

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Dr. rer. nat.

Identifikation zellulärer Ziel-Gene KSHV-kodierter miRNAs

vorgelegt von
Georg Malterer
aus
Bernried am Starnberger See

Dissertation eingereicht am 25. Februar 2010

- 1. Berichterstatter: PD. Dr. Bettina Kempkes
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop
- Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Jürgen Haas

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 2010

Es ist nichts so klein und wenig, woran man sich nicht begeistern könnte.

(Friedrich Hölderlin)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2005 bis November 2009 am Max von Pettenkofer Institut in München angefertigt.

Im Verlauf der Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Lars Dölken #, Georg Malterer #, Florian Erhard, Sheila Kothe, Caroline C. Friedel, Guillaume Suffert, Lisa Marcinowski, Natalie Motsch, Stephanie Barth, Michaela Beizinger, Diana Lieber, Susanne M. Bailer, Reinhard Hoffmann, Zsolt Ruzsics, Elisabeth Kremmer, Sébastien Pfeffer, Ralf Zimmer, Ulrich H. Koszinowski, Friedrich Grässer, Gunter Meister, Jürgen Haas „ Systemic Analysis of Viral and Cellular miRNA Targets in Cells Latently Infected with Human γ -Herpesviruses through RISC Immunoprecipitation Assays.” In Review (Cell Host Microbe).

#=equal contribution

Suffert, G. #; Malterer, G. #; Hausser, J.; Lappalainen, L.; Ivacevic, T.; Benes, V.; Gros, F.; Voinnet, O.; Zavolan, M.; Ojala, PM.; Haas, J.; Pfeffer, S. „Kaposi’s sarcoma herpesvirus microRNAs regulate apoptosis by targeting Caspase 3.” In Review (EMBO J.).

#=equal contribution

Iotzova, G.; Robertson, K.; Falk, C.; Ghazal, P.; Malterer, G.; Bailer, S. Haas, J. “Immune escape and null phenotype of persistently KSHV-infected B-Lymphocytes.” Submitted.

Böcker, W.; Rossmann, O.; Docheva, D. Malterer, G.: Mutschler, W.; Schiecker, M. „Quantitative polymerase chain reaction as a reliable method to determine functional lentiviral titer after ex vivo gene transfer in human mesenchymal stem cells.” J Gene Med **9**(7), 585 (2007)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Herpesviren	2
2.2	Das Kaposi Sarkom assoziierte Herpesvirus (KSHV).....	4
2.2.1	<i>Entdeckung von KSHV</i>	4
2.2.2	<i>KSHV assoziierte Erkrankungen</i>	4
2.2.3	<i>Aufbau und Genom von KSHV</i>	7
2.3	Micro-RNAs	10
2.3.1	<i>Die Entdeckung von miRNAs und ihrer Funktion</i>	10
2.3.2	<i>Die Biogenese und Wirkungsweise von miRNAs</i>	12
2.3.3	<i>Methoden der Identifizierung von miRNAs und ihrer Ziel-Gene</i>	14
2.4	Herpesvirale Micro-RNAs	16
2.4.1	<i>miRNAs bei Alphaherpesviren</i>	16
2.4.2	<i>miRNAs bei Betaherpesviren</i>	16
2.4.3	<i>miRNAs bei Gammaherpesviren</i>	17
2.4.3.1	Die miRNAs von EBV	17
2.4.3.2	Die miRNAs von KSHV	18
3	Material und Methoden	21
3.1	Material.....	21
3.1.1	<i>Laborgeräte</i>	21
3.1.2	<i>Software</i>	22
3.1.3	<i>Chemikalien</i>	22
3.1.4	<i>Verbrauchsmaterial</i>	24
3.1.5	<i>Zelllinien</i>	25
3.1.6	<i>Bakterienstämme</i>	25
3.1.7	<i>Plasmide</i>	25
3.1.8	<i>Oligonukleotide (5' → 3')</i>	26
3.1.8.1	DNA-Oligonukleotide	26
3.1.8.2	³² P-markierte DNA-Sonde zum Nachweis von miRK12-3-5p3 im Northern-Blot.....	29
3.1.8.3	RNA-Oligonukleotide als Standard für die miRNA-Quantifizierung.....	29
3.1.8.4	2'-O-Methylierte RNA-Oligonukleotide (AntagomiRs)	30
3.1.9	<i>Molekulargewicht-Standards</i>	30
3.1.10	<i>Fertigsätze (Kits)</i>	30
3.1.11	<i>Antikörper</i>	31
3.1.11.1	Primäre Antikörper	31
3.1.11.2	Sekundäre Antikörper	31
3.1.12	<i>Enzyme</i>	31
3.2	Methoden.....	32
3.2.1	<i>Bakterienkultur</i>	32
3.2.1.1	Kultivierung von Bakterien	32

3.2.1.2	Herstellung kompetenter Bakterien	32
3.2.1.3	Transformation	33
3.2.2	<i>DNA- und RNA-Techniken</i>	33
3.2.2.1	Isolierung von Nukleinsäuren	33
3.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	34
3.2.2.3	DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	34
3.2.2.4	Ligation	34
3.2.2.5	5'-Dephosphorylierungsreaktion	34
3.2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	34
3.2.2.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	35
3.2.2.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
3.2.2.9	Rekombinationsklonierung	37
3.2.2.10	TA-Klonierung von PCR-Produkten	38
3.2.2.11	Zielgerichtete Mutagenese	38
3.2.2.12	Reverse Transkription und Echtzeit-PCR-Quantifizierung (realtime PCR)	38
3.2.2.13	Microarray-Analysen	40
3.2.2.14	Northern Blots zum Nachweis der miRK12-3	40
3.2.3	<i>Statistik: Überrepräsentation von vorhergesagten miRNA-Bindungsstellen</i>	41
3.2.4	<i>Zellkultur und Herstellung der Zelllinien</i>	41
3.2.4.1	Kultivierung und Kryo-Konservierung	41
3.2.4.2	Transfektion	42
3.2.4.3	Herstellung der Vektoren für die Expression von micro-RNAs	42
3.2.4.4	Generierung von Lentiviren für die Transduktion von KSHV-miRNAs	43
3.2.4.5	Transduktion mit Lentiviren und Herstellung stabiler Zelllinien	44
3.2.4.6	Herstellung von induzierbaren miRNA exprimierenden HEK293 Zelllinien	44
3.2.5	<i>Reportergen Analysen</i>	45
3.2.5.1	Herstellung des Luciferase-Reportervektors pScheck2-DEST	45
3.2.5.2	Herstellung von miRK12-4-3p Reportervektoren	45
3.2.5.3	Luciferase-Repressionsanalysen	45
3.2.5.4	2'-O-Methyl-RNA-Derepressionsanalysen	46
3.2.6	<i>Analyse der Apoptose</i>	46
3.2.7	<i>Proteintechniken</i>	47
3.2.7.1	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS)	47
3.2.7.2	Pull Down von RISC-Komplexen und Isolierung von RNA	47
3.2.7.3	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	48
4	Ergebnisse	50
4.1	Herstellung und Charakterisierung von KSHV-miRNA exprimierenden Zelllinien	50
4.1.1	<i>Herstellung stabiler Zelllinien</i>	50
4.1.2	<i>Nachweis von KSHV-kodierten miRNAs</i>	51
4.1.2.1	Northern Blot zum Nachweis von miRNAs	51
4.1.2.2	Bestimmung von miRNAs mittels Realtime-PCR	52
4.2	Etablierung eines Luciferase-Reportersystems	55
4.2.1	<i>Repression des Luciferase-Signals durch KSHV-kodierte miRNAs</i>	56
4.2.2	<i>Derepression des Luciferase-Signals durch 2'-O-Methyl RNAs</i>	57

4.3	Microarray-Analysen identifizieren Caspase 3 als Ziel-Gen für KSHV-kodierte miRNAs	58
4.3.1	<i>Microarray-Analysen der KSHV-miRNA exprimierenden Zelllinien</i>	58
4.3.2	<i>Identifizierung der Caspase 3 als Ziel-Gen für KSHV-kodierte miRNAs</i>	58
4.3.3	<i>Zelluläre Caspase 3 wird durch KSHV-miRNAs reguliert</i>	60
4.3.4	<i>miRNAs von KSHV inhibieren die chemisch induzierte Apoptose</i>	60
4.3.5	<i>KSHV-miRNAs inhibieren die Aktivität der zellulären Caspase 3</i>	63
4.4	Identifizierung von Ziel-Genen von KSHV-miRNAs durch RISC-Immunpräzipitation	64
4.4.1	<i>RISC-Immunpräzipitation aus humanen B-Zellen</i>	64
4.4.2	<i>Anreicherung von miRNAs durch RISC Immunpräzipitation</i>	64
4.4.3	<i>Microarray Analysen der RISC-Immunpräzipitationen</i>	65
4.4.3.1	Identifizierung von Ziel-Genen für zelluläre miRNAs	65
4.4.3.2	Identifizierung von Ziel-Genen für KSHV-kodierte miRNAs	67
4.4.4	<i>Validierung zellulärer KSHV-miRNA-Ziel-Gene durch TaqMan-PCR</i>	68
4.4.5	<i>Luciferase-Assays bestätigen 4 von 6 Kandidaten als KSHV-miRNA-Ziel-Gene</i>	70
4.4.6	<i>miRK12-3-5p reguliert LRRC8D über eine einzelne Bindestelle in der 3'UTR</i>	71
4.4.7	<i>NHP2L1 und GEMIN8 enthalten miRNA-Bindestellen im kodierenden Bereich</i>	73
5	Diskussion	76
5.1	Auswahl und Herstellung der miRNA exprimierenden Zelllinien	76
5.2	Vergleich der Microarray-Analysen aus Gesamt-RNA und RISC-Immunpräzipitationen	76
5.2.1	<i>Microarray-Analysen an Gesamt-RNA</i>	76
5.2.2	<i>Vorteile der RISC-IP-Methode</i>	78
5.3	Vergleich mit anderen Studien	79
5.4	Funktion der KSHV-kodierten miRNAs	80
5.5	miRNA-Bindestellen in kodierenden Bereichen	84
5.6	Ausblick	84
6	Abkürzungen	85
7	Anhang	87
7.1	In B-Zellen exprimierte miRNAs	87
7.2	Kandidaten für eine direkte Regulierung durch KSHV-miRNAs	88
7.2.1	<i>Kandidaten aus den DG75-miRK10/12-Zellen</i>	88
7.2.2	<i>Kandidaten aus den EaHy-miRK10/12-Zellen</i>	88
7.2.3	<i>Kandidaten in beiden Zelllinien</i>	89
7.3	Anreicherung vorhergesagter Bindungsstellen in den Zielgenen zellulärer miRNAs	90
7.4	RISC-IP-Analysen identifizieren Ziel-Gene für KSHV-miRNAs	91
7.5	Vergleich mit anderen Studien (Publizierte Zielgene)	93
7.6	Sequenz von LRRC8D und miRK12-3-5p-Bindestelle	94
7.7	Mutationen in den SEED-Matches der vermeintlichen Zielgene	96
8	Literaturverzeichnis	97
9	Lebenslauf	111

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das Herpesvirus Partikel.....	2
Abb. 2: Kaposisarkom	6
Abb. 3: Schematische Karte des KSHV-Genoms ohne <i>Terminal Repeats</i>	9
Abb. 4: Das aktuelle Modell für die Biogenese und Wirkung von miRNAs	13
Abb. 5: Die miRNAs von KSHV	19
Abb. 6: Klonierung der KSHV-kodierten miRNAs.	43
Abb. 7: GFP-Expression in den transduzierten Zelllinien.	50
Abb. 8: FACS-Analyse der eGFP-transduzierten DG75-Zelllinie nach Selektion mit Blasticidin.....	51
Abb. 9: Nachweis der miRK12-3-5p in den transduzierten Zelllinien durch Northern-Blot.....	52
Abb. 10: Nachweis von miRNAs durch Echtzeit-PCR.	54
Abb. 11: Repression des Luciferase Signals durch miRK12-4-3p	56
Abb. 12: Transfektion von 2'-O-Methyl RNAs	57
Abb. 13: Die Caspase 3 wird durch die miRNAs von KSHV reguliert.....	59
Abb. 14: Die endogene Caspase 3 in HUVEC-Zellen wird durch KSHV miRNAs reguliert	60
Abb. 15: KSHV-miRNAs vermindern die Staurosporin-induzierte Apoptose in HEK293-Zellen.....	61
Abb. 16: KSHV-miRNAs vermindern die Staurosporin-induzierte Apoptose in B-Zellen.....	62
Abb. 17: KSHV-miRNAs inhibieren die Caspase 3/7-Aktivität in HEK293-Zellen	63
Abb. 18: Überrepräsentation vorhergesagter Bindestellen für zelluläre miRNAs	67
Abb. 19: Validierung von Ziel-Genen für KSHV-miRNAs durch TaqMan-PCR.....	69
Abb. 20: Validierung von Ziel-Genen für KSHV-miRNAs durch Dual-Luciferase-Assays	70
Abb. 21: LRR8D ist ein Ziel-Gen für die Micro-RNA miRK12-3-5p.....	72
Abb. 22: Bindestellen für KSHV-kodierte miRNAs in den kodierenden Bereichen von GEMIN8 und NHP2L1	73
Abb. 23: Endogenes GEMIN8 ist in KSHV-miRNA-exprimierenden B-Zellen reduziert.....	74

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Konstruktion der Primer für die „Two Step“ Polymerasekettenreaktion.....	36
Tab. 2: Quantifizierung von KSHV miRNAs durch qPCR.....	55
Tab. 3: Kandidaten für Luciferase Assays.....	59
Tab. 4: Anreicherung von KSHV-kodierten miRNAs durch RISC-Immunpräzipitation.....	65
Tab. 5: Kriterien für KSHV-miRNA-Ziel-Gene	68
Tab. 6: Biologische Funktion der durch RISC-IP-Analysen identifizierten KSHV-miRNA-Zielgene.....	83

1 Zusammenfassung

Herpesviren exprimieren Micro-(mi)RNAs, welche die Expression von zellulären und viralen Genen beeinflussen. Das Genom des Kaposi Sarkom Assoziierten Herpesvirus (KSHV) kodiert ein Cluster von insgesamt 12 miRNAs, welche sowohl während der latenten, als auch während der lytischen Infektion exprimiert werden. Da bisher nur sehr wenige zelluläre Zielgene für KSHV miRNAs bekannt sind, war es das Ziel dieser Studie, Gene zu identifizieren, deren Expression durch virale miRNAs von KSHV beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurden KSHV miRNAs mit Hilfe eines lentiviralen Transduktionssystems in B-Zellen und in Endothelzellen exprimiert. Diese sind beide natürliche Wirtszellen für KSHV. Die dabei entstandenen Zelllinien wurden mit Hilfe von zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen untersucht:

Beim ersten Ansatz wurde das gesamte Expressionsprofil dieser Zellen mit Hilfe von Microarrays analysiert und, nach Filterung durch bioinformatische Methoden, wurden Kandidaten für eine Regulation durch virale miRNAs identifiziert. Das Ergebnis wurde anhand biochemischer Methoden validiert und zwei zelluläre Transkripte als Zielgene bestätigt. In funktionellen Analysen konnte gezeigt werden, dass KSHV miRNAs die Caspase 3 inhibieren und dadurch die Zellen vor Apoptose schützen.

