min erfolgen. Es folgte eine weitere Zentrifugation (10min, 14.000 rpm, 4 °C) und der Überstand wurde als Proteinextrakt in neue Reaktionsgefäße überführt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Photometer verwendet. Je 5 µl einer Probe wurden mit 0,1 M NaOH 1:100 gemischt und die Optische Dichte bei 280 nm gemessen.

Bis zur Weiterverwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert. Durch die folgende Formel ließ sich die Proteinkonzentration bestimmen.

$$\frac{6,4}{OD280} = x\mu\text{l Extrakt} = 30\mu\text{g Protein}$$

5.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Proteine können anhand ihres Molekulargewichtes, ihrer Nettoladung oder ihrer dreidimensionalen Strukturen aufgetrennt werden. Während der Herstellung der Proteinextrakte wurden diese denaturiert, um ihre Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Das SDS in Puffer und Gelmatrix überdeckt die Eigenladung der Proteine indem je ein SDS-Molekül zwei Aminosäurereste bindet und für gleiche Masse/Ladungsverhältnissen sorgt. Die Proteine werden proportional zu ihrer Masse negativ geladen und das ermöglicht so die Auftrennung anhand ihres Molekulargewichtes. Die Proteine wandern somit in der Gelelektrophorese in Richtung der Anode.

Die Gelmatrix besteht aus polymerisiertem Acrylamid, welches mit N, N'-Methyl-Bisacrylamid quervernetzt ist. Durch Amoniumpersulfat (APS) wird diese Reaktion gestartet und durch N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert. Die Porengröße der Gelmatrix wird bestimmt von dem Mengenverhältnis zwischen Acrylamid und Bisacrylamid. In dieser Arbeit wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese verwendet, um eine hohe Bandenschärfe zu erreichen. Bei der diskontinuierlichen Elektrophorese laufen die Banden zunächst durch ein grobporiges Sammelgel (Uppergel), welches die Proteine zu einer einheitlichen Lauffront konzentriert und anschließend durch ein feinporiges Trenngel (Bottomgel), welches die Proteine nach ihrer Masse auftrennt.

5.5.3 Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels

Für das Gießen des Polyacrylamidgels wurden zwei Glasplatten (14,5 x 16,5 cm) mit Ethanol gereinigt, mit Spacern versehen und mit Klammern übereinander fixiert. Das Abdichten erfolgte mit 2%-igem Agarosegels. Zunächst wurde das Trenngel in den Spalt gegossen und mit H_2O_{bidest} bedeckt. Nach Auspolymerisation des Trenngels und Entfernung des H_2O_{bidest} , konnte das Sammelgel gegossen werden. Die Geltaschen wurden mit Hilfe eines Teflonkamms erzeugt.

Im Anschluss wurden die Spacer entfernt und das Gel senkrecht in der Elektrophoresekammer fixiert. Die Kammern wurden mit SDS-Puffer gefüllt und etwaige Blasen mit einer Spritze entfernt. Zunächst wurden 5 μ l Bromphenolblau und 2xSSB in die Geltaschen pipettiert. Danach konnten die Proteinproben aufgetragen werden. Die Auftrennung im Sammelgel erfolgte bei 25 mA, die im Trenngel bei 35 mA bis die Lauffront kurz vor dem Ende stand.

Tabelle 17: Komponenten und Volumina zur Herstellung eines 10%-iges Polyacrylamidgels

Komponenten	Trenngel (10%)	Sammelgel
Upper-/Bottomgelstock	je 4,0 ml	je 1,25 ml
Acrylamid (30%)	5,3 ml	750 μ l
Bisacrylamid (2%)	2,12 ml	300 μ l
H_2O_{bidest}	4,58 ml	2,7 ml
APS (10%)	140 μ l	50 μ l
TEMED	14 μ l	10 μ l

5.5.4 Western Blot (Immunoblot)

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nun auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und aufgrund von hydrophobischen und polaren Wechselwirkungen auf dieser fixiert. Immunreaktivität und funktionelle Aktivität bleiben weitgehend erhalten und die Proteine können im weiteren Verlauf mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

5.5.4.1 Proteintransfer

Ein Westernblot wird folgendermaßen aufgebaut. In einer Vorrichtung aus PVC-Gittern wird zunächst ein Schwamm, bedeckt mit zwei Whatmanpapieren ausgelegt. Auf das Papier wird nun das Polyacrylamidgel gelegt, gefolgt von einer Protran™ Nitrocellulose-Membran. Diese sollte möglichst blasenfrei dem Gel aufliegen. Zum Schluss werden weitere 2 Whatmanpapiere und ein zweiter Schwamm aufgeschichtet. Das Zusammensetzen findet in einer mit Transferpuffer gefüllten Wanne statt.

Beide Gitter werden nun zusammengesteckt und in die mit Transferpuffer gefüllte Blottingkammer (LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit®) gestellt. Dabei sollte das Gel in Richtung der Anode zeigen. Der Transfer der Proteine auf die Membran fand bei 400 mA für ca. 90 min statt. Im Anschluss wurden die Proteinbanden unspezifisch mit PonceauS™ gefärbt, die Markerbanden abgeschnitten und diese 15 min in einer Amidoschwarzlösung irreversibel gefärbt. Die Membran mit den Proteinbanden wurde ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer 5%-igen PBS-Milch inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

5.5.4.2 Immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen

Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe von Antikörpern. Die primären Antikörper wurden mit 5%-iger PBS-Milch verdünnt und die Membran luftblasenfrei mit je 5 ml dieser Verdünnung in Klarsichthüllen eingeschweißt und über Nacht bei 4°C auf einem Taumler inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran 3 x 10 Minuten mit PBS gewaschen um ungebundene Antikörper zu entfernen. Um gebundenen Primärantikörper zu detektieren wurde die Membran anschließend mit in PBS-Milch verdünnten Sekundärantikörpern (1:5000 in 5%-iger PBS-Milch) für eine Stunde bei 4°C inkubiert.

Die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper richten sich gegen die konstante Region des Primärantikörpers. Anschließend wurde abermals 3 x 10 min mit PBS gewaschen. Der Nachweis der sekundären Antikörper erfolgte mit Hilfe einer enzymatischen ECL-Lichtreaktion (Enhanced Chemoluminescence). Hierbei wurden 10 ml ECL 5 µl H₂O₂ hinzugefügt. Das H₂O₂ wurde in einer Peroxidase katalysierten Reaktion, bei gleichzeitiger Oxidation von Luminol, reduziert. Dies führte zu einer Lichtemission bei einer Wellenlänge von $\lambda=428\text{nm}$.

Die Dokumentation erfolgte durch Auflegen eines blauempfindlichen ECL-Röntgenfilms, welcher anschließend entwickelt, fixiert und getrocknet wurde.

5.6 Dual-Luciferase® Reporter Assay

Das in dieser Arbeit verwendete Dual-Luciferase® Assay von Promega ermöglicht die Genexpression und die daran gekoppelten zellulären Aktivitäten in einer Zelle zu untersuchen. Hierfür werden wurden zwei Luciferasen verwendet. Die Firefly-Luciferase besitzt die Eigenschaft das Substrat Luciferin in Anwesenheit von O_2 , ATP, Mg^{2+} in Licht, AMP und CO_2 umzuwandeln. Mit der Renilla-Luciferase wird parallel die Transfektionseffizienz ermittelt. Beide Luciferasen werden in einem einzigen Assay verwendet. Hierfür wird die Lichtemission der Firefly-Luciferase nach Zugabe eines spezifischen Substrates gemessen. Im Anschluss wird diese Reaktion gestoppt und gleichzeitig das Substrat für die Renilla-Luciferase eingesetzt und erneut die Aktivität bestimmt.

Zunächst wurden 293T Zellen in 24-Well Platten ausgesät und am darauffolgenden Tag mit Hilfe von Polyfect die jeweiligen Plasmide nach Herstellerangaben transfiziert. Nach 48 Stunden erfolgte die Zellyse, ebenfalls nach Herstellerangaben (Promega). Nun wurden zunächst je 50 μ l LAR II als Substrat in die Lumat-Röhrchen vorgelegt. Daraufhin wurde in jedes Röhrchen 10 μ l Zellysat hinzu pipettiert und die Lichtemission für 10 sec. im Luminometer® (Berthold Technologies) gemessen. Anschließend wurde 50 μ l Stop&Glo-Reagenz hinzu pipettiert, welches die Reaktion stoppte und zugleich das Substrat für die Renilla-Luciferase enthielt. Die Renilla-Lumineszens wurde ebenfalls für 10 sec gemessen. In der Auswertung wurde die Aktivität der Firefly-Luciferase mit den Werten der Renilla-Luciferase normalisiert und die zu vergleichenden Werte zueinander in Bezug gesetzt.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (Sigma Plot 10.0), wobei p-Werte $<0,05$ als statistisch signifikant erachtet wurden.

6 ERGEBNISSE

6.1 Fragestellung

Das Epstein Barr Virus kodiert für zwei nicht-polyadenylierte RNAs, die als EBER1 und EBER2 bezeichnet werden. In latent infizierten Zellen sind diese nicht kodierenden EBER-RNAs in hoher Kopienzahl nachweisbar. Es wurden verschiedene Funktionen publiziert, jedoch ist die genaue Wirkungsweise dieser viralen RNAs nicht vollständig geklärt (KITAGAWA et al., 2000; TAKADA, NANBO, 2001).

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob die einzelnen EBER-RNAs im Rahmen einer Koexpression mit der microRNA miR-200c einen additiven Effekt auf die Abnahme der SEC23A Menge ausüben. Zunächst wurde in Luciferase Assays die Regulation der SEC23A-3'UTR durch EBER1 bzw. EBER2 mit oder ohne Koexpression von miR-200c überprüft. Auch die Kombination aus den Einzelfragmenten EBER1+EBER2, sowie des Volllängen Konstrukts EBER1/2 sollten untersucht werden. Mit Hilfe von Western Blots wurde zusätzlich geprüft, ob sich die Proteinmenge in Anwesenheit der EBER-RNAs verändert.