Im zweiten, weitaus effizienteren Ansatz, wurden die sogenannten RISC-Komplexe mit Hilfe von AGO2-spezifischen Antikörpern sowohl aus den KSHV miRNA exprimierenden Zellen als auch aus latent KSHV infizierten Zellen isoliert und die daran gebundenen mRNAs identifiziert. Der RISC-Komplex spielt die entscheidende Rolle bei der miRNA-induzierten Regulation und enthält neben Proteinkomponenten (u.a. Argonauten (AGO)-Proteinen) sowohl die aktiven miRNAs als auch die regulierten mRNAs. Nach Isolierung der gebundenen RNAs konnten mit dieser Methode 72 Gene als Zielgene für KSHV miRNAs identifiziert werden. Viele davon spielen eine wichtige Rolle in unterschiedlichen Prozessen wie Zellzykluskontrolle, in der Apoptose oder der mRNA-Prozessierung. Insgesamt 11 identifizierte Zielgene wurden mit Hilfe von real-time PCRs untersucht und 10 bestätigt. Mittels 3'UTR-Luciferase-Assays wurden 6 davon weiter analysiert und bestätigt. Für die Gene LRRC8D, NHP2L1 und GEMIN8 konnten die zuständigen KSHV miRNAs und die dazugehörigen Bindungsstellen auf dem Transkript identifiziert werden. Bei den letzteren beiden lagen diese interessanterweise nicht wie erwartet in der 3'UTR, sondern in dem kodierenden Bereich.

2 Einleitung

2.1 Herpesviren

Die Familie *Herpesviridae* gehört zu der im Jahr 2009 neu geordneten Ordnung *Herpesvirales* und umfasst ca. 120 unterschiedliche Spezies in Vögeln, Säugetieren und Reptilien⁵⁵. Herpesviren sind große DNA-Viren. Die Familie wird, basierend auf den Homologien ihrer Aminosäuresequenzen und anderer Eigenschaften, weiter in die drei Unterfamilien *Alphaherpesviridae*, *Betaherpesviridae* und *Gammaherpesviridae* unterteilt. Ein typisches Virion eines Herpesvirus besteht aus mehreren strukturellen Komponenten (Abb. 1), welche insgesamt aus mindestens 30 viral kodierten Proteinen aufgebaut sind¹⁴³: Im Inneren befindet sich ein Kernbereich, welcher die virale DNA enthält. Dieser wird von einem 100 – 110 nm großen ikosaedrischen Capsid umgeben, welches aus 12 pentameren und 150 hexameren Capsomeren besteht. Das Capsid wird dabei aus lediglich fünf konservierten Proteinen gebildet¹⁴⁴. Der Kern und das Capsid bilden zusammen das Nukleocapsid. Das Nukleocapsid wird von dem Tegument umgeben. Dies ist eine Art Matrix, welche mindestens 15 unterschiedliche virale Proteine enthält. Es trennt das Nukleocapsid von der Virushülle²²¹. Die Virushülle entsteht bei der zweiten Umhüllung des Capsides durch Knospung in Golgi-abgeleiteten Vesikeln, und enthält mindestens 10 virale (Glyko-)Proteine. Die erste Hülle entsteht bei der Kernausswanderung der Virionen an der inneren Kernmembran und wird durch Fusion mit der äußeren Kernmembran wieder entfernt. Die Glykoproteine in der Virushülle spielen eine wichtige Rolle, indem sie die Interaktion von extrazellulären Virionen mit den entsprechenden zellulären Rezeptoren vermitteln¹⁴³.

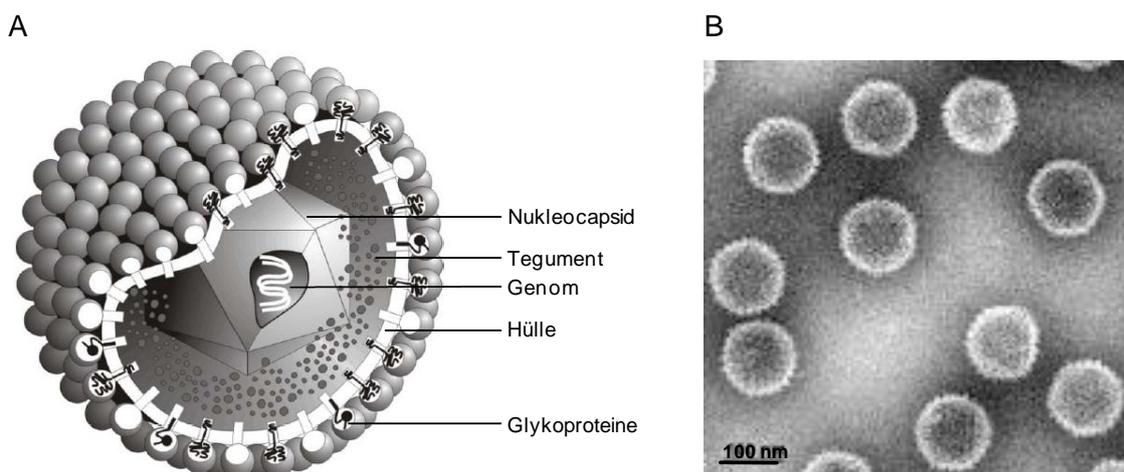


Abb. 1: Das Herpesvirus Partikel

(A) Das schematische Modell eines Herpesviren Partikels und seiner wichtigsten Bestandteile

(B) Herpesvirale Nukleocapside von EHV-1 (*Equines Herpesvirus 1*) ohne Hülle in einer TEM-Aufnahme.

(Abbildungen aus „The big picture book of viruses“, http://www.virology.net/Big_Virology/BVDNAherpes.html).

Das Genom der Herpesviren liegt als lineare, doppelsträngige DNA vor und kann zwischen 130 und 230 Kilobasenpaaren lang sein. Es kodiert je nach Spezies für ca. 70 bis zu 200 unterschiedliche Genprodukte⁷². Bei der Infektion wird das lineare Genom in ein zirkuläres Molekül überführt, welches als Episom im Kernplasma vorliegt. Dort finden die Synthese der viralen DNA und der Zusammenbau der Capside statt. Die Gene können auf einem der beiden DNA-Stränge liegen, können überlappen und werden in den meisten Fällen ausgehend von Polymerase-II-spezifischen Promotoren transkribiert. Die Promotorbereiche verfügen dabei über Bindestellen für zelluläre und virale Transkriptionsfaktoren, welche die Genexpression während des Infektionszyklus regulieren.

Während der lytischen Infektion, begleitet von der Produktion und Freisetzung der Viruspartikel, wird die Zelle normalerweise irreversibel zerstört. Eine herausragende Eigenschaft von Herpesviren ist aber ihre Fähigkeit, eine lebenslange Infektion aufrechtzuerhalten. Das Virus liegt dabei in der sogenannten latenten Form, als extrachromosomales Episom mit stabiler Kopienzahl, im Kernplasma der Zelle vor. Dabei wird es parallel mit dem Zellgenom durch die DNA-Polymerase des Wirtes repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. Die Kopienzahlen variieren dabei zwischen den verschiedenen Virusspezies und zwischen verschiedenen Zelltypen (z.B. bei *Herpes simplex* (HSV): ca. 100 Kopien pro Neuron des Spinalganglions; bei dem *Epstein-Barr-Virus* (EBV): ca. 40 – 100 Kopien pro infizierter B-Zelle; bei dem *Kaposiarkom assoziierte Herpesvirus* (KSHV): ca. 70 Kopien pro Zelle in der Zelllinie BCBL-1 (siehe Abschnitt 2.2.2), und nur ca. 1-2 in Läsionen des Kaposiarkomes^{44,124,149}). Während der latenten Phase werden normalerweise nur wenige virale Proteine exprimiert. Deren Aufgabe besteht in erster Linie darin, die Latenz aufrechtzuerhalten und das Immunsystem des Wirtes zu beeinflussen. Aus der latenten Infektionsphase kann das Virus wieder reaktivieren, d.h. in einen lytischen Zustand zurückkehren. Diese Reaktivierung wird meist durch bestimmte endogene oder exogene Faktoren, wie z.B. Stress, Immunsuppression, UV-Licht oder Hormone hervorgerufen. Während einige Viren in der latenten Phase gelegentlich unauffällig bleiben, erscheinen in der lytischen Phase die für das jeweilige Virus typischen Krankheitsmerkmale.

Bis heute wurden acht humanpathogene Mitglieder (HHV, humane Herpesviren) der Herpesvirenfamilie entdeckt. Diese sind an der Entstehung etlicher Erkrankungen beteiligt: Aus der Unterfamilie α -*Herpesvirales* stammen dabei HHV-1 (*Herpes-simplex Virus 1*, HSV1) und HHV-2 (*Herpes-simplex Virus 2*, HSV2), welche Bläschen an der Lippe (*Herpes labialis*) bzw. in der Genitalregion (*Herpes genitalis*) hervorrufen. Auch HHV-3 (*Varicella-Zoster-Virus*), der Erreger von Windpocken und Gürtelrose, ist ein Mitglied dieser Unterfamilie. α -Herpesviren etablieren ihre Latenz in den sensorischen Ganglien¹⁴⁷. Bei HHV-5 (*Cytomegalievirus*, CMV), HHV-6 und HHV-7 handelt es sich um Vertreter der β -Herpesviren. Diese können die Latenz

in unterschiedlichen Zellen und Geweben etablieren. CMV, der Erreger der Cytomegalie, stellt für gesunde Erwachsene normalerweise keine ernsthafte Bedrohung dar. Bei immunsupprimierten Personen, oder während einer Schwangerschaft kann er sich aber fatal auswirken¹⁷¹. γ -Herpesviren sind durch ihren Lymphtropismus gekennzeichnet. Zu ihnen gehören die humanpathogenen Vertreter HHV-4 (*Epstein-Barr-Virus*, EBV) und HHV-8 (*Kaposisarkom assoziiertes Herpesvirus*, KSHV). Beide können B-Zellen infizieren und induzieren proliferative Erkrankungen¹². Das Kaposisarkom Assoziierte Herpesvirus ist an der Entstehung von mehreren humanen Tumoren beteiligt: Dem Kaposisarkom (KS), dem Primären Effusionslymphom (PEL) und der Multizentrischen Castleman Erkrankung (MCD)^{61,188}. Auch das Epstein-Barr Virus wird mit einer Reihe bösartiger Tumoren beim Menschen in Verbindung gebracht, darunter Burkitt's und Hodgkins Lymphom, NK-/T-Zell und peripheres T-Zell Lymphom und dem Nasopharynxkarzinom. Außerdem ist es verantwortlich für die lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantationen (PTLD)⁵⁶.

2.2 Das Kaposisarkom assoziierte Herpesvirus (KSHV)

2.2.1 Entdeckung von KSHV

Im Jahr 1872 beschrieb Moritz Kaposi, ein ungarischer Dermatologe, den Fall von fünf älteren Männern mit einem „Idiopathischen Multiplen Pigmentsarkom der Haut“. Einer der Patienten starb 15 Monate nach dem ersten Auftreten dieser Hautläsionen an gastro-intestinalen Blutungen¹⁰⁸. Diese Erkrankung wurde einige Jahre später als Kaposisarkom (KS) bezeichnet. Erst im Jahr 1994 entdeckten Yuan Chang und Kollegen das infektiöse Agens, welches für die Entstehung des Kaposisarkoms verantwortlich war: Bei der Untersuchung von Kaposisarkom-Gewebe wurden darin DNA Sequenzen identifiziert, welche Homologien zu zwei onkogenen γ -Herpesviren, dem Epstein-Barr-Virus und Herpesvirus saimirii (HVS), aufwiesen⁴⁶. Inzwischen gilt der Zusammenhang zwischen KSHV und KS als gesichert¹⁸⁷. Die Sequenz des viralen Genoms ist bekannt¹⁸², und die Assoziation mit zwei weiteren lymphoproliferativen Erkrankungen, dem Primären Effusionslymphom (PEL) und der Multizentrischen Castleman Erkrankung (MCD), konnte bestätigt werden^{45,198}.

2.2.2 KSHV assoziierte Erkrankungen

Unter den KSHV assoziierten Tumoren ist das Kaposisarkom das relevanteste. Dabei werden vier klinische Varianten unterschieden: Klassisches, endemisches, iatrogenes/immunsuppressives und epidemisches/AIDS-assoziiertes Kaposisarkom.

Die von Moritz Kaposi beschriebene Erkrankung entspricht dabei der heute als *klassisches Kaposisarkom* bezeichneten Variante. Es handelt sich dabei in erster Linie um eine Hauterkrankung, welche normalerweise ältere Männer aus dem Mittelmeerraum oder Osteuropa betrifft. Sie ist gekennzeichnet durch das Auftreten von rötlich-violett-braunen Flecken, normalerweise an den unteren Extremitäten. Bleiben diese unbehandelt, so können sie sich zu erhobenen, bräunlichen, konfluenten Läsionen auswachsen⁹⁹.

In weiten Teilen Afrikas ist das Kaposisarkom sehr verbreitet. Die HHV-8 Seroprävalenz unter Erwachsenen reicht dort von 22% in Zentralafrika über 48% in Sambia bis hin zu sehr hohen Raten zwischen 76% und 87% im Kongo und in Botswana^{19,68,98}. Man spricht dabei von dem *endemischen afrikanischen Kaposisarkom*. Das Krankheitsbild kann dabei dem klassischen Kaposisarkom ähneln, es sind aber auch aggressive, lymphadenopathische Kaposisarkome bekannt. Diese betreffen vor allem Kinder⁴.

Organempfänger und andere Patienten unter immunsuppressiver Therapie besitzen ein erhöhtes Risiko, ein Kaposisarkom zu entwickeln^{190,194}. Dieses *iatrogene/immunsuppressive Kaposisarkom* ist aggressiver als die klassische Variante und betrifft auch Lymphknoten, Schleimhäute und die inneren Organe. Normalerweise heilt diese Erkrankung nach Absetzen der immunsuppressiven Therapie vollständig aus³¹.