In diesen Experimenten interessierte uns vor allem das EBER1 Fragment, da dieses auch als 23 nt langes prozessiertes Fragment in Northern Blots nachweisbar war (Linda Schlegel, Diplomarbeit, Universität des Saarlandes, „Analysis of non-coding RNAs in nasal NK/T-cell lymphomas“, 2014). Die Größe dieses Fragments ließ eine Ähnlichkeit zu miRNAs vermuten. Es existieren Studien, dass virale „small-non-coding RNAs“ die Degradierung von miRNAs und mRNAs der Wirtszelle durch Bindung der „Seed“-Sequenz lenken (CAZALLA et al., 2010).

Es stellte sich daher ebenfalls die Frage, ob EBER-RNAs im Sinne von miRNAs, Genexpression regulieren, entweder selbst oder im Sinne einer Ko-Repression von bekannten Zielstrukturen viraler oder zellulärer miRNAs.

Aus diesem Grund wurde zusätzlich ein mutiertes EBER1/2 Fragment kloniert. Die potentielle Bindestelle („Seed-Sequenz“) wurde ausgetauscht und die Expression der mutierten RNA sollte in einer Northern Blot Analyse bestätigt werden.

6.2 Klonierung des EBER2 Fragments

6.2.1 Amplifizierung des EBER2 aus dem EBER1/2 Fragment

Das EBER1/2 Fragment diente in der Polymerase Kettenreaktion als Template. Die Primer wurden so gewählt, dass die Transkripte später mit EcoRI und BamHI geschnitten werden konnten. Alle Sequenzen der verwendeten Primer sind unter 4.12.1 zu finden. In der schematischen Abbildungen 8 ist die Lage der Primer zu den jeweiligen Fragmenten dargestellt.



Abbildung 8: Schematische Darstellung des EBER1/2 Fragments in Bezug auf die Bindungsstellen von Forward und Reverse Primern für das EBER2 Fragment

Die Sequenz des EBER 1/2 Fragments wird in Abbildung 9 dargestellt.

```
5'-TTAGGGTTAGCATAGGCAACCCCGCCTACACACCAACTATAGCAAACCCCGCCCCGTCACGGTGACGTA
GTCTGTCTTGAGGAGATGTAGACTTGTAGACACTGCAAACCTCAGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGC
TAGGGAGGAGACGTGTGTGGCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGGGTGGTGAGGACGGTGTCT
GTGGTTGTCTTCCCAGACTCTGCTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTACCAGCTGGTGGTCCGCATGTTTTGAT
CCAAACTTTAGTTTTAGGATTTATGCATCCATTATCCCGCAGTTCCACCTAAACGGGGCTTAACGTTGCATCC
CAGAAGATGCACACGTAACCCCGCCTACAACCGTGACGTGGCTGTTTACCAGCATGTATAGAGTTACGGTTC
ACTACATCAAACAGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCAGTGCGGTGCTACC
GACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGCCTAGAGCATTGCAAGTCAGGATTCTC
TAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTTGTCCGCTGTTTTTTGTGGCTAGTTTTGCACCCACAACATGTA
AGGGCCCGCTACCCCTACAACACAAAACAACTATCTCCACTAACCATCCTTTTGCCAATCAATTCTGTGACC
GGGTTTCTGGACACCCAG-3'
```

Abbildung 9: Sequenz von EBER1/2

Das EBER2 Fragment ist grau hinterlegt. Es wird durch 161 bp von EBER1 getrennt. Die Bindungssequenzen der Primer für das Fragment EBER2 sind unterstrichen.

Eine Wasserkontrolle ohne Template wurde stets mitgeführt. Das amplifizierte Fragment besaß eine Größe von 455 Basenpaaren.

Es wurden je 25 µl der PCR-Probe auf 2%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Reisolierung der DNA.

6.2.2 Ligation in pGEM-T und pSG5 Vektoren

Für eine erfolgreiche Klonierung musste das EBER Fragment zunächst in einen Zwischenvektor ligiert werden. Für diesen Zweck wurde der pGEM-T Vektor gewählt. Dieser lag als linearisierter Vektor mit Thymidin-Überhängen vor. Da die *Taq*-Polymerase Adenosin Überhänge anpolymerisiert, war kein zusätzlicher Verdau des Inserts nötig, weil beide Überhänge miteinander kompatibel waren. Der Ligationsansatz konnte anschließend in pMOS Bakterien transformiert und mit Hilfe der „Blau-Weiß-Methode“ selektiert werden. Das Wachsen weißer Bakterienkolonien signalisierte ein eingebautes Insert. In der Regel wurden 6 der vielversprechendsten Klone pro Platte gepickt und mit diesen 2 ml LB-Ampicilin-Medium beimpft. Am nächsten Tag wurde die Plasmidpräparation durchgeführt. Durch einen Verdau mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI wurden die Fragmente wieder aus dem Vektoren geschnitten. Für die Ligation in den pSG5 Vektor, musste dieser zunächst mit den gleichen Enzymen verdaut werden. Um eine Rezirkularisierung des Vektors zu verhindern, wurde dieser mit 1 µl antarktischer Phosphatase dephosphoryliert. Es wurden Ansätze mit einem Verhältnis Vektor/Insert von 6:2 bzw. 5:3 durchgeführt.

6.2.3 Transformation in pMOS Bakterien

Die Ligationsansätze wurden in pMOS transformiert. Die 6:2 Ligationsansätze zeigten stets eine höhere Ausbeute an Bakterienkolonien. Aus den angeimpften LB-Ampicillin Medien wurden am darauffolgenden Tag die Plasmide zur Analyse isoliert. Leider erwies es sich als äußerst schwierig die Ligationsansätze erfolgreich zu transformieren. Keines der isolierten Plasmide trug ein Insert. Aufgrund der hohen Zahl an Transformationsversuchen wurde aus Zeitgründen anstelle der analytischen Plasmidisolierung auf das Verfahren der „Colony-PCR“ zurückgegriffen.

Die beiden Sequenzierungsprimer waren spezifisch für die „multiple cloning site“ des pSG5 Vektors, welche ca. 200 bp lang ist. Dies bedeutete, dass die Banden der positiven Klone für EBER2 ca. 660 bp groß sein mussten. Es wurden eine negative Kontrolle ohne pSG5 Vektor sowie eine positive Kontrolle mit pSG5 Vektor mitgeführt. In Abbildung 10 ist exemplarisch die „Colony-PCR“ zur Identifikation EBER2-positiver pSG5-Klone dargestellt.

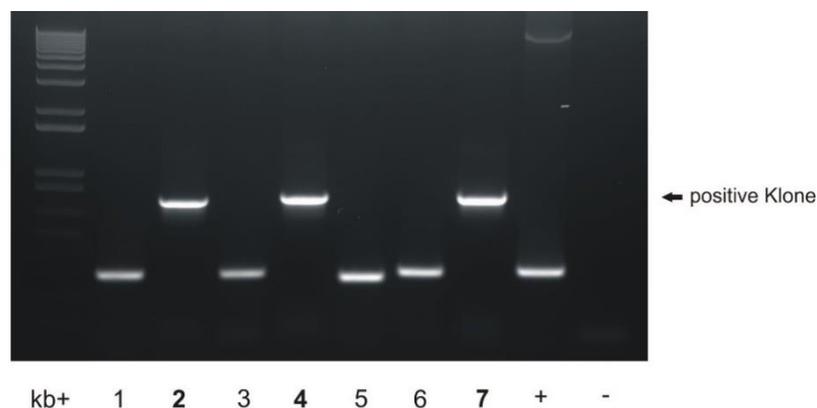


Abbildung 10: „Colony-PCR“ von EBER2

Die Klone 2, 4 und 7 tragen das Insert. Die positive Kontrolle (+) zeigt die Bandenhöhe der MCS ohne Insert.

Die Plasmid-DNA der Klone wurde mit Hilfe von Anionen-Austauschsäulen der Firma Marchery-Nagel (NucleoBond™) aufgereinigt. Von jedem Klon wurde ein DMSO-Stock angelegt, der bei -80°C gelagert wird. Die Bestimmung der Konzentration sowie des Reinheitsgrads erfolgte am NanoDrop™2000c (PEQLAB).

Die Probe wurde auf 1 µg/µl verdünnt und zum Ausschluss unerwünschter Basenmutationen zur Sequenzierung an die Firma „seq-it“ verschickt.

Ergebnis: Identities: 99%, Gaps: 0%. Es fanden sich keine Basenmutation im Bereich des EBER2 Fragment.

Die Sequenz des verwendeten pSG5-EBER2 Klon 2 ist im Anhang zu finden. Ein Probeverlauf, des zu den weiteren Analysen verwendete pSG5-EBER2 Klon 2 ist in Abbildung 11 dargestellt.



Abbildung 11: Kontrollverdau des pSG5-EBER2 Klon Nr.2

Das EBER2 Fragment (455kb) ist in der dritten Spur („EcoRI/BamHI“) zu sehen. In der zweiten Spur („Ø“) wurde ein unverdauter Klon aufgetragen.

6.2.4 Expressionskontrollen

Um sicherzustellen, dass das EBER Fragment auch wirklich exprimiert wird, wurde mit Hilfe von Northern Blots eine Expressionskontrolle durchgeführt. Für diesen Zweck wurden 293T Zelllinien mit dem pSG5-EBER2 Konstrukt transfiziert. 48 h später konnten die RNAs mit dem TriFast™-Verfahren gewonnen werden.



Abbildung 12: Analyse zweier EBER2 Expressionsklone im Northern Blot

Northern Blot zur Detektion der EBER2 Fragmente mit einer radioaktiv markierten EBER2-Sonde. Hierfür wurden je 20 µg RNA mittels 12% Urea-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Pfeil markiert das EBER2 Fragment. Eine Ethidiumbromidfärbung fungierte als Ladekontrolle. Aufgrund des deutlicheren Signals wurde für die weiteren Experimente der Klon 2 verwendet. Die EBER2-Sonde ist spezifisch für das 5'Ende von EBER2. Somit wird nur das Volllänge EBER2, nicht aber die kleineren prozessierten Fragmente vom 3'Ende detektiert.

6.3 Effekte der EBER-RNAs auf die SEC23A 3'-UTR

Aufgrund eines möglichen Einflusses der EBER-RNAs auf die Proteinmenge von SEC23A wurde zunächst die SEC23A-3'UTR in Luciferase Assays untersucht. Die Experimente sollten klären, ob EBER1 bzw. EBER2 einen alleinigen oder einen zur miR-200c additiven Effekt auf die SEC23A-3'UTR hat. Es wurde ebenfalls untersucht, ob das Vollängen EBER1/2 bzw. die Koexpression von EBER1+EBER2 eine Wirkung auf die Genexpression ausüben. In den folgenden Balkendiagrammen sind die mittleren Luciferaseaktivitäten mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Doppelansätzen dargestellt. Zur besseren Übersicht werden die Daten auf zwei Diagrammen gezeigt, obwohl sie aus dem gleichen Ansatz stammen.

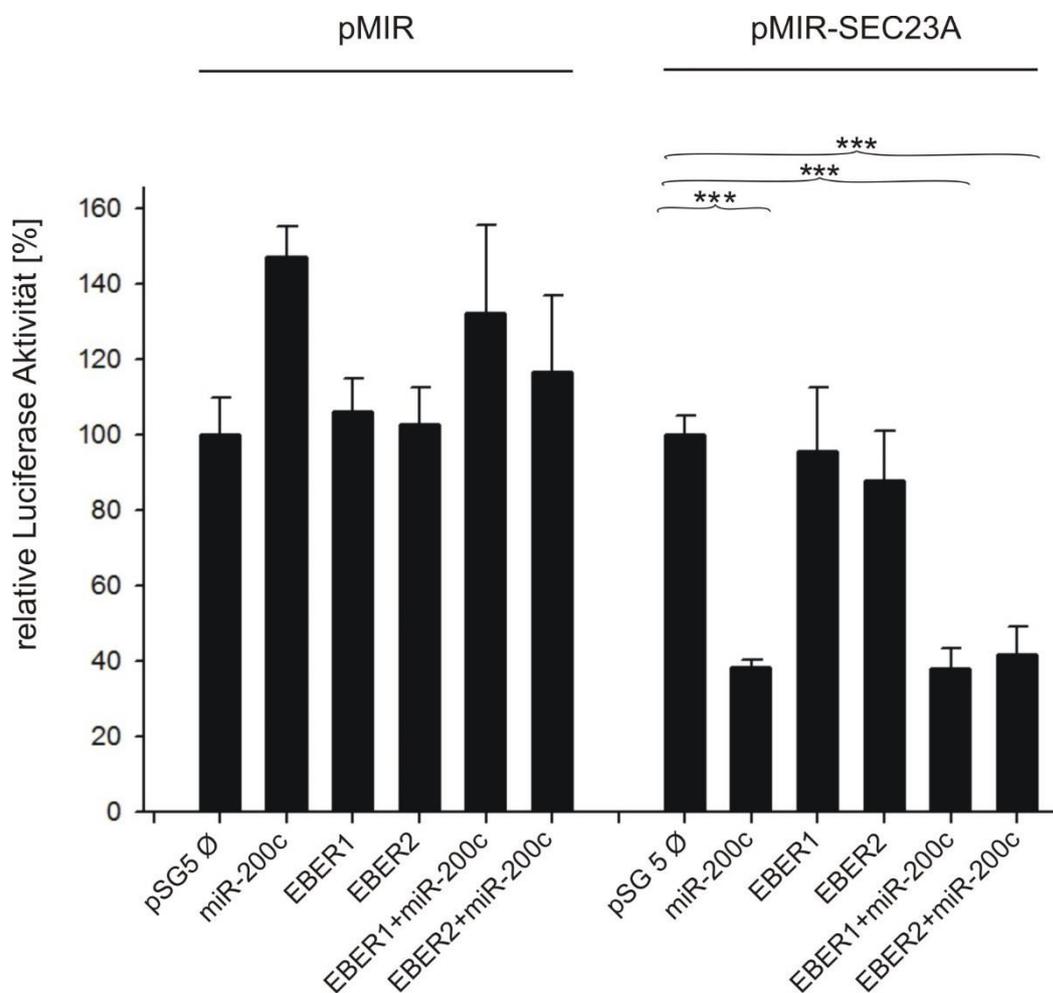


Abbildung 13: Luciferase Assay von EBER1 und EBER2 mit/ohne Koexpression von miR-200c
 293T Zellen wurden mit je 0,2 µg Reporterplasmid und 0,8 µg Effektorplasmiden transfiziert. Mir-200c wurde zu 0,4 µg DNA eingesetzt. EBER1 bzw. EBER2 wurde zu 0,2 µg transfiziert. Die Ansätze wurden mit pSG5 Leervektor auf 1 µg aufgefüllt. 48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Zellyse mit anschließender Messung der Luciferaseaktivität.

Das Balkendiagramm aus Abbildung 13 bestätigt die bereits durch Szczyrba et al publizierte reprimierende Wirkung von miR-200c auf die SEC23A-3'UTR. Im Vergleich zum pSG5 Leervektor führte eine Transfektion mit miR-200c alleine zu einer Reduktion der relativen Luciferaseaktivität auf 38% ($p < 0,001$). Die Kotransfektion von miR-200c mit EBER1 führte ebenfalls zu einer Reduktion auf 38% ($p < 0,001$), die von miR-200c mit EBER2 auf 42% ($p < 0,001$). EBER2 alleine führte zu einer Reduktion der Luciferaseaktivität auf 88% ($p = 0,060$), die von EBER1 auf 96% ($p > 0,05$). Damit übten weder EBER1 noch EBER 2 einen signifikanten Effekt auf SEC23A aus ($p > 0,05$). Die Kotransfektion von miR-200c zusammen mit EBER1 bzw. EBER2 zeigte keinen additiven Effekt der EBER-RNAs auf die miR-200c induzierte Reduktion der Luciferase Aktivität ($p > 0,05$).

Abbildung 14 zeigt im Unterschied zu Abbildung 13 die Transfektion von EBER1/2 und die Kotransfektion von EBER1+EBER2. Diese stehen ebenfalls im Vergleich zu pSG5 Leervektor und miR-200c.

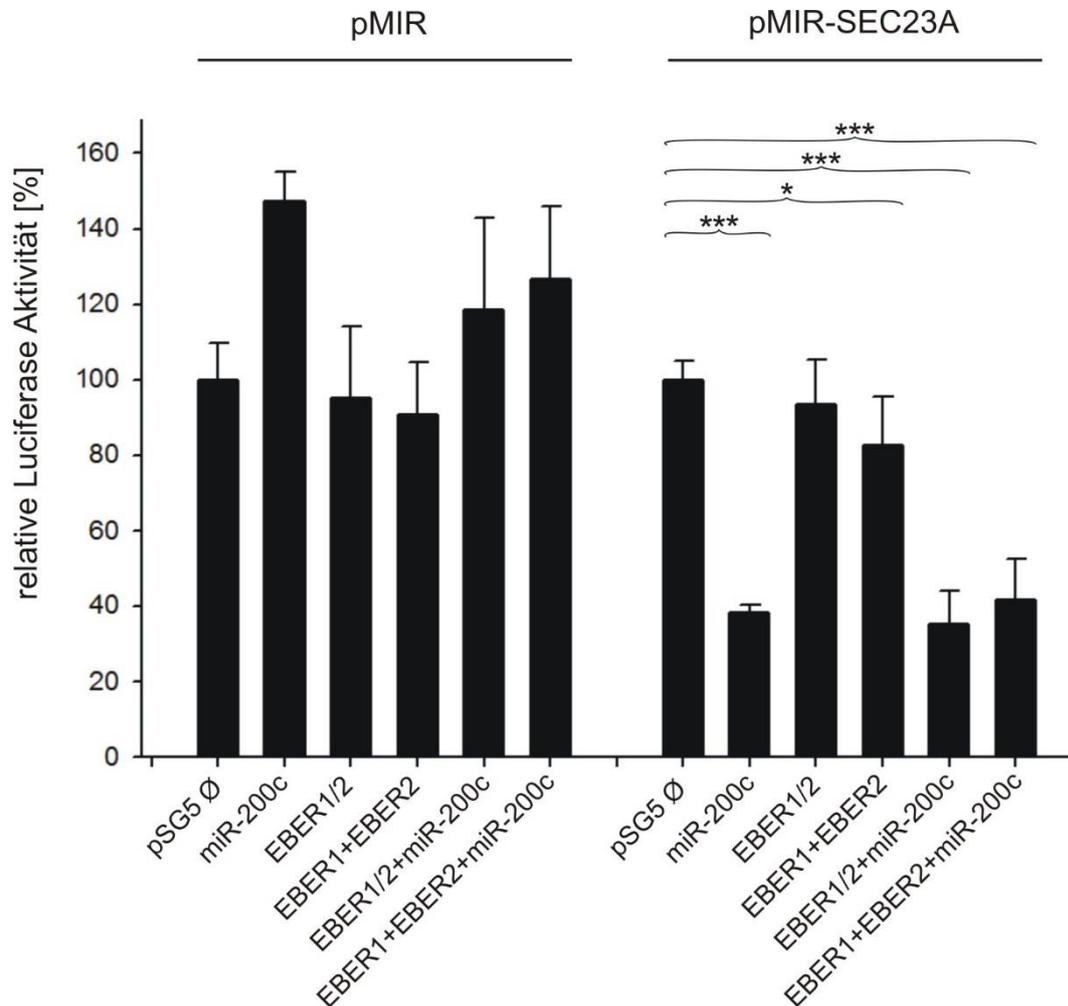


Abbildung 14: Einfluss von EBER1+EBER2 auf die 3'UTR-SEC23A

293T Zellen wurden mit je 0,2 µg Reporterplasmid und 0,8 µg Effektorplasmid transfiziert. Mir-200c und EBER1/2 wurden zu 0,4 µg DNA eingesetzt. In der Kotransfektion von EBER1+ EBER2 wurden je 0,2 µg transfiziert. Die Ansätze wurden mit pSG5 Leervektor auf 1 µg aufgefüllt. 48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Zellyse mit anschließender Messung der Luciferaseaktivität.