Mit dem Auftreten der AIDS-Epidemien in den 80er Jahren bekam das Kaposisarkom eine völlig neue Bedeutung: Im Juli 1981 wurde zum ersten Mal vom Auftreten von Kaposisarkomen bei homosexuellen Männern mit einer, bis dahin noch nicht als AIDS bezeichneten, akuten Immundefizienz berichtet⁷⁵. Dieses *epidemische bzw. AIDS-assoziiertes Kaposisarkom* ist inzwischen eines der Hauptcharakteristika einer AIDS-Erkrankung geworden. Die Häufigkeit von KS variiert dabei zwischen verschiedenen Gruppen von AIDS-Patienten: 21% - 40% der Männer, welche Sex mit Männern haben, entwickeln ein Kaposisarkom. Im Gegensatz dazu trifft dies lediglich bei 1,6% der pädiatrischen und bei 1% der hämophilen Patienten mit AIDS zu²². Das Kaposisarkom kann bei AIDS-Patienten unter Umständen sehr aggressiv verlaufen. Die klinische Manifestation äußert sich in braun-roten Hautflecken, welche sich in wenigen Tagen über den ganzen Körper ausbreiten können und sich zu subkutanen Knoten und Tumoren ausweiten (Abb. 2 A). Oft sind die Schleimhäute, die Lymphknoten und innere Organe betroffen. Das Kaposisarkom ist daher eine häufige Todesursache bei AIDS Patienten. Anders als bei klassischen Krebserkrankungen, bei welchen die Tumoren durch die klonale Expansion eines einzigen Zelltyps entstehen, ist das Kaposisarkom histologisch komplex^{50,70,101,172}. Es besteht aus unterschiedlichen Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen, infiltrierenden inflammatorischen Zellen, Erythrozyten und typischerweise auch Spindelzellen⁸⁰. Letztere

haben ihren Namen von ihrem spindelförmigen Aussehen. Im späten Stadium bestehen die Läsionen des Kaposisarkoms zum größten Teil aus Aggregaten dieser Zellen (Abb. 2 B).

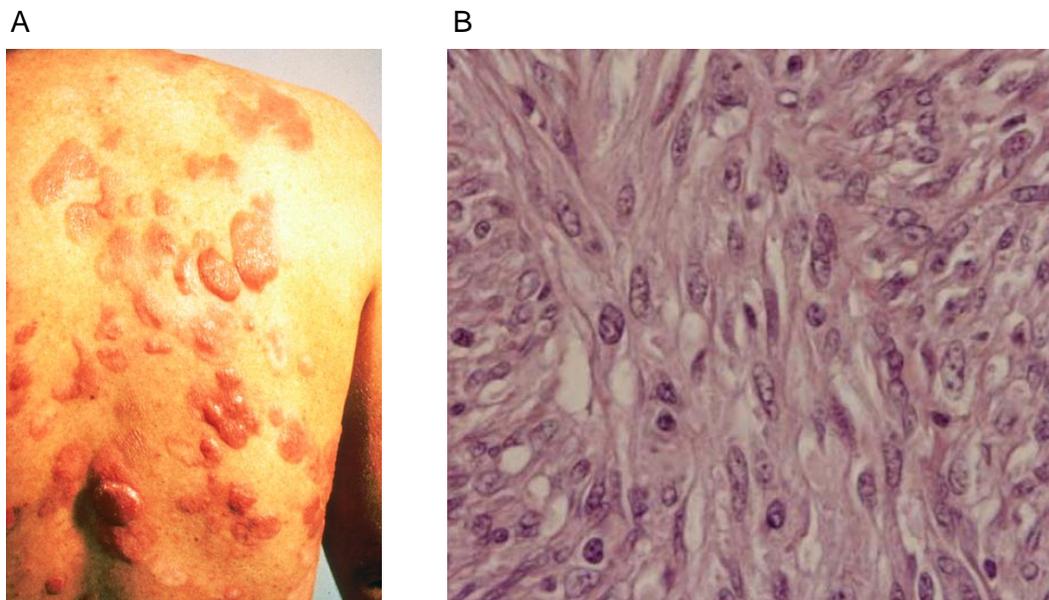


Abb. 2: Kaposisarkom

(A) AIDS-assoziiertes Kaposisarkom. Die Läsionen sind multifokal über den Rücken des Patienten verteilt. (B) Histopathologie eines nodularen Kaposisarkoms: Gut zu erkennen sind die typischen Aggregate von spindelförmigen Zellen.

(Abbildungen: (A): <http://visualsonline.cancer.gov>, Public Domain; (B): Aus Gessain und Duprez, 2005⁸⁰)

Die zelluläre Herkunft der Spindelzellen wurde lange Zeit diskutiert, da die Zellen in elektronenmikroskopischen Studien und histologischen Untersuchungen Eigenschaften von Fibroblasten, Zellen der glatten Muskulatur, Myo-Fibroblasten, Endothelzellen und Monozyten/Makrophagen besitzen⁸⁰. Durch Studien, welche auf Genexpressionsanalysen basierten, vermutet man mittlerweile, dass diese neoplastischen KS-Zellen zu den Lymphatischen Endothelzellen (LECs) eng verwandt sind. KSHV infiziert aber auch die Endothelzellen der Blutgefäße (BECs) *in vitro* und *in vivo* und induziert deren Umdifferenzierung in LECs. Spindelzellen exprimieren daher Marker für LECs, und nur wenige Marker für BECs^{102,210,213}. In frühen Kaposisarkom-Läsionen sind nur ca. 10% aller Spindelzellen und Endothelzellen KSHV positiv, was auf parakrine Effekte hindeutet⁶⁵. Im späten Stadium sind es bereits 90% der Zellen. Die KSHV-Infektion scheint also bei diesen Zellen zu einem Wachstumsvorteil zu führen²⁹.

Schon bald nach der Entdeckung von KSHV in Kaposisarkomen wurde dieses Virus auch bei einem relativ selten vorkommenden Lymphom, dem Primären Effusionslymphom (PEL) bzw. *Body Cavity Based Lymphoma* (BCBL) entdeckt⁴⁴. PEL ist eine besondere Form des Non-

Hodgkin-Lymphoms und kommt häufig bei immungeschwächten AIDS-Patienten vor. PEL tritt normalerweise als Erguss in unterschiedlichen Körperhöhlen, z.B. Pleurahöhle, Herzbeutel oder Bauchhöhle auf. Es wurden aber auch feste PELs in Lymphknoten oder anderen Organen beschrieben³. PEL ist ein aggressives und schnell fortschreitendes Lymphom. Die durchschnittliche Überlebenszeit für Patienten mit PEL beträgt lediglich 2-6 Monate¹¹⁵. Im Gegensatz zu KS stammen die PEL-Zellen von klonal expandierten B-Zellen ab. PEL-Zellen besitzen bereits hypermutierte Immunglobulin-Gene. Daher wird vermutet, dass sie von B-Zellen abstammen, welche die Keimzentrumsreaktion bereits durchlaufen haben⁷⁸. Sie besitzen einen intermediären Phänotyp zwischen Immunoblasten und Plasmazellen^{41,155}. Das B-Zell-spezifische Transkriptionsprogramm ist hochgradig gestört, was zu einem nicht-B, nicht-T Phänotyp führt. So fehlen z.B. B-Zell-typische Oberflächenantigene und die Expression von Immunglobulinen (Ig) an der Zelloberfläche². Die EBV-negative, KSHV-positive Zelllinie BCBL-1¹⁷⁶ ist eine wichtige Modellzelllinie bei der Untersuchung von PEL.

Eine weitere KSHV-assoziierte Erkrankung ist eine Variante der Multizentrischen Castleman Erkrankung (MCD). Diese geht häufig mit einem Kaposisarkom einher. Dieser Umstand bewegte Soulier und Kollegen dazu, in MCD-Geweben nach DNA von KSHV zu suchen. Diese konnten sie dort auch gehäuft nachweisen¹⁹⁸. MCD ist eine aggressive lymphoproliferative Erkrankung, welche durch krankhafte Schwellung der Lymphknoten und Anämie charakterisiert ist. Viele Fälle von MCD werden durch KSHV verursacht (ca. 50% in HIV-negativen Patienten); bei HIV-positiven Patienten trifft dies sogar in fast 100% aller Fälle zu^{43,65}. Die beteiligten B-Zellen sind dabei oft von polyklonaler Herkunft. Es sind aber auch Fälle mit monoklonaler B-Zell Expansion bekannt^{94,169}. Auf histologischer Ebene expandieren dabei die Keimzentren in den betroffenen Lymphknoten, und das Vaskularendothel beginnt zu proliferieren. Bei der Entstehung der typischen Krankheitsbilder spielt vermutlich die Deregulierung von IL-6 eine Rolle. Daran ist möglicherweise auch das von KSHV kodierte IL-6 (vIL-6) beteiligt¹⁶³.

2.2.3 Aufbau und Genom von KSHV

KSHV besitzt die für Herpesviren typische Morphologie. Der Durchmesser der Viruscapside beträgt ca. 100 nm. In ihrem Inneren befindet sich ein elektronendichter Kern, welcher die virale DNA enthält. Einigen Viruspartikeln fehlt dieser Kern¹⁷⁶. Die 3D-Struktur der Capside zeigt ein ikosaedrisches Gitter, bestehend aus 12 Pentonen, 150 Hexonen und 320 Dreiecken. Die Proteine, aus welchen sich die Capside zusammensetzen heißen: Major Capsid Protein (MCP, ORF25), Triplex Monomer Protein (TMP, ORF62), Triplex Dimer Protein (TDP, ORF26) und Small Viral Capsid Antigen (sVCA, ORF65)²¹⁵. Des Weiteren ist eine Protease (ORF17) am Aufbau der Capside beteiligt. Diese stellt das funktionell am stärksten konser-

vierte Protein innerhalb der Familie *Herpesviridae* dar²⁰⁸. Das Capsid ist von einem elektronendichten Tegument umgeben, welches von einer doppelschichtigen Hülle umschlossen wird¹⁸³. Einige Tegumentproteine werden unmittelbar nach dem Eindringen des Virus in das Zellinnere abgegeben, und können dort ihre Funktion entfalten. In der Virushülle sind die viralen Glykoproteine enthalten²²².

Das Genom von KSHV besteht aus ca. 140 kb doppelsträngiger DNA und liegt in den Virus-capsiden in linearer Form vor. Dabei wird es an beiden Enden von zwei 20 bzw. 35 kb großen *Terminal Repeat-Sequenzen (TR)* flankiert. Die einzelnen Wiederholungsabschnitte sind je 801 bp lang und haben einen hohen GC-Gehalt¹⁸². Während der Mitose ist das KSHV-Genom über die *Terminal Repeat-Sequenzen (TR)* an die H1-Histone angeheftet. Diese Bindung wird über das virale latente Protein LANA-1 (*Latency Associated Nuclear Antigen, ORF73*) vermittelt. In den KSHV infizierten Zellen liegt das KSHV Genom als geschlossenes, zirkuläres Episom im Zellkern vor^{7,8}.

Die lytische Replikation des Virusgenoms funktioniert über einen *Rolling Circle Mechanismus*. Im Anschluss daran werden die Konkatemere in einzelne, lineare Virusgenome zerschnitten. Die dabei entstehenden DNA Moleküle werden an beiden Seiten mit den TR-Sequenzen versehen und in die Virionen verpackt¹⁵⁰. Das KSHV-Genom enthält mindestens 89 offene Leserahmen (ORFs, siehe Abb. 3). Gene, welche im Vergleich mit HVS (*Herpesvirus saimirii*, dem Prototyp des γ -Herpesvirus) konserviert sind, werden dabei von links nach rechts mit der vorangestellten Bezeichnung „ORF“ durchnummeriert. Gene, welche spezifisch für KSHV sind, werden mit K1-K15 bezeichnet. Das KSHV-Genom kodiert für eine Reihe von Proteinen, welche an der viralen DNA-Synthese beteiligt sind. Dazu gehören z.B. eine DNA-Polymerase (ORF9), eine Thymidinkinase (ORF21), Ribonukleotid-Reduktasen (ORF60 und ORF61), eine Thymidilat-Synthetase (ORF70) und eine Dihydrofolat-Reduktase (ORF2)¹⁸². KSHV hat im Laufe seiner Evolution eine ganze Reihe zellulärer regulatorischer Gene in sein eigenes Repertoire übernommen, mit welchen es die Zelle beeinflussen kann. Die meisten dieser Gene besitzen keine Introns, und es ist nicht klar, wie die zellulären cDNA-Sequenzen in das Virusgenom gelangt sind¹⁵⁶. Unter diesen Genen befinden sich Homologe des zellulären Komplementrezeptors (ORF4), drei Chemokine aus der CC-Familie (ORF K4, ORF K 4.1, ORF K6), ein IL-6 Homolog (ORF K2), ein BCL-2 Homolog (ORF 16), mehrere Homologe zu Interferon-Regulierenden Faktoren (z.B. ORF K9, ORF K10.5, vIRF-2), ein D-Typ Cyclin (ORF72), ein virales FLICE-Inhibitorisches Protein (v-FLIP, ORF71 oder ORF K13), ein G-Protein gekoppelter Rezeptor aus der CXC-Chemokin-Rezeptor-Familie (ORF74) und ein transmembranes Adhäsionsmolekül (ORF K14)¹⁵⁰.