EBER1/2 zeigte eine Reduktion der Luciferaseaktivität auf 93% ($p > 0,05$). Die Kotransfektion von EBER1+EBER2 jedoch reduzierte die relative Luciferaseaktivität, im Vergleich zum pSG5 Leervektor signifikant auf 82% ($p = 0,012$). Jedoch haben die EBER-RNAs keinen additiven Effekt auf die miR-200c induzierte Reduktion von SEC23A-3'UTR ($p > 0,05$).

6.4 Effekt der EBER-RNAs auf die Proteinmenge von SEC23A

Wie schon erwähnt wurde vermutet, dass die EBER-RNAs zu einer Abnahme der Proteinmenge an SEC23A führen könnten. Dieser Verdacht sollte mit Hilfe der Western Blots überprüft werden. Da 293T Zellen keine miR-200c exprimieren, mussten wir diese zusätzlich mit den EBER-RNAs kotransfizieren. Es wurde ein weiterer Northern Blot zur Expressionskontrolle von miR-200c durchgeführt.

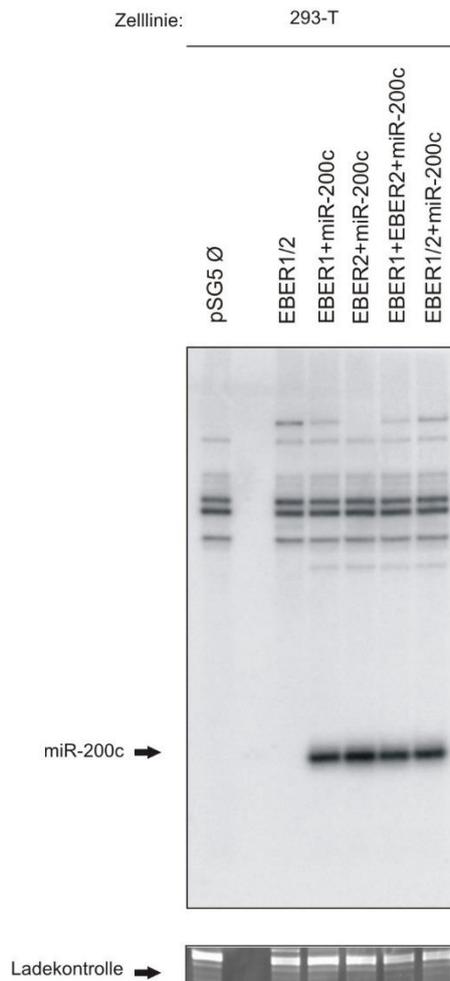


Abbildung 15: Nachweis der Expression von miR-200c zur Transfektionskontrolle

Northern Blot zur Detektion der miR-200c in transfizierten 293T-Zelllinien. 20 µg RNA wurden mittels 12% Urea-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Im Anschluss erfolgte eine radioaktive Markierung der miR-200c mit der entsprechenden Sonde. Der Pfeil zeigt die Banden der kotransfizierten miR-200c von EBER1, EBER2, EBER1+EBER2, sowie EBER1/2. Ein pSG5 Leervektor sowie EBER1/2 ohne Kotransfektion wurden als Negativkontrollen mitgeführt.

Aus den mit miR-200c und den EBER-RNAs kotransfizierten 293T Zellen wurden nach 48 h Proteinextrakte hergestellt. Nach Transfer auf Nitrocellulose wurde der Western Blot mit SEC23A- bzw. GAPDH-spezifischen Antikörpern inkubiert. Abbildung 16 zeigt einen von drei repräsentativen Western Blots.

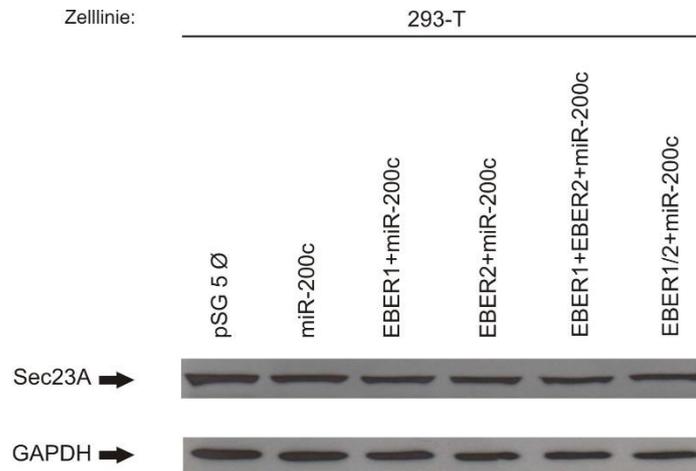


Abbildung 16: Western Blot zur Analyse der Proteinmenge von SEC23A

293T-Zellen wurden mit den EBER-Expressionsplasmiden und der miR-200c kotransfiziert und nach 48h Proteinextrakte hergestellt, die zu je 30 µg in 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Zur Detektion dienten Anti-SEC23A und Anti-GAPDH als primäre Antikörper und α-rabbit (GAPDH) und α-Ratte (SEC23A) als sekundäre Antikörper. Als Negativkontrolle diente ein mit pSG5-Leervektor transfizierter Zellextrakt.

Die Quantifizierung aus allen drei voneinander unabhängigen Western Blots ist in Abbildung 17 zu sehen.

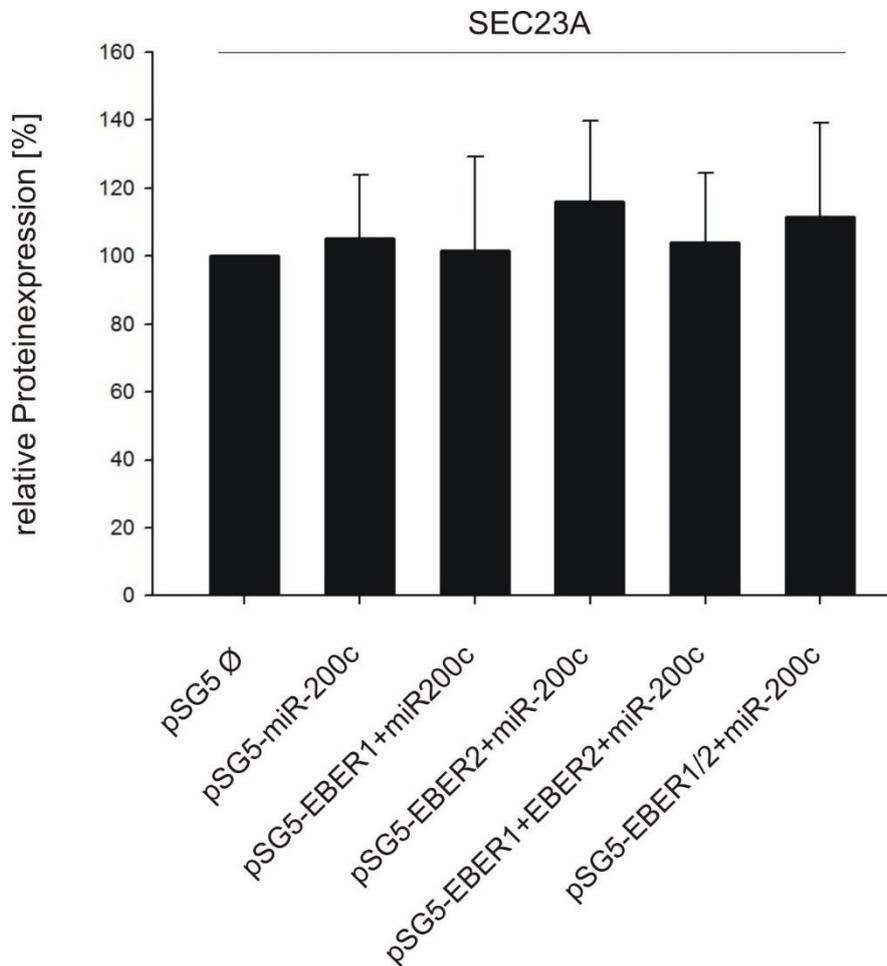


Abbildung 17: EBER-RNAs haben keinen Einfluss auf die Proteinmenge von SEC23A

Die Quantifizierung erfolgte durch Quantity One (Biorad). Die Expression des SEC23A Proteins wurde auf die GAPDH Expression normiert. Der Kontrollansatz mit pSG 5 Leervektor wurde auf 100% gesetzt.

Keine der Kotranfektionen von EBER-RNA mit miR-200c zeigte einen Einfluss auf die Menge des SEC23A Proteins. Weder EBER1, EBER2, EBER1/2 oder EBER1+EBER2 zeigten eine signifikante Reduktion ($p > 0,05$). EBER2 zeigte gar eine Erhöhung der Proteinmenge um 16% ($p > 0,05$).

6.5 Klonierung eines mutierten EBER Fragments

„Seed“-Sequenzen befinden sich in der Regel an den Positionen 2-7 des 5'-Endes einer microRNA. Daher wurden die Nukleotide an den Positionen 5-10 des 5'-Endes von EBER1 durch eine *SacI* Restriktionsschnittstelle ersetzt. Die *SacI* Schnittstelle wurde deshalb gewählt, weil sie weder in EBER1/2 noch im pSG5 Vektor schneidet. Dafür waren zueinander komplementäre Primer notwendig, die die Mutation abdeckten (siehe 4.12.1). Um die Fragmente später erfolgreich in den pSG 5 Vektor ligieren zu können, wurden die Primer mit zusätzlichen Schnittstellen versehen. Das EBER1/2 Fragment diente in der PCR als Template. Es wurden 2 Fragmente amplifiziert. Ein kurzes Fragment 1 von 142 kb Länge und ein größeres Fragment 2 von 634 kb Länge, welche in Abbildung 18 dargestellt sind.

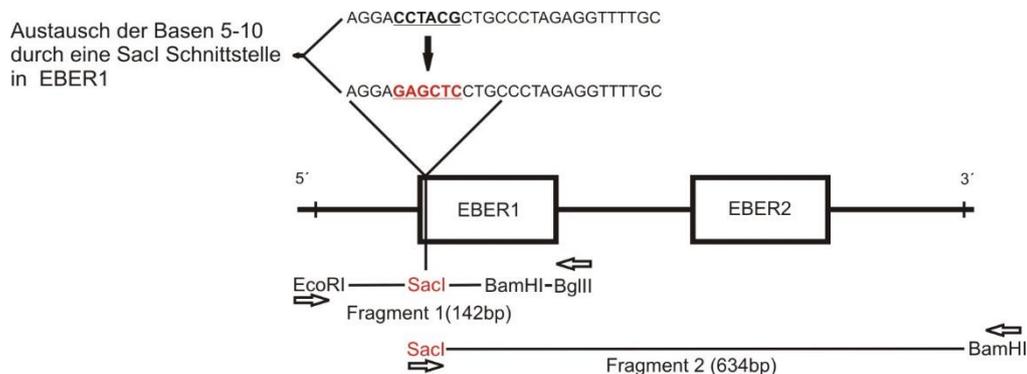


Abbildung 18: Schematische Abbildung beider Amplifikate und deren *SacI* Lokalisation

Die Fragmente wurden zunächst einzeln in pGEM Vektoren ligiert. Das kleine Fragment wurde anschließend mit *EcoRI* und *Bgl* II verdaut und in einen seinerseits mit *EcoRI* /*Bahm*HI verdauten pSG 5 Vektor ligiert. Nach erfolgreicher Ligation und Transformation musste das pSG5-EBER Mut Plasmid (kleines Fragment) mit *SacI* verdaut werden. Anschließend konnte das mit *SacI* doppelverdaute große Fragment aus dem pGEM Vektor in den pSG5-EBER mut (kleines Fragment) hineinligiert werden. Die Ligationsansätze wurden in pMOS transformiert. Nach Aufreinigung mit Anionen Austauschsäulen (NucleoBond™) wurden die Proben auf 1 µg/µl verdünnt und zur Sequenzierung an die Firma „seq-it“ verschickt. In Klon 8 konnte die Mutation 5'-GAGCTC-3' in den Nukleotiden 5 bis 10 fehlerfrei nachgewiesen werden. Die Sequenz von Klon 8 ist im Anhang zu finden.

Ein Probeverdau der pSG5-EBER1 Mut 5-10 Klone ist in Abbildung 19 dargestellt.

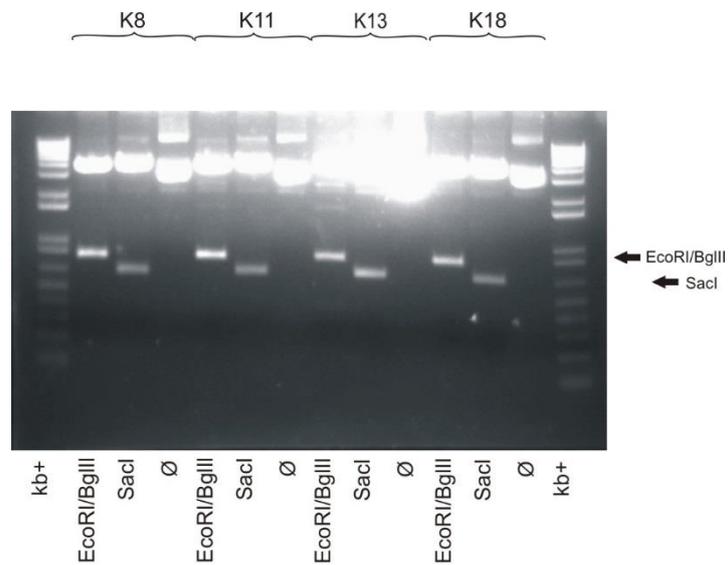


Abbildung 19: Kontrollverdau der EBER1 Mut 5-10 Klone

Die Klone wurden jeweils mit EcoRI/BglIII oder SacI geschnitten. Es konnte mit SacI doppelverdaut werden, weil die Konstrukte noch ein kleines Fragment des pGEM Vektors inklusive SacI Schnittstelle trugen. Die EcoRI/BglIII verdauten Fragmente sind etwas größer als die SacI verdauten. Dies liegt daran, dass den SacI verdauten Fragmenten ca. die ersten 100 bp fehlen.

6.6 Nachweis der EBER Mutation in 23nt langen Fragmenten im Northern Blot

Aus der mit EBER1 Mut 5-10 transfizierten 293T Zellen gewonnenen RNA wurden Northern Blots durchgeführt. Diese sind in Abbildung 20 zu sehen.

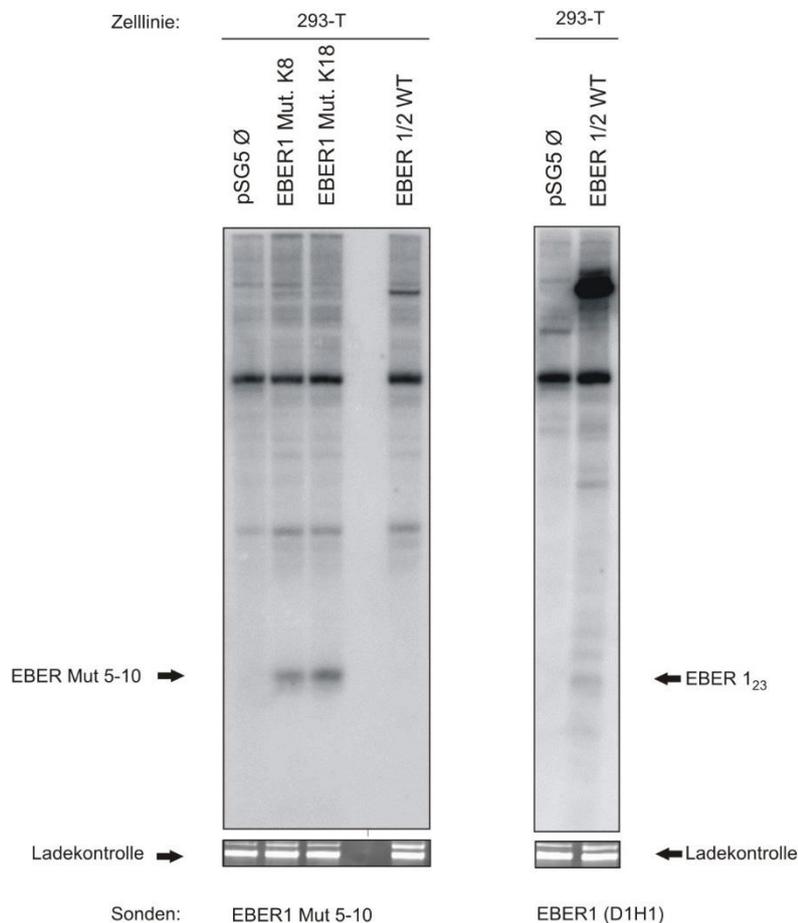


Abbildung 20: Expressionsnachweis des mutierten EBER1 Fragment im Northern Blot

Es wurden 293T Zellen mit den jeweiligen EBER Mut 5-10 Plasmiden transfiziert. Anschließend wurden je 20 µg RNA mittels 12% Urea-Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosmembran geblottet. Zur Detektion des EBER Mut 5-10 Fragment wurde eine spezifische radioaktive Sonde eingesetzt. Der Pfeil markiert die beiden Banden der Klone 8 und 18. Die Höhe entspricht derer des EBER1₂₃ Fragments. Dieses ist in der rechten Abbildung, welche mit einer EBER1-Sonde inkubiert wurde, zu sehen.

Die beiden Pfeile markieren jeweils das 23 Nukleotid lange EBER1₂₃ Fragment, welches von Dipl. Biol. Linda Schlegel bereits beschrieben wurde. Die EBER Mut 5-10 Sonde ist spezifisch für die Mutation in EBER1. In Klon 8 und 18 sind zwei deutliche Signale zu sehen.

7 DISKUSSION

Im Rahmen einer cDNA Analyse der microRNA Expressionsmuster von Epstein-Barr Virus-infizierten nasalen NK/T-Zell Lymphomen waren kleine Fragmente der viralen, nicht-kodierenden EBER RNAs gefunden worden. Die Größe von ca. 23 nt dieser kleinen, prozessierten Fragmente der EBER RNAs warfen die Möglichkeit auf, dass sie im Sinne von miRNAs in die Genregulation eingreifen. Es ist bekannt, dass EBER-RNAs die Regulierung der Zielstrukturen durch microRNAs beeinflussen können (ALLES et al., 2015). Da die EBER RNAs in sehr großen Kopienzahlen in EBV-infizierten Zellen vorliegen, war es zu Beginn dieser Arbeit unklar, ob die prozessierten Fragmente im Sinne von miRNAs die Translation von mRNAs inhibieren oder ob sie als kompetitive Inhibitoren die miRNA Prozessorkomplexe inhibieren und so vielleicht die Funktionen von miRNAs inhibieren.

Szczyrba et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass eine Überexpression der microRNA miR-200c zu einer Reduktion der Proteinmenge an SEC23A führt (SZCZYRBA et al., 2011). Nachdem ein Western Blot EBV-infizierter miR-200c exprimierender Zellen ebenfalls eine Reduktion von SEC23A zeigte, stellte sich die Frage, ob EBER-RNAs (einzeln oder alleine) im Rahmen einer Koexpression mit miR-200c einen additiven Effekt auf die Abnahme der SEC23A Menge ausüben. Es ist bekannt dass EBER-RNAs die Regulierung der Zielstrukturen durch microRNAs beeinflussen können (ALLES et al., 2015). In Luciferase Assays sollte die Regulation der SEC23A-3'UTR durch die EBER-RNAs mit und ohne Koexpression von miR-200c untersucht werden. Im Anschluss wurde die Proteinmenge in Anwesenheit der EBER-RNAs analysiert. Für diesen Zweck musste zunächst das EBER2 Konstrukt hergestellt werden. Das Fragment von EBER2 wurde amplifiziert und in den pSG5 Vektor kloniert. Die Vektoren pSG5-EBER1/2, pSG5-EBER1 sowie pSG5-miR-200c waren bereits im Labor vorhanden.

Die für die Experimente verwendeten 293T Zellen exprimieren keine detektierbaren Mengen microRNA miR-200c. Aus diesem Grund musste die microRNA miR-200c kotransfiziert werden.