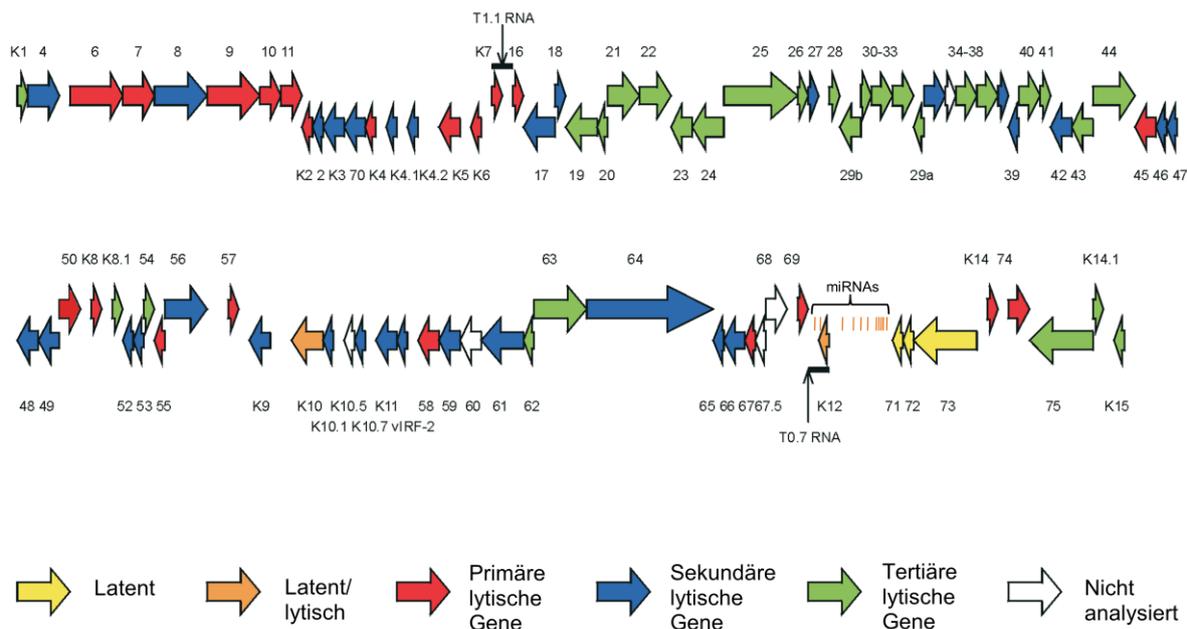


Abb. 3: Schematische Karte des KSHV-Genoms ohne *Terminal Repeats*

Gezeigt sind ca. 136 kb des KSHV-Genoms, in welchem die viralen Proteine codiert sind. Die Orientierung der ORFs ist durch die Pfeilrichtung angegeben. Das Expressionsmuster ist durch die unterschiedlichen Farben verdeutlicht. Im Bereich der latenten Gene sind die 12 bisher bekannten KSHV-kodierten miRNAs gezeigt. Nicht gezeigt sind die *Terminal Repeats* und ein ca. 4 kb großer, unsequenzierter Bereich am rechten Ende. (Abbildung modifiziert nach Jenner et al., 2001¹⁰⁷)

In den meisten KSHV-infizierten Zellen liegt das Virus im latenten Zustand vor. Während dieser Infektionsphase werden bei allen KSHV-assoziierten Erkrankungen lediglich vier Proteine exprimiert. Diese besitzen transformierende bzw. onkogene Wirkung, und durch sie werden das Überleben und die Proliferation der infizierten Zellen verstärkt. Es handelt sich dabei um Kaposin (ORF K12), vFLIP (ORF71/K13), v-Cyclin (ORF72) und LANA (ORF 73), welche nachfolgend kurz beschrieben werden:

Kaposin besitzt onkogenes Potential. Dies wurde durch *Focus Formation Assays* in Zellkultur gezeigt. Die beobachteten morphologischen Änderungen werden dabei durch die Interaktion von Kaposin mit Cytohesin-1 vermittelt¹¹³. Cytohesin-1 ist sowohl ein Guanin-Nukleotid Austauschfaktor für die GTPase ARF als auch ein Regulator der Zelladhäsion. Wenn Kaposin-transformierte Zellen in thymusfreie Mäuse injiziert wurden, so bildeten sich daraus hoch-vaskularisierte, undifferenzierte Sarkome¹⁵².

Bei vFLIP handelt es sich um das virale Homolog des zellulären FLICE-Inhibitorischen Proteins¹⁰⁶. FLIPs interagieren mit dem Adaptorprotein FADD und verhindern die Aktivierung der Protease FLICE durch den CD95 (Fas)-Todesrezeptor. Dadurch werden infizierte Zellen vor Todesrezeptor-vermittelter Apoptose geschützt²⁴.

Das virale Cyclin (v-Cyclin) verhält sich analog zu den zellulären D-Typ-Cyclinen. Es besitzt die Fähigkeit, die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) CDK4 und CDK6 zu aktivieren. Diese können daraufhin das Retinoblastom-Protein (pRb) phosphorylieren, welches dann den Transkriptionsfaktor E2F freisetzt. E2F kann dadurch die Synthese der S-Phase-Gene aktivieren, was bei den Zellen zum Übertritt aus der G1-Phase in die S-Phase führt^{81,133}. Im Gegensatz zu zellulären Cyclin D/CDK6-Komplexen können die Komplexe mit v-Cyclin nicht durch die CDK-Inhibitoren p16^{INK4a}, p21^{CIP1} und p27^{KIP1} inhibiert werden²⁰³.

Das *Latenz-Assoziierte Nukleäre Antigen* (LANA) hat neben seiner wichtigsten Aufgabe, nämlich das virale Episom an die Chromosomen anzuheften und so dessen Segregation bei der Zellteilung zu gewährleisten, eine Reihe weiterer Funktionen: Zum Beispiel kann es mit p53 und MDM2 einen Komplex bilden und dadurch die p53-vermittelte Apoptose verhindern. Durch den MDM2-Inhibitor Nutlin-3a wird dieser Komplex zerstört und die Fähigkeit zur Apoptose wieder hergestellt^{74,186}. LANA kann auch das Retinoblastom-Protein inaktivieren und dadurch den E2F-Transkriptionsfaktor freisetzen, was dazu führt, dass die Zellen in die S-Phase eintreten¹⁷⁰. LANA kann außerdem als Transkriptionsfaktor wirken und eine Reihe unterschiedlicher Promotoren aktivieren, unter anderem den der Telomerase, was die Lebensdauer primärer, LANA-exprimierender HUVEC-Zellen deutlich erhöht^{114,211}.

In PEL- und MCD-Zellen kann zusätzlich während der latenten Phase auch noch die Expression von drei weiteren viralen Proteinen, ORF K10.5, LANA-2 und vIRF3, beobachtet werden¹⁶².

Vor Kurzem wurden in der Latenz-assoziierten Region von KSHV die Gene von zwölf prä-miRNAs entdeckt, die für insgesamt 16 reife miRNAs kodieren (siehe 2.4.3.2)^{39,165,184}. Sie werden alle während der latenten Phase exprimiert. Einige davon werden während der lytischen Phase hochreguliert. Es erscheint interessant, dass während der latenten Phase nur wenige Proteine exprimiert werden, aber eine relativ große Anzahl konservierter miRNAs. Dies lässt eine wichtige Funktion während der latenten Infektionsphase vermuten und bildete die Motivation zum Beginnen dieser Arbeit.

2.3 Micro-RNAs

2.3.1 Die Entdeckung von miRNAs und ihrer Funktion

Die Regulation der Translation bei Eukaryonten durch kleine Antisense-RNAs wurde das erste Mal im Jahr 1993 entdeckt: Für *lin-4*, das erste gefundene Mitglied der miRNA Familie, konnte in *C. elegans* gezeigt werden, dass es durch Regulation des Gens *lin-14* die Larvenentwicklung dieses kleinen Fadenwurmes steuern kann^{128,214}. *Lin-4* ist eine kleine, 21

Nukleotide lange RNA ohne kodierende Funktion. Sie wird in zwei Schritten aus einem Vorläufertranskript herausgeschnitten, welches aufgrund ihrer RNA-Sequenz die Fähigkeit zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur besitzt. Mehrere Jahre lang wurde diese Entdeckung für eine Kuriosität gehalten, welche auf diesen Nematoden beschränkt ist.

Im Jahr 1998 wurde jedoch ein wichtiger biologischer Prozess, die RNA-Interferenz (RNAi), entdeckt⁷³. Diese brachte Andrew Fire und Craig Mello einige Jahre später den Nobelpreis ein. RNAi war dort als molekularer Mechanismus beschrieben worden, bei dem bestimmte RNA-Moleküle die Spaltung von spezifischen mRNAs mit perfekter Sequenz-Komplementarität induzierten. Dabei wurde den sogenannten siRNAs (short interfering RNAs) eine Schlüsselrolle zugesprochen⁹⁵. Bei siRNAs handelt es sich um kleine RNAs, welche in ihrer Struktur den miRNAs ähnlich sind. siRNA- und miRNA-induzierte Prozesse sind sich in weiten Teilen sehr ähnlich. Beide nutzen zum großen Teil die gleichen Biogenese-Wege und die gleichen Effektorproteine^{13,219}.

Im Jahr 2000 wurde eine weitere miRNA, *let-7*, bei *C. elegans* gefunden¹⁷⁴. Das Bemerkenswerte dabei war, dass diese miRNA durch eine Reihe von Organismen, vom Rundwurm bis zum Menschen, evolutionär konserviert war. Weitere miRNAs wurden bald darauf in einer Reihe von Organismen, darunter Fliegen, Würmern und Säugetieren, identifiziert^{13,122,126,127}. Die enorme Bedeutung dieser kleinen RNAs wurde nach und nach erkannt. Bis heute sind tausende von miRNAs und viele ihrer Ziel-Gene bekannt. Durch die Kombination von unterschiedlichen Methoden, wie z.B. molekularen Klonierungen, bioinformatischen Vorhersagen und Sequenzierungen, kommen ständig neue hinzu. Es gibt Schätzungen, dass im menschlichen Genom ca. 1000 miRNAs kodiert sind, welche insgesamt etwa ein Drittel aller menschlichen Gene regulieren^{54,130}. Eine öffentliche Datenbank am britischen Sanger Institut (<http://microrna.sanger.ac.uk>) archiviert alle bekannten miRNAs.

Mittlerweile wurden vielerlei Funktionen dieser kleinen RNAs beschrieben. So spielen miRNAs wichtige Rollen bei der Embryogenese²³. Sie sind beteiligt an der Entwicklung von Organen⁹⁷, Gliedmaßen⁹⁶ und Muskeln¹⁵⁸, sowie der Differenzierung von Stammzellen²³ und T-Zellen¹⁵¹. miRNAs wurden als Onkogene oder Tumorsuppressorgene bei einer Vielzahl von Krebsarten beschrieben²⁶. Des Weiteren besitzen sie wichtige Funktionen im Immunsystem⁴², in der Zellzykluskontrolle³⁵ und in vielen anderen biologischen Stoffwechselwegen. Es ist bekannt, dass unterschiedliche Typen von Krebszellen unterschiedliche miRNA-Expressionsprofile besitzen, welche als diagnostische Marker herangezogen werden können^{27,140}. Da miRNAs an der Entstehung von Erkrankungen beteiligt sind, werden sie auch als Ziele unterschiedlicher therapeutischer Ansätze diskutiert.

Tatsächlich ist es möglich, miRNAs durch komplementäre Antagonisten sequenzspezifisch zu blockieren. Mit dieser Methode gelang es im Mausmodell bereits, eine deregulierte miRNA wieder zu normalisieren^{119,120}.

2.3.2 Die Biogenese und Wirkungsweise von miRNAs

Die Biogenese von miRNAs erfolgt in einer Reihe von Schritten ausgehend von einer primären miRNA (pri-miRNA), welche von der RNA-Polymerase II oder III transkribiert wird (Abb. 4). miRNAs können dabei auf allen Transkripten liegen. Die Mehrzahl (ca. 80%) liegt bei Tieren allerdings einzeln oder gruppiert in den Introns von proteinkodierenden oder nicht-kodierenden Genen³². Nach der Transkription wird die prä-miRNA aus der pri-miRNA geschnitten. Erstere besitzt die für miRNAs typische Haarnadelstruktur¹²⁹ und wird, vermittelt durch Exportin-5, aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Dort wird sie durch das RNase-III-Enzym Dicer, im Komplex mit einem Argonaut-Protein (Ago) und TRBP, zu einer ca. 21 nt langen, doppelsträngigen miRNA prozessiert⁶². An das Ago-Protein gebunden gelangt einer der beiden Stränge schließlich in den RISC (*RNA-induced silencing complex*). Der andere Strang wird abgebaut¹⁸⁹. Beim Menschen sind insgesamt 4 Argonaut-Proteine, Ago 1-4, bekannt. Diese können bereits alleine die Proteinsynthese inhibieren, wenn sie künstlich an die 3'UTRs von mRNAs angeheftet werden¹⁶⁷.

Die Funktion der miRNAs im RISC-Komplex besteht also darin, die Erkennung der Ziel-Gene zu vermitteln. Die miRNAs von Pflanzen und einige tierische miRNAs erkennen die mRNAs dabei durch nahezu vollständige Komplementarität zu ihren Bindestellen, was zu deren Spaltung führt. Die weitaus meisten miRNAs bei Tieren binden die mRNAs der Ziel-Gene allerdings durch unvollständige Basenpaarungen in den untranslatierten Regionen am 3'-Ende (3'UTRs). Hierdurch wird eine posttranskriptionelle Inhibition induziert. Die Nukleotide 2-8 am 5'-Ende der miRNA werden als „Seed-Sequenz“ bezeichnet. Sie sind meistens vollständig komplementär zu der Erkennungsstelle auf der mRNA und vermitteln, zusammen mit etlichen Basenpaarungen am 3'-Ende der miRNA, die Spezifität der Zielgen-Erkennung⁸⁸. Es wurden auch einige Ausnahmen beschrieben, bei welchen andere Arten der Interaktion stattfinden: z.B. miRNA Bindestellen in der kodierenden Sequenz bzw. der 5'UTR oder unvollständige SEED-Paarung^{159,199,204}. Die geringe Größe der miRNAs und die unvollständige Basenpaarung führen dazu, dass eine einzelne miRNA eine Vielzahl von Transkripten regulieren kann¹³⁰. Andersherum kann eine einzelne mRNA von mehreren miRNAs reguliert werden. Aus diesem Grund sind Vorhersagen über miRNA-mRNA-Interaktionen auch extrem schwierig.

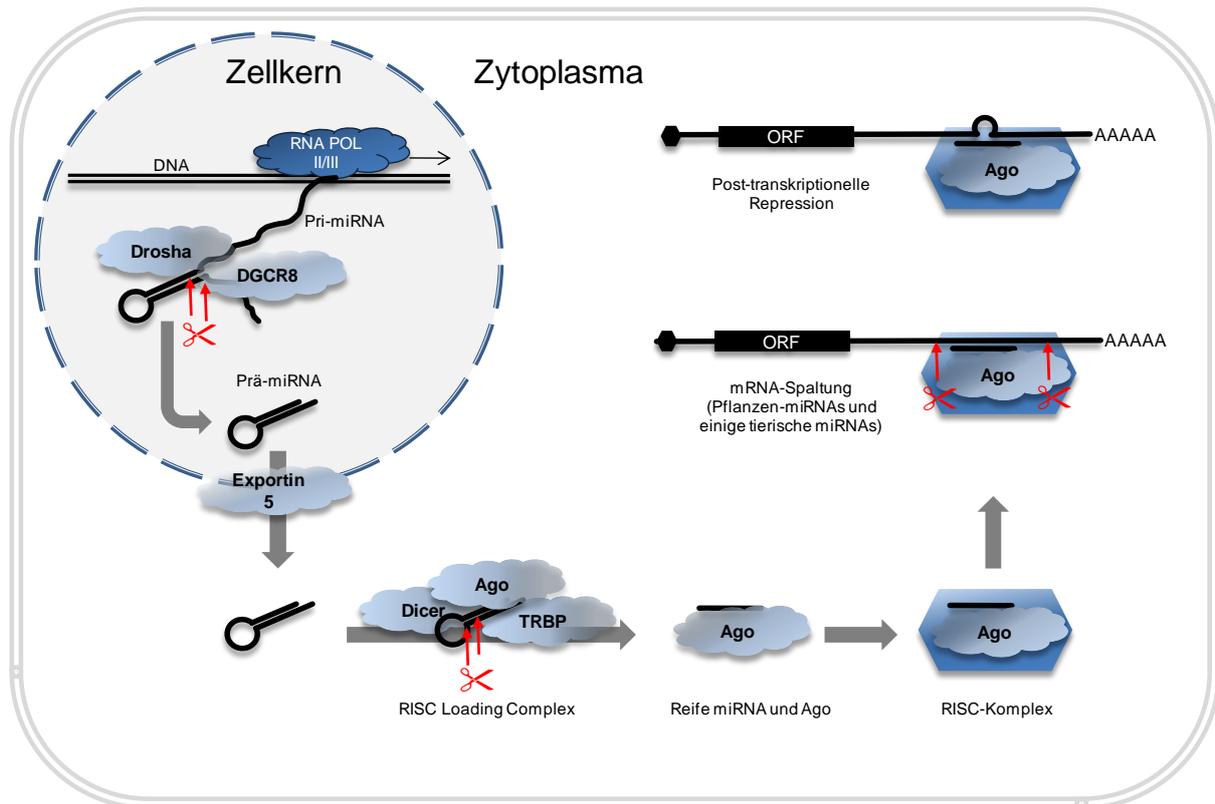


Abb. 4: Das aktuelle Modell für die Biogenese und Wirkung von miRNAs

Das primäre Transkript der miRNA (pri-miRNA) wird von den RNA Polymerasen RNAP II oder RNAP III abgeschrieben. Dann wird sie durch den *Microprocessor complex* prozessiert. Der *Microprocessor complex* ist ein Enzymkomplex im Zellkern und prozessiert das Primärtranskript (pri-miRNA) zu der Haarnadelstruktur (prä-miRNA). Der Enzymkomplex besteht aus dem RNA bindenden Protein DGCR8 (Pasha) und der RNase III Droscha. Pasha bindet die pri-miRNA, um sie für die Prozessierung durch Droscha zu stabilisieren. Die Prä-miRNA wird durch Exportin-5 aktiv in das Zytoplasma transportiert und interagiert dort mit dem *RISC loading complex*. Dieser Komplex enthält Dicer, Ago und TRBP. Er katalysiert die Spaltung der prä-miRNA in die reife miRNA, selektiert den funktionellen miRNA Strang und lädt die reife miRNA auf das AGO-Protein. Der Komplex aus Ago und der miRNA dissoziiert vom *RISC loading complex* und wird zum zentralen Bestandteil des *RISC-Komplexes* (*RISC= RNA induced silencing complex*), welcher die post-transkriptionelle Genrepression von spezifischen Ziel-Genen reguliert.

Der genaue Mechanismus der Genstilllegung durch *RISC-miRNA* Komplexe ist noch Gegenstand intensiver Forschung. Von unterschiedlichen Forschergruppen wurden dabei unterschiedliche Mechanismen aufgezeigt. So wurde z.B. demonstriert, dass Ago-Proteine an die *Cap*-Struktur der mRNAs binden können und somit die Initiation der Translation inhibieren^{105,112,168}.

Des Weiteren scheint die Destabilisierung der mRNAs nach neueren Erkenntnissen eine bemerkenswerte Rolle bei der Regulation zu spielen, auch wenn die Degradation von mRNAs in den ersten Studien zur miRNA-Funktion als von eher zweitrangiger Bedeutung

abgetan worden war. Viele mRNAs werden durch miRNA induzierte Effekte schneller degradiert^{6,135}.

Es wurde auch gezeigt, dass miRNAs die Akkumulation von regulierten mRNAs in sogenannten „*P-Bodies*“ induzieren¹³⁷. *P-Bodies* sind diskrete zelluläre Aggregate, in welchen mRNAs gespeichert oder abgebaut werden können¹⁶¹. Der Abbau ist eng gekoppelt an die Deadenylierung und die Entfernung der Cap-Struktur^{17,195}. Dort akkumulierte mRNAs können unter Umständen auch wieder freigesetzt werden und aktiv sein²⁵.

Bis heute ist allerdings noch nicht klar, wie viel jeder dieser Mechanismen zur miRNA induzierten Genstilllegung beiträgt und wie sie im Einzelnen reguliert werden.

2.3.3 Methoden der Identifizierung von miRNAs und ihrer Ziel-Gene

Die meisten miRNAs wurden ursprünglich durch Klonierung und Sequenzierung entdeckt. Die Informatik wurde dabei meist nur benutzt, um zu testen, ob klonierte Sequenzen eine Haarnadelstruktur ausbilden können¹. Diese Methoden waren allerdings ungeeignet, um miRNAs mit geringer Abundanz oder gewebespezifischer Expression zu entdecken. Im Lauf der Zeit wurden daher etliche bioinformatische Ansätze entwickelt, welche die Entdeckung von mRNAs *in silico* ermöglichen. Die meisten Algorithmen beruhen dabei auf „Maschinellem Lernen“. Das bedeutet, dass bekannte miRNAs benutzt werden, um Computer zu trainieren. Die meisten Haarnadelstrukturen im Genom sind zufälliger Natur. Daher werden als Unterscheidungsmerkmale Eigenschaften wie die Länge der Haarnadeln, die Größe der *Loop*-Strukturen, die thermodynamische Stabilität, Basenpaarungen und die Lage der reifen miRNA innerhalb der prä-miRNAs herangezogen. Auch die Konservierung der miRNA Sequenz zwischen verschiedenen Spezies ist ein wichtiges Kriterium²¹. Die Algorithmen, welche zur Identifizierung von miRNAs entwickelt wurden, stehen meist im Internet frei zur Verfügung. Programme die dabei erfolgreich benutzt werden sind z.B. *miRseeker*¹²³, *MirScan*^{134,136} oder *PalGrade*¹⁰.

Für die Identifizierung bzw. Bestätigung von miRNAs wurden auch eine Reihe experimenteller Methoden entwickelt. Einer der Erfolgreichsten ist dabei die zufällige Klonierung von größenfraktionierter RNA und die anschließende Sequenzierung. Die Hybridisierung mittels Northern Blots und real-time PCR basierte Methoden wurden ebenfalls erfolgreich eingesetzt, um bioinformatisch vorhergesagte miRNAs zu validieren oder um bekannte miRNAs zu detektieren und zu quantifizieren^{193,196}. Auch miRNA-Microarrays stellen inzwischen eine effektive, sensitive und spezifische Möglichkeit dar, um die Expression von miRNAs im Hochdurchsatz zu untersuchen^{10,16,129,135,193}.

Auch für die Zielgene von miRNAs wird versucht, mittels bioinformatischer Algorithmen Vorhersagen zu treffen. Es stellte sich heraus, dass dies bedeutend schwieriger als das bloße „Finden“ von miRNAs ist. Dies hat mehrere Gründe: Zum einen ist für die Wirkung von miRNAs bei Tieren nur eine unvollständige Bindung der miRNA an die mRNA erforderlich, was die Vorhersage von Bindestellen beträchtlich erschwert. Zum anderen gibt es bisher zu wenige bestätigte miRNA-Ziel-Gene, welche für das Training bei maschinellen Lernprozessen herangezogen werden könnten. Außerdem ist die Validierung der Ziel-Gene experimentell aufwendig, und bisher ist keine anwendbare Hochdurchsatz-Methode bekannt¹³¹. Algorithmen, welche zum Zweck der Identifizierung von Ziel-Genen entwickelt wurden, beruhen auf bestimmten Charakteristika der miRNAs und ihrer Bindungsstellen. Das Wichtigste ist dabei nach wie vor die obligatorische Seed-Region, welche ja in den meisten Fällen eine vollständige Komplementarität zu der Bindestelle in der 3'UTR des Ziel-Genes aufweist. Eine Computeranalyse von konservierten miRNA-Bindestellen ergab außerdem, dass die Seed-Region oft von Adenosinen flankiert wird¹³⁰. Durch starke Paarungen am 3'-Ende der miRNA können aber auch nicht-perfekte Seed-Paarungen kompensiert werden, und auch die Ausbildung von G:U-Basenpaarungen ist möglich³⁰. Außerdem muss die Bindung eine ausreichende thermodynamische Stabilität aufweisen. Einige Algorithmen beziehen auch die evolutionäre Konservierung der Bindestellen mit ein. Die Programme, welche der Vorhersage von Ziel-Genen dienen, sind ebenfalls im Internet frei verfügbar. Der Algorithmus *RNAhybrid*¹⁷³ sagt Bindestellen einer kurzen RNA an eine lange RNA voraus und bezieht sich dabei in erster Linie auf die freie Bindungsenergie. Algorithmen wie *MiRanda*⁶⁹ oder *TargetScan*¹³¹ beziehen alle oben genannten Kriterien mit ein. Der Algorithmus *PicTar*^{89,118} bezieht zusätzlich noch ontologische Informationen, z.B. die gleichzeitige Expression von miRNA und Ziel-Gen, in die Vorhersagen mit ein. Ein weiterer entscheidender Faktor ist aber auch die Sekundärstruktur der mRNA: Die Bindestelle und ihre Umgebung muss thermodynamisch ausreichend instabil sein, damit sich dort vorhandene Sekundärstrukturen zu Gunsten der miRNA Bindung auflösen können¹⁷⁹. Der Algorithmus *PITA*¹¹¹ berücksichtigt dies und arbeitet mit $\Delta\Delta G$ -Werten, also den Differenzen der verlorenen freien Energie durch Auflösung der Sekundärstruktur und der durch die miRNA Bindung gewonnenen freien Energie.

Besonders wichtig ist aber die experimentelle Bestätigung von miRNA-mRNA Wechselwirkungen. Die aktuell verwendeten Methoden sind bisher immer noch extrem zeit- und arbeitsintensiv. Bewährt haben sich z.B. Reporteranalysen, bei welchen eine zu untersuchende 3'UTR mit einem Reporter gen fusioniert wird und die Auswirkung der miRNA-Expression untersucht wird. Inhibitoren der miRNAs (AntagomiRs), oder die Verwendung von dsRNAs, welche die Funktion der miRNAs imitieren (*mimics*) ergänzen diese Ansätze. Mutationsstu-

dien (an miRNAs oder ihren Bindungsstellen) untermauern die Befunde. Aber auch klassische genetische Methoden und Techniken, wie z.B. die Herstellung von miRNA-Knockout-Mutanten und phänotypische Untersuchungen, kommen zum Einsatz.

2.4 Herpesvirale Micro-RNAs

Einige Jahre nach der Entdeckung von miRNAs und ihrer Funktion in Pflanzen und Tieren wurden die ersten viralen miRNAs im Jahr 2004¹⁶⁶ in Herpesviren entdeckt. Bis heute wurden mit Hilfe von bioinformatischen Methoden und Klonierungsstrategien über 140 miRNAs in Vertretern aller drei Herpes-Unterfamilien entdeckt⁸⁶. Der Vorteil, den Viren aus der Nutzung kleiner, nicht-kodierender RNAs haben, liegt auf der Hand: Der Zellstoffwechsel kann in einer für das Virus vorteilhaften Weise beeinflusst werden, ohne dass dazu Proteine gebraucht werden, welche die Immunantwort induzieren würden. Bis heute weiß man dennoch relativ wenig über Ziel-Gene für herpesvirale miRNAs, und die Funktion der meisten viralen miRNAs ist immer noch unbekannt⁶⁰. Der folgende Abschnitt soll die Entdeckungen der letzten Jahre auf diesem Gebiet kurz zusammenfassen.

2.4.1 miRNAs bei Alphaherpesviren

Innerhalb der *Alphaherpesviren* wurden miRNAs bei den Herpes-simplex Viren HSV-1 und HSV-2, sowie den für Hühner pathogenen Marek's-Disease Viren (MDV-1 und MDV-2) entdeckt^{36,53,91,217}. Am besten erforscht sind dabei die miRNAs, welche auf dem Latenz-Assoziierten Transkript (LAT) von HSV-1 liegen. Während der Latenz wird vom HSV-1-Genom hauptsächlich diese RNA transkribiert, welche zwar mit einer *Cap*-Struktur und einem Poly-A Schwanz versehen wird aber augenscheinlich für kein virales Protein kodiert²⁰¹. Für zwei der LAT-kodierten miRNAs wurde gezeigt, dass sie die viralen Proteine ICP0 bzw. ICP4 regulieren, welche als Aktivatoren der lytischen Infektionsphase beschrieben wurden^{37,93}. Daher wurde postuliert, dass diese miRNAs an der Aufrechterhaltung der latenten Phase in HSV-1 infizierten Neuronen beteiligt ist²⁰⁷. Trotz intensiver Suche konnten bisher keine miRNAs bei dem Varicella-Zoster Virus (VZV) entdeckt werden²⁰⁷.

2.4.2 miRNAs bei Betaherpesviren

Durch mehrere Studien wurden miRNAs auch bei den *Betaherpesviren* entdeckt. So wurden bei dem humanen Cytomegalievirus (HCMV) bisher 11 miRNAs entdeckt. Im Gegensatz zu den anderen Herpesviren, bei welchen die miRNAs oft als Cluster in Latenz-assoziierten Regionen gruppiert sind, sind die miRNAs bei HCMV über das ganze Genom verteilt und liegen dabei auf den komplementären Strängen von bekannten ORFs, in Bereichen

zwischen den Genen oder in einem Intron^{64,83,165}. Von den HCMV-kodierten miRNAs ist die Funktion von bisher erst einer, miR-UL112, experimentell untersucht. Interessanterweise kann diese miRNA sowohl zelluläre als auch virale Transkripte regulieren. So wird z.B. das zelluläre Gen MICB (*Major Histocompatibility Complex Class I Related Chain B*), ein NK-Zell-Ligand welcher an der Immunantwort auf virale Infektionen beteiligt ist, durch diese miRNA herunterreguliert¹⁹⁹. Erstaunlicherweise ist diese Interaktion funktionell konserviert, denn dieses Gen wird auch von miRNAs von EBV und KSHV reguliert, obwohl die beteiligten miRNAs untereinander keinerlei Sequenzhomologien zeigen¹⁵⁴. Ein virales Ziel-Gen für miR-UL112 ist z.B. der Transaktivator IE72. Diese Interaktion erleichtert dem Virus möglicherweise den Übergang von der lytischen in die latente Phase^{84,153}.

Der murine Cytomegalievirus (MCMV) dient seit langem als wichtiges Tiermodell für HCMV-Infektion und Pathogenese. Durch zwei Studien wurde auch hier eine ganze Reihe viruskodierter miRNAs (bisher 18 Prä-miRNAs) entdeckt^{34,59}. Die miRNAs von HCMV und MCMV sind bezüglich ihrer Sequenzen und ihrer Lage im Genom nicht konserviert. Auch sie sind über das Genom verstreut. MCMV-miRNAs werden entweder einzeln oder in kleinen Gruppen (bis zu vier prä-miRNAs) transkribiert.