Die Luciferase Assays lieferten keine Hinweise auf einen additiven Effekt der EBER-RNAs auf die miR-200c abhängige Reduktion von SEC23A. Es konnten keine signifikanten Reduktionen der Luciferase Aktivität in mit miR-200c und EBER-RNAs kotransfizierten Proben im Vergleich zu einer alleinigen Transfektion mit miR-200c festgestellt werden.

Die Kotransfektion von EBER1+EBER2 alleine zeigte aber eine signifikante Reduktion der relativen Luciferaseaktivität im Vergleich zum pSG5 Leervektor um 82% ($p=0,012$). Auch EBER2, EBER1 und EBER2 führten zu einer leichten Reduktion der Luciferase Aktivität. Diese Ergebnisse sind aber als nicht signifikant zu werten ($p>0,05$). Ein großes Problem stellte die enorme Streuung der Werte dar. Es zeigten sich große Spannweiten der gemessenen Werte. Diese Streuungen konnten auch schon in vorangegangenen Experimenten mit den EBER-RNAs beobachtet werden. Ein weiteres Problem war der große Luciferaseansatz. Um die Werte besser gegenüber stellen zu können wurde alle Konstellationen, also EBER1, EBER2, EBER1/2 und EBER1+EBER2 jeweils mit und ohne Kotransfektion der miR-200c in einem Ansatz gemessen. Um vergleichbare Werte zu erhalten, konnten jeweils nur 0,2 μg von EBER1 oder EBER2 transfiziert werden. Deshalb könnte es sein, dass die Konzentrationen zu gering sind um einen Effekt auf SEC23A beobachten zu können. Die Kombination aus EBER1+EBER2 reduzierte die Luciferaseaktivität auf 82%, während das Volllänge EBER1/2 Konstrukt die relative Aktivität nur auf 93% reduzierte ($p>0,05$). Dies könnte auf unterschiedliche Konzentrationen der Transkripte zurückzuführen sein. Wenn man davon ausgeht das die RNA von EBER1/2 nur von einer Transkriptionseinheit transkribiert wird, während die Kombination von EBER1+EBER2 aufgrund unterschiedlicher Loci von zwei Transkriptionseinheiten synthetisiert wird. Folglich würde man unterschiedliche Konzentration der EBER-RNAs erhalten, die diese Ergebnisse erklären könnten. Zudem sollte die Experimente in kleineren Ansätzen durchgeführt werden, um EBER1 als auch EBER2 in höheren Konzentrationen zu 0,4 μg transfizieren zu können. Auch könnte 293T-Zelllinien gegen miR-200c exprimierende Zelllinien ausgetauscht werden. Dies würde eine Kotransfektion mit miR-200c überflüssig machen.

Die Western Blots zeigten ebenfalls keine Reduktion der Proteinmenge an SEC23A, obwohl man eine Reduktion alleine aufgrund der Kotransfektion mit miR-200c erwarten müsste. Zunächst wurde eine fehlerhafte Transfektion vermutet. Die anschließenden Expressionskontrollen schlossen dies aber aus. Die fehlende Reduktion von SEC23A könnte auf die biologische Halbwertszeit von SEC23A zurückzuführen sein. Der Effekt von miR-200c auf die Proteinexpression wäre durch eine lange Halbwertszeit von SEC23A maskiert. Darüber hinaus war die Reduktion von SEC23A in den Prostatakarzinom Linien LnCAP bzw. DU145 getestet worden und nicht in 293T-Zellen. Ein additiver Effekt der EBER-RNAs auf die miR-200c vermittelte Reduktion von SEC23A konnte in den Western Blots weitestgehend ausgeschlossen werden.

Ungeachtet dessen zeigte die Kotransfektion von EBER1+EBER2 einen Effekt auf die SEC23A-3'UTR. Wie bereits erwähnt können "small-non-coding RNAs" Einfluss auf das Verhalten von microRNAs ausüben. Es sollte untersucht werden, ob die Wirkungen der EBER-RNAs durch eine potentielle „Seed“-Sequenz vermittelt werden. Nachdem das EBER1-Mut 5-10 Konstrukt kloniert wurde, konnte die Mutation der Nukleotide 5-10 in den prozessierten Fragmenten von EBER1 auf Höhe des EBER1₂₃-Fragments in Northern Blot Analysen nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die potentielle „Seed“-Sequenz in dem prozessierten EBER1 Fragment zu finden ist. Es war ursprünglich geplant, das SEC23A Protein mit dem mutierten EBER1 Konstrukt zu testen. Wäre die Wirkung aufgehoben würde dies ein Hinweis auf die Bedeutung der Sequenz in der Wirkungsweise des EBER1 Fragment geben. Da aber für EBER1 weder in den Luciferase Assays noch in den Western Blots ein signifikanter Effekt zu sehen war wurde auf dieses Experiment verzichtet.

Wie schon erwähnt ließ die Größe dieses Fragment eine Ähnlichkeit zu microRNAs vermuten. Das EBER1₂₃ Fragment lässt sich von dem 5'-Ende der EBER1-RNA ableiten (Linda Schlegel, Diplomarbeit, Universität des Saarlandes, „Analysis of non-coding RNAs in nasal NK/T-cell lymphomas“, 2014). Es wurden ebenfalls prozessierte Fragmente des EBER2 in Northern Blot nachgewiesen. Diese sind aber in deutlich niedrigeren Mengen nachweisbar, was mit der kürzeren Halbwertszeit von EBER2 zu erklären wäre (CLARKE et al., 1992).

Die prozessierten EBER2-Fragmente leiten sich im Unterschied zu EBER1 von dem 3'-Ende der RNA ab, weshalb sie in den Expressionsanalysen dieser Arbeit nicht zu finden sind.

Die EBER1₂₃-RNA konnten bisher in verschiedenen EBV-positiven Tumorklinen, durch verschiedene RNA-Extraktions-Verfahren in unterschiedlichen Laboren nachgewiesen werden (ALLES et al., 2015). Dies spricht gegen eine Annahme, es könnte sich bei dem Fragment um ein RNA-Abbauprodukt handeln, zumal die prozessierten Fragmente des 5'-EBER2 nicht nachweisbar sind. Das von Adenoviren gebildete VA1 ist ebenfalls eine nicht kodierende RNA, die in kleineren Fragmenten mit der Größe von 21 und 27 Nukleotiden zu finden ist und die Fähigkeiten der RNA Interferenz besitzt (ANDERSSON et al., 2005). Dies spricht ebenfalls gegen einen nukleolytischen Abbau der EBER-RNAs während der RNA Aufarbeitung.

Auch der Einfluss von „small-non-coding RNAs“ auf die Degradierung von mRNAs und microRNAs durch Bindung der „Seed“-Sequenz ist beschrieben worden (CAZALLA, STEITZ, 2010). In einer kürzlich publizierten Arbeit wurde in Luciferase Assays untersucht, ob sich das EBER1 ähnlich einer microRNA verhält. Hierfür wurden Reporter Konstrukte verwendet, die eine EBER Zielsequenz enthielten. Diese Arbeit konnte dem EBER1 aber keine microRNA-ähnliche Aktivität nachweisen (ALLES et al., 2015). Darüber hinaus konnte eine konkrete Zielstruktur für die EBER-RNAs bisher nicht nachgewiesen werden, wohl aber eine additive Wirkung auf Zielstrukturen bekannter microRNAs (ALLES et al., 2015). Die EBER-RNAs verstärken die Wirkung der miR-142-3p auf die Reduktion von IL1 α (Interleukin 1 alpha) und RAC1 (=ras-related C3 botulinum toxin substrate 1). Dieses Experiment könnte mit dem mutierten EBER1 Fragment wiederholt werden. Es könnte untersucht werden, ob die Mutation in der potentiellen „Seed“-Sequenz, die additive Wirkung der EBER-RNAs auf die miR-142-3p aufhebt. Dies könnte weitere Hinweise auf die Wirkungsweise der EBER-RNAs geben.

8 ANHANG

8.1 Sequenzen

pSG5-EBER2 Klon 2

5'-TGTAGCACGGTCAGTGAGCGAGGAGCGGAGAGTCTAGAGTCGACCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAA
ACCACAAC TAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAG
CTGCAATAAAACAAGTTCTGCTTTAATAAGATCTGGATCCAAACTTTAGTTTTAGGATTTATGCATCCATTATCCCGCAGT
TCCACCTAAACGGGGCTTAACGTTGCATCCCAGAAGATGCACGCTTAACCCCGCCTACAACCGTGACGTAGCTGTTTACC
AGCATGTATAGAGTTACGGTTTCGCTACATCAAACAGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCA
GTGCGGTGCTACCGACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGCCTAGAGCATTGCAAGTCAGGA
TTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTCCGGCTTGTCGCTGTTTTTTGTGGCTAGTTTTGCACCCACAACATGTAAGG
GCCCCGTACCCCTACAACACAAAAAACTATCTCCCTAACCATCCTTTTGCCAATCAATTCTGTGACGGGGTTTCCTG
GACACCGGATCCCGCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCTTTGCCAAAATGATGAGACAGCACAATAACCAGCACGT
TGCCAGGAGCTGTAGGAAAAAGAAGAAGGCATGAACATGGTTAGCAGAGGGGGCCCGTTTTGACTCAGAGTATTTTATC
CTCATCTCAAACAGTGTATATCATTGTAACCATAAAGAGAAAGGCAGGATGATGACCAGGATGTAGTTGTTTCTACCAAT
AAGAATTTCCACGCCAGCCAGAATTTATGCAGAAATATCTACCTTATCATTTAATTATAACAATTGTCTCTAAAAC
TGTGCTGAAGTACAATATAATAACCTGATGCTGAAAAAAGTGATTAGAGAAAAGTACTACAATCTGACAAAATAAACAA
AAAGTGATTTAAAATTCGTACAAATTGCTAGCTTAAAGGTTTACGAAAAGTTACAGAAAATGAAAGAAAATAAACGGGAC
AATGGCTGTCCAACAAGAATAAAAGGATAAACAATTTCTGAGGTCATGGATACCACGGAAACTTCCCACTA-3'