Weitere als die hier genannten Funktionen der miRNAs sind noch völlig unbekannt. Bemerkenswert ist der Befund, dass virale miRNAs sowohl bei HCMV als auch bei MCMV bereits kurze Zeit nach der Infektion einen großen Anteil an der Gesamtheit aller miRNAs in der Zelle haben können. Bis zu 61% aller miRNAs in MCMV infizierten NIH-3T3-Fibroblasten 72 Stunden nach der Infektion sind viraler Herkunft⁵⁹.

In den Betaherpesviren HHV-6 und HHV-7 wurden bisher noch keine miRNAs vorhergesagt oder entdeckt¹⁶⁶.

2.4.3 miRNAs bei Gammaherpesviren

2.4.3.1 Die miRNAs von EBV

Die ersten viralen miRNAs wurden in *Gammaherpesviren* entdeckt: Durch Klonierung und anschließende Sequenzierung kleiner RNAs aus einer latent EBV-infizierten B-Zelllinie wurden zunächst insgesamt 5 prä-miRNAs entdeckt, welche in zwei genomischen Regionen gruppiert sind¹⁶⁶: Eine Gruppe befindet sich in der mRNA des *BHRF1*-Genes und umfasst die miRNAs miR-BHRF1-1, -2 und -3. Die anderen, miR-BART1 und miR-BART2, befinden sich in einer intronischen Region der *BART*-Transkriptfamilie. Ihre Funktion ist bisher weitestgehend unbekannt¹⁴⁵. Für die erste Studie wurde der Virusstamm B95-8 verwendet, welcher eine große Deletion im Bereich der BART-Transkripte enthält. Spätere Studien entdeckten weitere 18 prä-miRNAs, miR-BART3 – miR-BART20, welche aufgrund dieser Deletion im

Stamm B95-8 fehlen^{40,90}. Durch *Deep Sequencing*-Strategien wurden später nochmals zwei weitere miRNAs, miR-BART21 und miR-BART22, in Isolaten eines Nasopharyngealen Karzinoms (NPC) gefunden²²³. Wie auch bei anderen Viren ist bei EBV nur wenig über die Funktion der miRNAs bekannt. Es wurde aber gezeigt, dass drei der miRNAs das virale latente Membranprotein (LMP1) herunterregulieren¹³⁹. LMP1 ist ein onkogenes Protein, welches bei den meisten EBV-assoziierten Erkrankungen exprimiert wird und durch Interaktion mit einer Vielzahl von zellulären Signalwegen die Transformation der Zellen induziert²¹⁸. Da die Überexpression von LMP1 Apoptose induzieren kann, postulierten die Autoren einen Mechanismus, bei dem die miRNAs einer Überexpression von LMP1 entgegenwirken, wodurch die Apoptose der infizierten Zellen verhindert wird. In der Tat führte die Expression der entsprechenden miRNAs in LMP1-exprimierenden Zellen zur Abschwächung von Cisplatin-induzierter Apoptose. Des Weiteren wird die virale DNA-Polymerase BALF5, zu deren 3'UTR die miRNA miR-BART2 eine vollständig komplementäre Sequenz besitzt, durch eben diese miRNA reguliert¹⁵. Weitere Transkripte, für die eine Regulation durch EBV-miRNAs gezeigt werden konnte, sind das auf T-Zellen wirkende Chemokin CXCL-11, der p53-regulierte Apoptose-Modulator (PUMA), und der Immunligand MICB. In allen drei Fällen wurde eine immunmodulatorische Wirkung postuliert^{49,154,216}.

2.4.3.2 Die miRNAs von KSHV

Bald nach den miRNAs in EBV wurden auch bei KSHV miRNAs entdeckt. Diese wurden nahezu gleichzeitig von drei unabhängigen Gruppen beschrieben^{39,165,184}. Eine der miRNAs, miRK12-12 wurde später als die anderen entdeckt⁹⁰. Insgesamt wurden bei KSHV bisher 12 prä-miRNAs gefunden, welche alle in der Latenz-Assoziierten Region liegen (Abb. 5 A). Von diesen liegen 10 in einem intronischen Bereich zwischen den Leserahmen ORF K12 (Kaposin) und ORF 71 (vFLIP). Zwei weitere liegen in der kodierenden Region des Kaposin-Gens, beziehungsweise in dessen 3'-UTR. Zwei unabhängige Studien identifizierten drei überlappende Transkripte, welche ausgehend von zwei latenten Promotoren transkribiert werden. Diese enthalten alle sowohl die 10 intronischen, als auch die zwei weiteren miRNAs. Ein vierter, lytischer Promotor befindet sich vor dem Kaposin-Gen. Das Transkript, welches ausgehend von diesem Promotor abgeschrieben wird, beinhaltet neben den unterschiedlichen Kaposin Varianten die zwei assoziierten miRNAs^{38,164}. Die reifen miRNAs können dabei entweder vom 5'-Strang, vom 3'-Strang oder von beiden Strängen des Stammes der Haarnadelstruktur prozessiert werden (Abb. 5 B). Die miRNAs werden dabei mit „miRK12“, gefolgt von einer fortlaufenden Nummer, bezeichnet (z.B. miRK12-1). Wenn zwischen muren miRNAs aus dem 3'- bzw. 5'-Strang unterschieden werden muss, so geschieht dies durch die nachgestellten Bezeichnungen „5p“ bzw. „3p“.

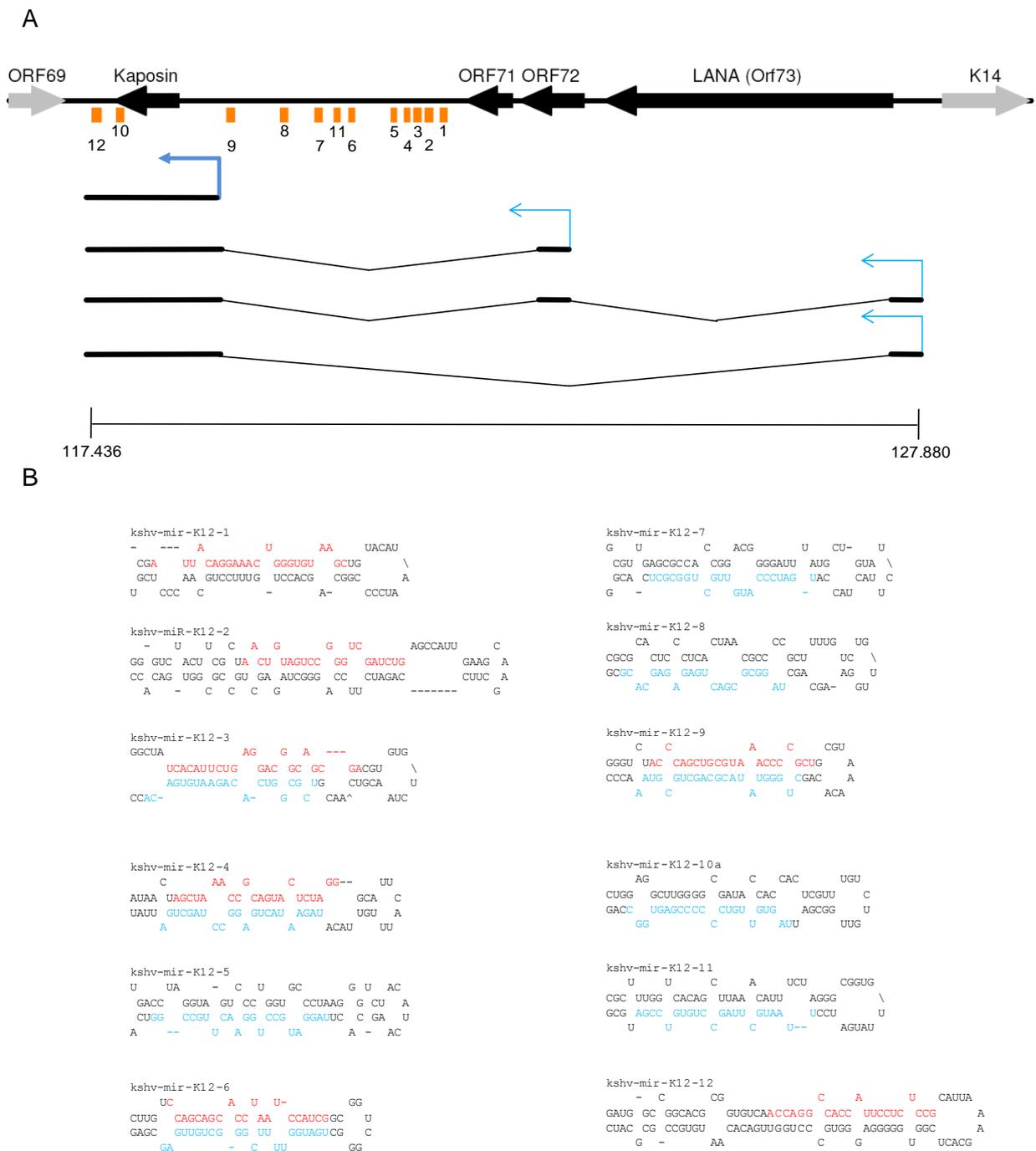


Abb. 5: Die miRNAs von KSHV

(A) Die Latenz assoziierte Region von KSHV (schwarz) enthält neben den latenten Genen auch eine Reihe von miRNAs (orange). Die intronischen und zwei weitere miRNAs können dabei von insgesamt drei Transkripten abstammen, welche von zwei latenten Promotoren (hellblaue Pfeile) abgeschrieben werden. Vor dem Kaposin-Gen befindet sich ein weiterer, lytischer Promotor (dunkelblau), welcher neben Kaposin auch die zwei nicht-intronischen miRNAs reguliert (Abbildung modifiziert nach Cai und Cullen, 2006³⁸).

(B) Die prä-miRNAs von KSHV falten sich, wie alle miRNAs, zu Haarnadelstrukturen. Reife miRNAs, welche aus dem 5'-Strang des Stammes prozessiert werden, sind rot, die aus dem 3' Strang sind blau gezeichnet. Die Haarnadelstrukturen wurden mit Hilfe des M-Fold Algorithmus berechnet²²⁵.

Insgesamt sind bisher 16 reife miRNAs von KSHV bekannt⁸⁵⁻⁸⁷. Die meisten dieser miRNAs sind zwischen den verschiedenen Virusstämmen hochkonserviert^{142,202}. Als die vorliegende Studie begonnen wurde, war noch nichts über die Funktion dieser kleinen RNAs bei KSHV bekannt. In der Zwischenzeit konnten einige Gene identifiziert werden, welche durch sie reguliert werden.

Die meisten wurden dabei aufgrund der Tatsache gefunden, dass eine der miRNAs, miRK12-11, ortholog zu der zellulären miRNA hsa-miR-155 ist^{82,197}. Diese miRNA ist in verschiedenen B-Zelllymphomen hochreguliert, und die transgene Expression in Mäusen induziert B-Zell-Tumore⁵². Die Expression von hsa-miR-155 wird in aktivierten B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen induziert^{92,157,209}. Ferner ist bekannt, dass hsa-miR-155 *knock-out*-Mäuse gestörte Immunfunktionen besitzen^{180,205}. Interessanterweise ist diese miRNA auch in EBV-infizierten Zellen hochreguliert⁷⁹. Gottwein et al. identifizierten in ihrer Studie 12 Gene, die sowohl von hsa-miR-155 als auch von KSHV-miRK12-11 reguliert werden. Darunter befanden sich etliche mit bekannten Funktionen, z.B. ein Regulator des B-Zellrezeptors (SLA), Faktoren des angeborenen Immunsystems (PIK3CA, IKBKE, FOS), pro-apoptische Gene (BIRC4BP/XAF1), ein Zellzyklus-Regulator (FOS) und Transkriptionsfaktoren (BACH1, FOS, HIVEP2).

Einige weitere Studien fanden Thrombospondin (THBS1)¹⁸⁵, BCLAF1²²⁴, LDOC und PHF17¹⁹⁷, deren Genprodukte sich verschiedenen Funktionen bei der Tumorentstehung zuordnen lassen, sowie einige weitere. An diesem Punkt ist noch völlig unklar, welche der regulatorischen Ereignisse, die durch KSHV-miRNAs induziert werden, dem Virus einen Replikationsvorteil bieten. Einzelne Effekte, welche durch miRNAs vermittelt werden, sind oft nicht besonders stark. Aber in der Summe, durch die Regulation einer Vielzahl von Genen, erfüllen die miRNAs möglicherweise wichtige Funktionen. Ziel dieser Studie ist es also in erster Linie, möglichst viele Ziel-Gene für KSHV-kodierte miRNAs zu finden. Diese sollen, falls möglich, einer biologischen Rolle zugeordnet werden, um der Aufklärung der Funktion dieser faszinierenden kleinen RNAs ein Stück näher zu kommen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

ABI Prism 7000, Applied Biosystems	Foster City, USA
BD FACS Canto, Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
Bioanalyzer, Agilent	Böblingen, Deutschland
Cryo 1°C Einfriercontainer, Nalgene Nunc	Wiesbaden, Deutschland
Dampfsterilisator, LTA 1x2x3, Zirbus Technology	Bad Grund/Harz, Deutschland
Eppendorf Tischzentrifuge, Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Filmentwickler Optimax, TR MS Laborgeräte	Heidelberg, Deutschland
FLA300 Fluoi-mager, Fujifilm	Düsseldorf, Deutschland
Geldokumentationssystem, Eagle Eye and RH2, Herolab	Wiesloch, Deutschland
Kammern für Agarosegelelektrophorese, Peqlab	Erlangen, Deutschland
Kühlschrank (4°C), Liebherr	Ochsenhausen, Deutschland
Kühlzentrifuge 6K15, Sigma	München, Deutschland
Light Cycler 2.0, Roche	Mannheim, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte, Janke & Kunkel	Staufen, Deutschland
Mikrowelle, AEG	Berlin, Deutschland
Multi-Plattenlesegerät Fluostar, BMG-Labtech	Offenburg, Deutschland
Nasstransfersystem, Protean II, Biorad	Mannheim, Deutschland
Neubauer Zählkammer, Paul Marienfeld	Lauda, Deutschland
PCR Thermocycler, Applied Biosystems	Foster City, USA
pH Meter, WTW	Weilheim, Deutschland
Pipettierhilfe, Accu-Jet Pro, Brand	Wertheim, Deutschland
Pipette, Pipetman 2, 10, 20, 200, 1000µl, Gilson	Middleton, USA
Polyacrylamidgelelektrophorese System, Protean II, Biorad	Mannheim, Deutschland
Real Time PCR-Gerät, Light Cycler II	Roche, Mannheim
Spannungsquelle für die Elektrophorese, Biorad	Mannheim, Deutschland
Spektrophotometer, Biochrom	Berlin, Deutschland
Sterilbank, BDK	Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Tiefkühlschrank (-20°) Liebherr	Ochsenhausen, Deutschland
Tiefkühltruhe (-80°C) Forma Scientific, Inc., Marietta	Ohio, USA
UV-Transilluminator, LKB	Freiburg, Deutschland
UV-VIS Photometer, Nanodrop ND-1000, Peqlab	Erlangen, Deutschland
Vortex Mixer, IKA Labortechnik	Staufen, Deutschland
Wasserbad, Julabo	Selbach, Deutschland