pSG5-EBER1 Mut 5-10 Klon 8

5'-GCAGTGCTGTCTCTCATTTTGGCAAGATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTC CATAGGCAACCCCGCCTACAC
ACCAACTATAGCAAACCCCGCCCCGTACGGTGACGTAGTCTGTCTTGAGGAGATGTAGACTTGTAGACTGCAAAAACC
TCAGGAGAGCTCCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAGAGAGGAGACGTGTGTGGCTGTAGCCACCCGTCCCGGTACAAGTCCC
GGGTGGTGAGGACGGTGTCTGTGGTTGCTTCCAGACTCTGCTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTACCAGCTGGTGGTCC
GCATGTTTTGATCCAACTTTTGTCTTAGGATTTATGCATCCATTATCCCGCAGTTCCACCTAAACGGGGCTTAACGTTGC
ATCCAGAAAGATGCACGCTTAACCCCGCCTACAACCGTGACGTAGCTGTTTACCAGCATGTATAGAGTTACGGTTCGCTA
CATCAAACAGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCAGTGGGTGCTACCGACCCGAGGTCAA
GTCCCGGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGCCTAGAGCATTGCAAGTCAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTA
TTCGGCTGTCCGCTGTTTTTTGTGGCTAGTTTTGCACCCACAACATGTAAGGGCCCGCTACCCCTACAACACAAAACA
AACTATCTCCCTAACCATCCTTTTGCCAATCAATTCTGTGACGGGGTTTCCTGGACACCGGATCCCGAATCACTAGTGC
GGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCTGCCCTAGAGGTTTTGCGGAAGATCCAGATCTTATTAAGCAGAAC
TTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTACAAAATAAGCATTTTTTTCACTGCAT
TCTAGGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGTGCAGCTCTAGACTCTTCCGCTTCCCTCGCTC
ACTGACTCGCTGGCGCTCGGGTCTCGGGCTGGCGGGCGGAGCGGTTATCAGCTTCACTCAAGGCGGTTAATACCGGTT
ATCCACAGAAAATCCAGGGGAATATAAACGCGGCCACATGA-3'

8.2 Abkürzungsverzeichnis

5'-Cap	Cap-Struktur am 5'-Ende von mRNA
A	Ampere
α	anti
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BL	Burkitt Lymphom
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>C.elegans</i>	<i>Ceaeenorhabditis elegans</i>
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	copyDNA
ca.	zirka
CIP	calf intestinal phosphatase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DLBCL	Diffus-großzellige B-Zell Lymphome
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
Drosha	double-stranded RNA-specific endoribonuclease
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBER	Epstein-Barr virus-encoded small RNA
EBNA	Epstein-Barr Virus nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	fötales Kälberserum
GA	Golgi-Apparat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O(bi)dest	(bi)destilliertes Wasser
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HL	Hodgkin Lymphom
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
IM	Infektiöse Mononukleose
IPTG	Isopropylthiogalactosid
IRF3	Interferon regulatory factor 3
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge [nm]

Anhang

L22	50S ribosomal protein L22
La	Lupus Antigen
LB	Luria's Broth
M	Molar
m	Milli-
μ	Mikro
MCS	Multiple Cloning Site
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute
miR	microRNA
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
mut	Mutante
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NHL	Non Hodgkin Lymphom
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NPC	Nasopharynxkarzinom
nt	Nukleotid
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ori	Ursprung der Plasmidreplikation (origin of replication)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P-	Bodies Processing Bodies
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PKR	double stranded RNA-dependent protein kinase
pox	Peroxidase
pre-miR	precursor microRNA
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	simian virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat- Ethylendiamintetraacetat
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris- Ethylendiamintetraacetat
TF	Transkriptionsfaktor
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
VA	virus associated
V	Volt
WB	Western Blot
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

9 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. F.A. Grässer möchte ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Vergabe eines interessanten Promotionsthemas herzlich danken. Vielen Dank, dass du dir immer Zeit für mich genommen hast und ein offenes Ohr für meine Anliegen hattest.

Frau Dr. Julia Alles, Herrn Dr. Martin Hart und Frau Ruth Nord danke ich für die Vermittlung molekularbiologischer Arbeitsmethoden und Hilfestellung bei Problemen verschiedenster Art.

Ganz besonderes Dankeschön geht an Frau Dipl. Stefanie Marx, Frau Dipl. Verena Klemis und Herrn Dipl. Hannes Borchardt für die ständige Hilfsbereitschaft, den vielen Ratschlägen und ihrer Geduld und Unterstützung, sowie der entspannten und lustigen Arbeitsatmosphäre im Labor. Vielen Dank auch Frau Dipl. Jennifer Menegatti für die Unterstützung bei der Bildbearbeitung.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Eltern und beiden Brüdern danken, die mir stets den Rücken gestärkt und nie an mir gezweifelt haben. Nicht zuletzt möchte ich Jasamin Saifi für ihre Geduld, Liebe und Verständnis danken und dafür, dass du mir in jeder Lebenslage zur Seite stehst.

10 LEBENSLAUF

Entfernt !

11 LITERATURVERZEICHNIS

1. Alles J, Hasler D, Kaszmi SM, Tesson M, Hamilton A, Schlegel L, Marx S, Eichner N, Reinhardt R, Meister G, Wilson JB, Grässer FA (2015) Epstein-Barr Virus EBER Transcripts Affect miRNA-Mediated Regulation of Specific Targets and Are Processed to Small RNA Species. *Non-Coding RNA* 2015, 1(3), 170-191
2. Andersson MG, Haasnoot PC, Xu N, Berenjian S, Berkhout B, Akusjarvi G (2005) Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol* 79:9556-9565
3. Aozasa K, Takakuwa T, Hongyo T, Yang WI (2008) Nasal NK/T-cell lymphoma: epidemiology and pathogenesis. *Int J Hematol* 87:110-117
4. Arrand JR, Rymo L (1982) Characterization of the major Epstein-Barr virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *J Virol* 41:376-389
5. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA (1998) EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 9:395-404
6. Babcock GJ, Hochberg D, Thorley-Lawson AD (2000) The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* 13:497-506
7. Bachmann M, Pfeifer K, Schroder HC, Muller WE (1989) The La antigen shuttles between the nucleus and the cytoplasm in CV-1 cells. *Mol Cell Biochem* 85:103-114
8. Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R (1994) COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77:895-907
9. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297
10. Bednarek SY, Ravazzola M, Hosobuchi M, Amherdt M, Perrelet A, Schekman R, Orci L (1995) COPI- and COPII-coated vesicles bud directly from the endoplasmic reticulum in yeast. *Cell* 83:1183-1196
11. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W (2006) Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71:513-521
12. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523
13. Blades RA, Keating PJ, McWilliam LJ, George NJ, Stern PL (1995) Loss of HLA class I expression in prostate cancer: implications for immunotherapy. *Urology* 46:681-686; discussion 686-687

14. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95-113
15. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13:1097-1101
16. Burkitt D (1958) A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* 46:218-223
17. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10:1957-1966
18. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2999-3004
19. Carbone A, Gloghini A, Dotti G (2008) EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. *Oncologist* 13:577-585
20. Cazalla D, Steitz JA (2010) Down-regulation of a host microRNA by a viral noncoding RNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75:321-324
21. Cazalla D, Yario T, Steitz JA (2010) Down-regulation of a host microRNA by a Herpesvirus saimiri noncoding RNA. *Science* 328:1563-1566
22. Chaconas G, van de Sande JH (1980) 5'-32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol* 65:75-85
23. Chang KL, Chen YY, Shibata D, Weiss LM (1992) Description of an in situ hybridization methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagn Mol Pathol* 1:246-255
24. Cho S, Ryoo J, Jun Y, Ahn K (2011) Receptor-mediated ER export of human MHC class I molecules is regulated by the C-terminal single amino acid. *Traffic* 12:42-55
25. Christoffersen NR, Silahdaroglu A, Orom UA, Kauppinen S, Lund AH (2007) miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFHX1B. *RNA* 13:1172-1178
26. Clarke PA, Sharp NA, Clemens MJ (1990) Translational control by the Epstein-Barr virus small RNA EBER-1. Reversal of the double-stranded RNA-induced inhibition of protein synthesis in reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* 193:635-641
27. Clarke PA, Sharp NA, Clemens MJ (1992) Expression of genes for the Epstein-Barr virus small RNAs EBER-1 and EBER-2 in Daudi Burkitt's lymphoma cells: effects of interferon treatment. *J Gen Virol* 73 (Pt 12):3169-3175

28. Croce CM (2009) Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 10:704-714
29. Delecluse HJ, Feederle R, O'Sullivan B, Tanriere P (2007) Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist. *J Clin Pathol* 60:1358-1364
30. Dobbelstein M, Shenk T (1995) In vitro selection of RNA ligands for the ribosomal L22 protein associated with Epstein-Barr virus-expressed RNA by using randomized and cDNA-derived RNA libraries. *J Virol* 69:8027-8034
31. Dugaiczuk A, Boyer HW, Goodman HM (1975) Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* 96:171-184
32. Elia A, Vyas J, Laing KG, Clemens MJ (2004) Ribosomal protein L22 inhibits regulation of cellular activities by the Epstein-Barr virus small RNA EBER-1. *Eur J Biochem* 271:1895-1905
33. Engels BM, Hutvagner G (2006) Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 25:6163-6169
34. Epstein MA, Achong BG, Barr YM (1964) Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1:702-703
35. Fok V, Mitton-Fry RM, Grech A, Steitz JA (2006) Multiple domains of EBER 1, an Epstein-Barr virus noncoding RNA, recruit human ribosomal protein L22. *RNA* 12:872-882
36. Fromme JC, Ravazzola M, Hamamoto S, Al-Balwi M, Eyaid W, Boyadjiev SA, Cosson P, Schekman R, Orci L (2007) The genetic basis of a craniofacial disease provides insight into COPII coat assembly. *Dev Cell* 13:623-634
37. Fromme JC, Orci L, Schekman R (2008) Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23. *Trends Cell Biol* 18:330-336
38. Giedroc DP, Cornish PV (2009) Frameshifting RNA pseudoknots: structure and mechanism. *Virus Res* 139:193-208
39. Grasser FA, Murray PG, Kremmer E, Klein K, Remberger K, Feiden W, Reynolds G, Niedobitek G, Young LS, Mueller-Lantzsch N (1994) Monoclonal antibodies directed against the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 (EBNA1): immunohistologic detection of EBNA1 in the malignant cells of Hodgkin's disease. *Blood* 84:3792-3798
40. Gregorovic G, Bosshard R, Karstegl CE, White RE, Pattle S, Chiang AK, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Russ R, Farrell PJ (2011) Cellular gene expression that correlates with EBER expression in Epstein-Barr Virus-infected lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 85:3535-3545

41. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ (2008a) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 10:593-601
42. Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ (2008b) MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 7:3112-3118
43. Hanto DW, Sakamoto K, Purtilo DT, Simmons RL, Najarian JS (1981) The Epstein-Barr virus in the pathogenesis of posttransplant lymphoproliferative disorders. Clinical, pathologic, and virologic correlation. *Surgery* 90:204-213
44. Henle W, Diehl V, Kohn G, Zur Hausen H, Henle G (1967) Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* 157:1064-1065
45. Huang Y, Xie J, Ding Y, Zhou X (2016) Extranodal Natural Killer/T-Cell Lymphoma in Children and Adolescents: A Report of 17 Cases in China. *Am J Clin Pathol* 145:46-54
46. Hurteau GJ, Carlson JA, Spivack SD, Brock GJ (2007) Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. *Cancer Res* 67:7972-7976
47. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293:834-838
48. Iorio MV, Croce CM (2012) MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 4:143-159
49. Isobe Y, Sugimoto K, Yang L, Tamayose K, Egashira M, Kaneko T, Takada K, Oshimi K (2004) Epstein-Barr virus infection of human natural killer cell lines and peripheral blood natural killer cells. *Cancer Res* 64:2167-2174
50. Iwakiri D, Eizuru Y, Tokunaga M, Takada K (2003) Autocrine growth of Epstein-Barr virus-positive gastric carcinoma cells mediated by an Epstein-Barr virus-encoded small RNA. *Cancer Res* 63:7062-7067
51. Iwakiri D, Sheen TS, Chen JY, Huang DP, Takada K (2005) Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces insulin-like growth factor 1 and supports growth of nasopharyngeal carcinoma-derived cell lines. *Oncogene* 24:1767-1773
52. Iwakiri D (2014) Epstein-Barr Virus-Encoded RNAs: Key Molecules in Viral Pathogenesis. *Cancers (Basel)* 6:1615-1630
53. Jaffe ES (2009) The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:523-531

54. Jansson MD, Lund AH (2012) MicroRNA and cancer. *Mol Oncol* 6:590-610
55. Kanegane H, Wado T, Nunogami K, Seki H, Taniguchi N, Tosato G (1996) Chronic persistent Epstein-Barr virus infection of natural killer cells and B cells associated with granular lymphocytes expansion. *Br J Haematol* 95:116-122
56. Kang DC, Gopalkrishnan RV, Wu Q, Jankowsky E, Pyle AM, Fisher PB (2002) mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:637-642
57. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S (2005) IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6:981-988
58. Kitagawa N, Goto M, Kurozumi K, Maruo S, Fukayama M, Naoe T, Yasukawa M, Hino K, Suzuki T, Todo S, Takada K (2000) Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J* 19:6742-6750
59. Komano J, Maruo S, Kurozumi K, Oda T, Takada K (1999) Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol* 73:9827-9831
60. Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y (2008) The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 283:14910-14914
61. Kutok JL, Wang F (2006) Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 1:375-404
62. Lang MR, Lapierre LA, Frotscher M, Goldenring JR, Knapik EW (2006) Secretory COPII coat component Sec23a is essential for craniofacial chondrocyte maturation. *Nat Genet* 38:1198-1203
63. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:858-862
64. Lederberg EM, Cohen SN (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 119:1072-1074
65. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854
66. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415-419

67. Lerner MR, Andrews NC, Miller G, Steitz JA (1981) Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:805-809
68. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15-20
69. Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR, 3rd, Parker R, Hannon GJ (2005) A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* 7:1261-1266
70. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834-838
71. Malathi K, Saito T, Crochet N, Barton DJ, Gale M, Jr., Silverman RH (2010) RNase L releases a small RNA from HCV RNA that refolds into a potent PAMP. *RNA* 16:2108-2119
72. Matsuoka K, Orci L, Amherdt M, Bednarek SY, Hamamoto S, Schekman R, Yeung T (1998) COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* 93:263-275
73. Meijer CJ, Jiwa NM, Dukers DF, Oudejans JJ, de Bruin PC, Walboomers JM, van den Brule AJ (1996) Epstein-Barr virus and human T-cell lymphomas. *Semin Cancer Biol* 7:191-196
74. Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR, Hovanessian AG (1990) Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62:379-390
75. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273
76. Niedobitek G, Agathangelou A, Herbst H, Whitehead L, Wright DH, Young LS (1997) Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol* 182:151-159
77. Oshimi K (2007) Progress in understanding and managing natural killer-cell malignancies. *Br J Haematol* 139:532-544
78. Paccaud JP, Reith W, Carpentier JL, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R, Orci L (1996) Cloning and functional characterization of mammalian homologues of the COPII component Sec23. *Mol Biol Cell* 7:1535-1546
79. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME (2008) The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 22:894-907

80. Pfaff J, Meister G (2013) Argonaute and GW182 proteins: an effective alliance in gene silencing. *Biochem Soc Trans* 41:855-860
81. Poirier S, Ohshima H, de-The G, Hubert A, Bourgade MC, Bartsch H (1987) Volatile nitrosamine levels in common foods from Tunisia, south China and Greenland, high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Int J Cancer* 39:293-296
82. Rickinson A (2001) Concluding overview: looking back, looking forward. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:595-604
83. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14:1902-1910
84. Rosa MD, Gottlieb E, Lerner MR, Steitz JA (1981) Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol Cell Biol* 1:785-796
85. Rudiger T, Zettl A, Adam P, Bonzheim I, Geissinger E, Muller-Hermelink HK (2007) [Peripheral NK/T-cell lymphoma]. *Pathologe* 28:55-58
86. Ruf IK, Lackey KA, Warudkar S, Sample JT (2005) Protection from interferon-induced apoptosis by Epstein-Barr virus small RNAs is not mediated by inhibition of PKR. *J Virol* 79:14562-14569
87. Samanta M, Iwakiri D, Kanda T, Imaizumi T, Takada K (2006) EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *EMBO J* 25:4207-4214
88. Samanta M, Iwakiri D, Takada K (2008) Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene* 27:4150-4160
89. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199-208
90. Schwemmle M, Clemens MJ, Hilse K, Pfeifer K, Troster H, Muller WE, Bachmann M (1992) Localization of Epstein-Barr virus-encoded RNAs EBER-1 and EBER-2 in interphase and mitotic Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10292-10296
91. Sen CK, Gordillo GM, Khanna S, Roy S (2009) Micromanaging vascular biology: tiny microRNAs play big band. *J Vasc Res* 46:527-540
92. Sgaramella V, Van de Sande JH, Khorana HG (1970) Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67:1468-1475
93. Sharp TV, Schwemmle M, Jeffrey I, Laing K, Mellor H, Proud CG, Hilse K, Clemens MJ (1993) Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic Acids Res* 21:4483-4490

94. Shein HM, Enders JF, Levinthal JD (1962) Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. II. Cell-virus relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48:1350-1357
95. Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, Pagano JS (1984) Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med* 310:1225-1230
96. Spizzo R, Nicoloso MS, Croce CM, Calin GA (2009) SnapShot: MicroRNAs in Cancer. *Cell* 137:586-586 e581
97. Suzumiya J, Takeshita M, Kimura N, Kikuchi M, Uchida T, Hisano S, Eura Y, Kozuru M, Nomura Y, Tomita K, et al. (1994) Expression of adult and fetal natural killer cell markers in sinonasal lymphomas. *Blood* 83:2255-2260
98. Swaminathan S, Tomkinson B, Kieff E (1991) Recombinant Epstein-Barr virus with small RNA (EBER) genes deleted transforms lymphocytes and replicates in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1546-1550
99. Szczyrba J, Nolte E, Wach S, Kremmer E, Stohr R, Hartmann A, Wieland W, Wullich B, Grasser FA (2011) Downregulation of Sec23A protein by miRNA-375 in prostate carcinoma. *Mol Cancer Res* 9:791-800
100. Takada K, Nanbo A (2001) The role of EBERs in oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 11:461-467
101. Takada K (2012) Role of EBER and BARF1 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* 22:162-165
102. Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB (2005) Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* 123:49-63.
103. Teplova M, Yuan YR, Phan AT, Malinina L, Ilin S, Teplov A, Patel DJ (2006) Structural basis for recognition and sequestration of UUU(OH) 3' termini of nascent RNA polymerase III transcripts by La, a rheumatic disease autoantigen. *Mol Cell* 21:75-85
104. Thompson MP, Kurzrock R (2004) Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* 10:803-821
105. Thorley-Lawson DA (2005) EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol* 116:251-261; quiz 262
106. Tsoukas CD, Lambris JD (1993) Expression of EBV/C3d receptors on T cells: biological significance. *Immunol Today* 14:56-59
107. Xu ZG, Iwatsuki K, Oyama N, Ohtsuka M, Satoh M, Kikuchi S, Akiba H, Kaneko F (2001) The latency pattern of Epstein-Barr virus infection and viral IL-10 expression in cutaneous natural killer/T-cell lymphomas. *Br J Cancer* 84:920-925

108. Yajima M, Kanda T, Takada K (2005) Critical role of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded RNA in efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 79:4298-4307
109. Yang L, Aozasa K, Oshimi K, Takada K (2004) Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA promotes growth of EBV-infected T cells through interleukin-9 induction. *Cancer Res* 64:5332-5337
110. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17:3011-3016
111. Young LS, Rickinson AB (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4:757-768
112. Yu MC, Yuan JM (2002) Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 12:421-429
113. Zeng Y, Cullen BR (2004) Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 32:4776-4785