Zellkulturinkubatoren Forma Scientific, Inc., Marietta
Zentrifuge Heraeus Multifuge 1, Thermo Scientific

Ohio, USA
Bonn, Deutschland

3.1.2 Software

AbiPrism7000 Software, Applied Biosystems
AIDA Image Analysis software v.4
AssayDesignCenter (www.universalprobelibrary.com), Roche
BD FACS Diva, Becton Dickinson
DAVID Datenbank, Frederick Institute, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>
Light Cyclers 2.0 Software, Roche
PITA microRNA prediction tool¹¹¹ <http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/>
QuikChange® Primer Design Program
(<http://www.stratagene.com/qcprimerdesign>), Stratagene

Foster City, USA
Straubenhardt, Deutschland
Mannheim, Deutschland
Franklin Lakes, USA
Frederick, USA
Mannheim, Deutschland
Rehovot, Israel
La Jolla, USA

3.1.3 Chemikalien

1,4-Dithiothreitol, Roth
10x Oligo Annealing Buffer, Invitrogen
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), Merck
6xDNA Ladepuffer, Fermentas
Agarose für Elektrophorese, Invitrogen
Ammoniumperoxodisulfat, Roth
Ampicillin Natriumsalz, Roth
Annexin-V-Allophycocyanin, BD Biosciences
Aqua ad injectabilia, Braun
Bacto Agar, Gibco BRL
Bacto Trypton, Gibco BRL
Bacto Yeast Extract, Gibco BRL
Blasticidin S HCl, Invitrogen
Bovines Serum Albumin (BSA), Roth
Bromphenolblau, Sigma Aldrich
Chloramphenicol, Sigma Aldrich
Chloroform, Roth
Coomassie Brilliant Blau R-250, Merck
D(+)-Glucose-Monohydrat, Roth
DC Protein Assay, BioRad
Dialysiertes fötales Kälberserum, Sigma-Aldrich

Karlsruhe, Deutschland
Karlsruhe, Deutschland
Darmstadt, Deutschland
St. Leon-Rot, Deutschland
Karlsruhe, Deutschland
Karlsruhe, Deutschland
Karlsruhe, Deutschland
Le Pont-de-Claix, Frankreich
Melsungen, Deutschland
Karlsruhe, Deutschland
Karlsruhe, Deutschland
Karlsruhe, Deutschland
Karlsruhe, Deutschland
Karlsruhe, Deutschland
München, Deutschland
München, Deutschland
Karlsruhe, Deutschland
Darmstadt, Deutschland
Karlsruhe, Deutschland
Mannheim, Deutschland
München, Deutschland

Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck	Darmstadt, Deutschland
DMSO, Roth	Karlsruhe, Deutschland
dNTP-Mix, Roche	Mannheim, Deutschland
Dodecylsulfat Natriumsalz, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung, Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
ECL Chemilumineszenz System, Pierce	Rockford, USA
Essigsäure, Eisessig, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, absolute (EtOH), Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromidlösung (10mg/ml), Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Roth	Karlsruhe, Deutschland
FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I, Roche	Mannheim, Deutschland
Fötale Kälberserum, Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd (37%), Roth	Karlsruhe, Deutschland
Formamid, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Fötale Kälberserum, Gibco-BRL	Karlsruhe, Deutschland
FuGene6 Transfektionsreagenz, Roche	Mannheim, Deutschland
Gelladepuffer, 10x, Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
Geneticin (G418), Roth	Karlsruhe, Deutschland
Glycerol, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Glycin, Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Hexanukleotid Random-Primer-Mix, Promega	Madison, USA
Isopropanol, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Kalium Hydroxid Plätzchen, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin Sulfat, Roth	Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin-Lösung (200mM), Gibco-BRL	Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamin 2000, Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Methanol, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver, Roth	Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid, Serva	Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat, Sigma Aldrich	München, Deutschland
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA, 100x), Gibco-BRL	Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x), Gibco-BRL	Karlsruhe, Deutschland
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Propidiumjodid, Sigma-Aldrich	München, Deutschland

Protease Inhibitor, Complete, Mini, EDTA-frei, Roche	Mannheim, Deutschland
Qiazol, Qiagen	Hilden, Deutschland
Rotiphoresegel 30 (37,5:1) Acrylamid/Bisacrylamid, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Staurosporin, Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Tris-HCL, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Trizol-Reagenz, Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
ULTRAhyb-Oligo Solution, Ambion	Austin, USA
Trypanblau, Färbelösung 0,4%, Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Trypsin-EDTA (10x), Gibco-BRL	Karlsruhe, Deutschland
Tween 20, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Universal Probe Library, TaqMan Sonden, Roche	Mannheim, Deutschland
ViraPower lentiviral Packaging-Mix, Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturmedium D-MEM, Gibco-BRL	Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturmedium „Endothelial cell growth medium“, Promocell	Heidelberg, Deutschland
Zellkulturmedium Opti-MEM, Gibco-BRL	Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturmedium RPMI1640, Gibco-BRL	Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich	München, Deutschland

3.1.4 Verbrauchsmaterial

Cryo-Röhrchen, Nunc	Langensfeld, Deutschland
Falcon-Röhrchen, Nunc	Langensfeld, Deutschland
GeneChip Human Gene 1.0 ST Arrays, Affymetrix	Santa Clara, USA
Glaswaren (Flaschen, Kolben u.s.w.) Duran, Schott	Mainz, Deutschland
Nitrocellulose, Schleicher und Schüll	Dassel, Deutschland
Petrischalen, Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
Pierce-Zentrifugenröhrchen, Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Pipettenspitzen, Fa. Peske GmbH & Co.KG	Aindlingen, Deutschland
Protein-G-Sepharose-Kügelchen, GE Healthcare	München, Deutschland
Reaktionsgefäße, Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Röntgenfilm SuperRX, Fujifilm	Düsseldorf, Deutschland
Serologische Pipetten, Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sterilfiler 0,22 und 0,45 µm, Millipore	Billerica, USA
Zellkulturschalen- / flaschen, Nunc	Langensfeld, Deutschland

3.1.5 Zelllinien

Name	Gewebe	Herkunft
BCBL-1	Primäres Effusions Lymphom ¹⁷⁵	Don Ganem, UCSF, San Francisco, USA
DG-75	B-Lymphocyte, Burkitt's Lymphom Zelllinie ^{20,77}	ATCC (CRL-2625)
EaHy 926	Fusion von HUVEC mit der humanen Lungenkarzinomzelllinie A594 ⁶⁶	Päivi Ojala, Helsinki, Finnland
Flp-In T-REx-293	HEK-293 Zelle (Tet-Repressor und FRT-site)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HEK 293	Humane Embryonale Nierenzelle	ATCC (CRL-1573)
HEK 293FT	Modifizierte HEK-293 Zelle (T-Antigen)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HUVEC, primär	Primäre, Humane Nabelschnurendothelzellen	Promocell, Heidelberg, Deutschland

3.1.6 Bakterienstämme

DB3.1	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DH10B	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DH5 α	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
XL1-blue	Stratagene, La Jolla, USA

3.1.7 Plasmide

pGEM-T	Promega, Madison, USA
pDONR207	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pLP1	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pLP2	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pLP/VSVG	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pLENTI6/V5-DEST	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pLENTI6/V5-eGFP	Oliver Rossmann, Klinikum Innenstadt, LMU, München, Deutschland
pLENTI6/V5-10/12	Diese Studie
pLENTI6/V5-1-12	Diese Studie
pSIcheck2	Promega, Madison, USA
pSIcheck2-DEST	Diese Studie
pcDNA5/FRT/TO	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pcDNA miRK10/12	Diese Studie
pcDNA	Diese Studie
pcDNA miRK3(5p)	Diese Studie
pcDNA miRK4	Diese Studie

3.1.8 Oligonukleotide (5' → 3')

3.1.8.1 DNA-Oligonukleotide

Externe Primer für Gateway-Klonierungen

Name	Sequenz
attB1 external for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
attB2 external rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

Primer für die Klonierung der miRNAs

Name	Sequenz
KSHV miRK for	AAAAAGCAGGCTCCGCCTGATCA ATAAACAGGAAGCGGGTTGGAC
KSHV miRK rev	AGAAAGCTGGGTGATATC TGCCTTATTTGGTAATGCTTCCGG
miRK10+12for	TTTTTCCGGATAGAGGCTTAACGGTGTGTTG
miRK10+12rev	TTTTTCCGGAGTGTGTTTTGCCATGGTA
KSHVmiRK(BamHI)for	ATATGGATCCGAATGCGTGCTTCTGTTTGA
KSHVmiRK(XhoI)rev	ATATCTCGAGTTTACCGAAACCACCCAGAG
K12-3 forward	ATATCTCGAGCCGCCGCAAGCTTCCAGATCTTCCAG
K12-3 reverse	ATATGGGCCCAAATGAATGCCCTAGAGTACTG
K12-4 forward	ATATCTCGAGCCGCCTCGCGGTCACAGAATGTGACAC
K12-4 reverse	ATATGGGCCCCCTTAGGGCACCAGGGACTAC
miR 206 for	ATATCTCGAGATCCCAGTGATCTTCTCGCTAAG
miR 206 rev	ATATGGGCCCATTCAGAGGCTCTTGCTTCCTTG

Primer für die Klonierung der 3'UTRs und der KSHV miRNA-Bindestellen für Luciferase-Assays

Name	Sequenz
CASP3_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTGAAATGGTTGGTTGGTGGTTTT
CASP3_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTTGTACAAAATTGTCACATAGAAACACA
CCNT2_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTTGCCAATCACGAGTACAGTACAA
CCNT2_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTACAACCTGGCTGCCCTTTAAT
CDC7_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTTTCATTTAATGTTTACTGTTATGAGG
CDC7_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTTGAATATACAAATTCAAGAGCATTCA
CDK5RAP1_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCT CTGCATATTGCTGACCTGAGAG
CDK5RAP1_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGT GTTTAGGTAAATTTAATGACTG
CENPF_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTAGGCACTTTGTGTGTCAGTACC
CENPF_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTGAGAAAACGAAGGCGACTATTT
DUSP6_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTAGACCCACACCCCTCCTTGCT
DUSP6_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTACATTCTTATAATAAATCCAGCTCT
EXOC6_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCT CAGCACATGTAGACCTCACATG
EXOC6_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGT CATCACAAAATCCAGAGATGTAC
FANCG_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTCTGCCACGTTTTGAAGAGCTT
FANCG_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTTATGAAATTTTACTCGACAACAGAAAA
GEMIN8_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCT CTGAAGTTCTGAGCTCAGGGCAC

GEMIN8_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGT GAGTATTTACCGTGTAGCCAGC
GEMIN8_4-3p BS_attBfor	AAAAAGCAGGCT CACCCATTTGGACTTTCACAATC
GEMIN8_4-3p BS_attBrev	AGAAAGCTGGGT CAAGCCATTGCTTGATGATAATG
IRF2_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTTCTGACTCTCCGCGGTGGTTG
IRF2_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTTCCACAGGAAAATCTGATTGCTAG
LRRC8D_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCT CCCTTTGCAAATGGGATTTAAAC
LRRC8D_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGT CATTTTCTATTTATTGGCAACCC
MCM4_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTAGCCTTGTGAGCAAGGAAGGC
MCM4_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTAAAGAAAGGCTCTAGCCCTTTACCA
MDM2_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTTATATAACCCCTAGGAATTTAGACAACC
MDM2_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTCGGTGGCTCATGCCTGTAAT
NEK3_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTTGCCCTGAGGAAATGTTCCCTGAG
NEK3_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTCATAATGTGAATAATATCATACG
NHP2L1_3 BS_attBfor	AAAAAGCAGGCT CGAGCCACTGGAGATCATTCTG
NHP2L1_3 BS_attBrev	AGAAAGCTGGGT CTTCTTTGATGGTGACAGAACAG
NHP2L1_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCT GTCCATTGAAAGGCTCTTAGTC
NHP2L1_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGT CACATGAACTAGCACTCTCCTC
RAD51AP1_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTGTGTGGTACAGGAGGAATGTTTG
RAD51AP1_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTTTTTTTGATAGACAAATGCTCACT
RBBP5_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTACCTTCGAAGTTCTTCATTCTTTC
RBBP5_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTCAGTGTACAGTGCAGAGGACTGG
SPP1_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTTCTCTGAGGTCAATTTAAAGG
SPP1_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTGTTTTTATTAATTGCTGGACAACCG
TBK1_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTATAGAAGTTTAAAGAAAAGTTTCCGTTTG
TBK1_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTTTTTTTCCATGAAATAGTAAGCAGAA
TNFAIP1_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTCCAGACCCTCAGGGAGTCAGG
TNFAIP1_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTGAAATTAGTGTGTTGCTTCCATC
TTK_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCTTTGCAGTTATTCGTAATGTCAAA
TTK_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGTGTGTCATTTTAGCCACAAAACCT
ZNF684_3'UTR_attBfor	AAAAAGCAGGCT CCCAGAAGTCAAATCTTATTG
ZNF684_3'UTR_attBrev	AGAAAGCTGGGT CTGTAATACAGAATACAAGTGCC

Primer für die Mutagenese der KSHV-miRNA-Bindestellen

Name	Sequenz
LRRC8D_mut5SEED_for	ATTGTTTGTAACTTGGATGCTGCCGCTACTCACCAGTTACAAATTGCTTGCCTGCTAAAGTAAATG
LRRC8D_mut5SEED_rev	CATTTACTTTAGCAGGCAAGCAATTTGTAAGTGGTGTAGTAGCGGCAGCATCCAAGTTACAAACAAT
GEMIN8_mut5SEED_for	ACATCGAAAGCTACCAGGCCTTGAACAGACATCCGGTATATGCAAGATACTGG
GEMIN8_mut5SEED_rev	CCAGTATCTTGCATATACCGGATGTCTGTTCCAAGGCCTGGTAGCTTTTCGATGT

NHP2L1_mut5SEED_for CCGCTGCTGTGTGAAGACAAGCACAGCCCCTACGTGTTTGTGCGCTCC
 NHP2L1_mut5SEED_rev GGAGCGCACAAACACGTAGGGGCTGTGCTTGTCTTCACACAGCAGCGG

Primer für die Klonierung der miRK4-Bindestellen (Positivkontrollen für Luciferase Assays)

Name	Sequenz
miRK4(imperfect)sensor_attBfor	AAAAAGCAGGCTATCGCCACCTTGTTAAGCCTCAGCTAGGCCTCAGTATTCTAATTAG ACCTACGCACTCCAG
miRK4(imperfect)sensor_attBrev	AGAAAGCTGGGTCTGGAGTGCCTAGGTCTAATTAGAATACTGAGGCCTAGCTGAGGCT TAAACAAGGTGGCGAT
miRK4(perfect)sensor_attBfor	AAAAAGCAGGCTATCGCCACCTTGTTAAGCCTCAGCTAGGCCAGTGTATTCTAATTAG ACCTACGCACTCCAG
miRK4(perfect)sensor_attBrev	AGAAAGCTGGGTCTGGAGTGCCTAGGTCTAATTAGAATACTGGCCTAGCTGAGGCT TAAACAAGGTGGCGAT

Primer für die Quantifizierung der miRNAs

Name	Sequenz
Poly(t)adpt	GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGTTTTTTTTTTTTTVN
AdptRev	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
RTHs5.8Sfor	GCCTGTCTGAGCGTCGCTT
RTmiRK1for	ATTACAGGAAACTGGGTGTAAGC
RTmiRK2for	AACTG AGTCCGGGTCGATCTG
RTmiRK3(5p)for	TCACATTCTGAGGACGGCAGCGA
RTmiRK4(5p)for	AGCTAAACCGCAGTACTCTAG
RTmiRK4(3p)for	TAGAATACTGAGGCCTAGCTGA
RTmiRK5for	TAGGATGCCTGGAACCTGCCGGAA
RTmiRK6(5p)for	CCAGCAGCACCTAATCCATCGG
RTmiRK6(3p)for	TGATGGTTTTTCGGGCTGTTGAG
RTmiRK7for	TGATCCCATGTTGCTGGCGCT
RTmiRK8(5p)for	CTCCCTCACTAACGCCCGCAA
RTmiRK8(3p)for	CTAGGCGGACTGAGAGAG
RTmiRK9(5p)for	CCAGCTGCGTAAACCCCGCTA
RTmiRK9(3p)for	CTGGGTATACGCAGCTGCGTA
RTmiRK10for	TAGTGTTGTCCCCCGAGTGGC
RTmiRK11for	TTAATGCTTAGCCTGTGTCCGA

Primer für die Quantifizierung von Transkripten (TaqMan)

Name	Sequenz	TaqMan Sonde (Roche Mouse Library)
RT_NHP2L1_(for)	TAAGCAGCTTCGAAAGGAG	mouse #34
RT_NHP2L1_(rev)	GCCATCACGATGAACTCAGA	
RT_GEMIN8_(for)	CCCTCTGTCTCTCCAAGGAA	mouse #19
RT_GEMIN8_(rev)	AAGCCTTCAGGGACTGAACA	
RT_CDK5RAP1_(for)	CATGTGTCCCAGTCCAGAGA	mouse #13
RT_CDK5RAP1_(rev)	AGCCTGGAGCTGAAATCCTT	
RT_LRRC8D_(for)	GCAGGTCGAGGGGAAGAG	mouse #42
RT_LRRC8D_(rev)	CACGGCGACAGGAGACTT	
RT_RNF8_(for)	CATCCTCCACCTCAACCT	mouse #27
RT_RNF8_(rev)	AGCTGGGTGTGATGGCATA	

RT_GTSE1_(for)	CGCTCCATGAGCAGTGAC	mouse #14
RT_GTSE1_(rev)	AAGCAGGAACTACCAACAGGAG	
RT_EXOC6_(for)	GAACATGGCCCTCTCAAAGA	mouse #43
RT_EXOC6_(rev)	TCAGGATCAGTGCAATAGGATG	
RT_FBXO7_(for)	AGAAAAGAATCCCCGAAAGG	mouse #33
RT_FBXO7_(rev)	TGGAATGGTGTGAGTTGACG	
RT_RABL5 (for)	TCTGACTGCAGAGGAAGTGTTTC	mouse #4
RT_RABL5 (rev)	AGTGAACGCCCTGTGTGAC	
RT_ZNF684_(for)	CCTCAAGGTAGAGCAAGGACA	mouse #19
RT_ZNF684_(rev)	TCATCAACAAGTGGGTAGTCAGA	
RT_CCNF (for)	CGAAAACCTCAGGGACTACGC	mouse #19
RT_CCNF (rev)	TTTGACACAGGCTTTGGCTA	
RT_CCNE1_(for)	TGCAAGCCTCGGATTATTG	mouse #90
RT_CCNE1_(rev)	TTGCCCAGCTCAGTACAGG	
RT_H19_(for)	TTACTTCCTCCACGGAGTCG	mouse #32
RT_H19_(rev)	GCTGGGTAGCACCATTCTT	
RT_HPRTfor	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	mouse #54
RT_HPRTrev	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	

Sequenzierprimer

Name	Sequenz
DONR-F	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC
T7-for	TAATACGACTCACTATAGGG

3.1.8.2 ³²P-markierte DNA-Sonde zum Nachweis von miRK12-3-5p3 im Northern-Blot

Name	Sequenz
P32miRK3(5p)	TCGCTGCCGTCCTCAGAATGTGA

3.1.8.3 RNA-Oligonukleotide als Standard für die miRNA-Quantifizierung

Name	Sequenz
miRK12-2	AACUGUAGUCCGGGUCGAUCUG
miRK12-3-5p	UCACAUUCUGAGGACGGCAGCGA
miRK12-4-3p	UAGAAUACUGAGGCCUAGCUGA
miRK12-5	UAGGAUGCCUGGAACUUGCCGG
miRK12-6-5p	CCAGCAGCACCUAAUCCAUCGG
miRK12-6-3p	UGAUGGUUUUCGGGUCGUUGAG

3.1.8.4 2'-O-Methylierte RNA-Oligonukleotide (AntagomiRs)

Name	Sequenz
anti-ebv-miR-BHRF1-1	AACUCCGGGGCUGAUCAGGUUA
anti-kshv-miR-K12-3	UCGCUGCCGUCCUCAGAAUGUGA
anti-kshv-miR-K12-4-3p	UCAGCUAGGCCUCAGUAUUCUA

3.1.9 Molekulargewicht-Standards

DNA Molecular Weight Marker VIII, Roche	Mannheim, Deutschland
Gene Ruler 1kb DNA ladder, Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler 100bp, Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
See Blue Plus2 prestained protein ladder, Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Benchmark prestained protein ladder, Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland

3.1.10 Fertigsätze (Kits)

Affymetrix Whole-Transcript (WT) Sense Target Labeling Protocol	Santa Clara, USA
BCA Protein Assay, Pierce	Rockford, USA
Caspase 3/7 Assay Kit, Promega	Madison, USA
Dual-Luciferase reporter assay system, Promega	Madison, USA
ECL western blotting detection system, Amersham	Freiburg, Deutschland
Expand long template PCR system, Roche	Mannheim, Deutschland
FlexiGene DNA Kit, Qiagen	Hilden, Deutschland
miRNeasy Kit, Qiagen	Hilden, Deutschland
pGEM-T vector system, Promega	Madison, USA
Poly A tailing Kit, Ambion	Austin, USA
PureYield plasmid midiprep system, Promega	Madison, USA
Qiagen MinElute gel extraction kit, Qiagen	Hilden, Deutschland
Qiagen MinElute PCR purification kit, Qiagen	Hilden, Deutschland
QIAprep Spin miniprep kit, Qiagen	Hilden, Deutschland
QIAquick Nucleotide Removal Kit, Qiagen	Hilden, Deutschland
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene	La Jolla, USA

3.1.11 Antikörper

3.1.11.1 Primäre Antikörper

hAGO2, 11A9	Elisabeth Kremmer, GSF München
BrdU, B684M, Abcam	Cambridge, UK
Actin, C4, Abcam	Cambridge, UK
NHP2L1, A01, Abnova	Heidelberg, Deutschland
GEMIN8, FL242, Santa Cruz Biotechnology inc.	Heidelberg, Deutschland
Caspase 3 MAB4603, Millipore	Billerica, USA
γ -Tubulin, GTU-88, Sigma-Aldrich	München, Deutschland

3.1.11.2 Sekundäre Antikörper

Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L), Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L), Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Goat anti-mouse IgG (H+L) HRP-Konjugat (AP308P), Millipore	Billerica, USA

3.1.12 Enzyme

GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega	Madison, USA
DNAseI, Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
SuperScriptII reverse Transkriptase, Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Intestinale Kälberphosphatase (CIP), NEB	Beverly, USA
Restriktionsendonukleasen, NEB	Beverly, USA
T4 DNA Ligase, Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
BP-Clonase Mix, Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
LR-Clonase Mix, Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K, Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Expand Long DNA Polymerase, Roche	Mannheim, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Bakterienkultur

3.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

E. coli-Bakterien wurden in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und, im Fall von Flüssigkulturen, unter konstantem Schütteln.

LB medium (1 l):	10 g Bacto Trypton 5 g Bacto Hefeextrakt 5 g NaCl
LB Agar:	LB Medium mit 1,5% Agar-Agar
Selektionsmedium:	LB Medium mit Antibiotikum, je nach Resistenz: 100 µg/ml Ampicillin 50 µg/ml Kanamycin 15 µg/ml Gentamicin 35 µg/ml Chloramphenicol

3.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurde ein Einzelklon in 20 ml TYM-Medium transferiert und solange bei 37°C inkubiert, bis die Suspension eine optische Dichte OD_{600nm} von 0,8 erreicht hatte. Anschließend wurde die Bakterienkultur mit 100 ml verdünnt und wiederum bei einer Temperatur von 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,8 inkubiert. Diese Kultur wurde wiederum auf 500 ml mit TYM-Medium aufgefüllt und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde auf Eiswasser abgekühlt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C oder auf Eis. Die Bakterien wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 2500 x g zentrifugiert (Sigma 6K15). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 25 ml eiskaltem TfB I resuspendiert. Nach 45 min auf Eis wurden die Bakterien für 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 25 ml eiskaltem TfB II resuspendiert. Aliquots von 400 µl wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

TYM:	10 mM MgSO ₄ 100 mM NaCl 20 g/l Bacto Trypton 5 g/l Bacto Hefeextrakt
------	---

TfB I:	30 mM KAc 50 mM MnCl ₂ 100 mM KCl 10 mM CaCl 15 % (v/v) Glycerol
TfB II:	10 mM MOPS pH7,0 75 mM CaCl 10 mM Kcl 15 % Glycerol

3.2.1.3 Transformation

5 µl einer Ligations- bzw. Rekombinationsreaktion wurden zu 100 µl kompetenten Bakterien gegeben, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock ausgesetzt (1 min, 37°C) und in 1 ml LB-Medium für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend auf Agarplatten mit einem passenden Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.2 DNA- und RNA-Techniken

3.2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien

Plasmid-DNA wurde, je nach benötigter Menge, entweder mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) oder mit dem PureYield Plasmid Midiprep Kit (Promega) isoliert. Beide basieren auf der alkalischen Lyse der Bakterien, gefolgt von Bindung, Reinigung und Elution der DNA an einer Silica-Matrix. Die Präparation erfolgte jeweils nach der Anleitung des Herstellers.

3.2.2.1.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Zellkultur

Gesamt-DNA aus kultivierten Zellen wurde mit den FlexiGene DNA Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dabei werden die Zellen lysiert, Zellkerne und Mitochondrien durch Zentrifugation gereinigt und durch Protease-Verdau von Proteinverunreinigungen befreit, und die DNA mit Hilfe von Alkohol gefällt.

3.2.2.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkultur

RNA aus kultivierten Zellen wurde mittels Trizol-Reagenz (Invitrogen) aufgereinigt. Die Methode basiert auf der „*single step*“ nach Chomczynski und Sacchi⁴⁸. Dabei wurden die Zellen zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trizol pro 1×10^7 Zellen lysiert (5 min RT). Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben, die Proben 15 s vorsichtig geschüttelt und für weitere 2-3 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden 10 min bei $12.000 \times g$

(4°C) zentrifugiert. Die obere (wässrige) Phase wurde abgenommen und die RNA mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztes Volumen Trizol gefällt. Die RNA wurde anschließend 10 min inkubiert, durch Zentrifugation (15 min, 12.000 x g, 4°C) sedimentiert, mit 80% EtOH gewaschen, getrocknet und in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die Proben wurden bei -80°C gelagert. Die Qualität der RNA wurde mit Hilfe des Bioanalyzers (Agilent) bestimmt.

3.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Nukleinsäuren wurde durch Messung der optischen Dichte in einem Nanodrop ND1000 Spektrophotometer (PepLab) bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die $OD_{260\text{ nm}}$ verwendet (1 $OD_{260\text{ nm}}$ entspricht dabei 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA). Die Reinheit wurde mit Hilfe des Verhältnisses $OD_{260}:OD_{280}$ bestimmt. Ein Wert von 1,6-2,0 war ein Hinweis auf nicht vorhandene bzw. schwache Kontamination mit Protein oder Phenol.

3.2.2.3 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Spaltungen von DNA mittels Restriktionsenzymen wurden nach den Herstellerempfehlungen durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurden 1,5 µg DNA bei der empfohlenen Temperatur mit 20 U Enzym für 2 h verdaut. Die Restriktionsspaltung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.2.2.4 Ligation

Falls nicht anders angegeben, wurden für die Ligation 50 ng Vektor und die 3-fache molare Menge eines DNA-Fragmentes eingesetzt. Die Reaktion wurde in 1 x Reaktionspuffer (Fermentas) mit 5 U T4 DNA Ligase (Fermentas) durchgeführt. Nach Inkubation für mehrere Stunden wurde die Ligationsreaktion entweder in kompetente Bakterien transformiert oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2.2.5 5'-Dephosphorylierungsreaktion

Die 5'-Dephosphorylierungsreaktion von linearisierten Plasmiden wurde mit intestinaler Kälberphosphatase (CIP) durchgeführt. Dazu wurden 50 U CIP und 1,5 µg DNA gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die anschließende Reinigung des Vektors erfolgte mit Hilfe des QIAquick Nucleotide Removal Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben.

3.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von DNA-Fragmenten und Plasmiden wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese in 1 x TAE durchgeführt. Die Agarosekonzentration lag dabei, je nach Anwendung, zwischen

0,6% und 2,0%. Den Gelen wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,25 µg/ml zugegeben. Den DNA-Proben wurden vor dem Lauf 0,17 Volumen DNA-Ladepuffer zugegeben. Die Ethidiumbromid-gefärbte DNA wurde anschließend mit UV Licht ($\lambda=302$ nm) sichtbar gemacht.

20 x TAE	800 mM Tris
	400 mM NaAc
	40 mM EDTA
	pH7,8 (mit Essigsäure)

3.2.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Qiagen MinElute gel extraction kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.2.8.1 Standard-PCR für die Amplifikation von DNA-Abschnitten

Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs) von großen (> 3000 bp) Templates wurden mit dem Expand Long Template PCR System (Roche) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieses System wurde auch benutzt, wenn eine Korrekturleseaktivität der verwendeten Polymerase benötigt wurde. Für alle anderen PCR-Reaktionen wurde die GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) verwendet. Falls nicht anders angegeben wurde dabei das folgende PCR-Programm verwendet:

94°C	5 min	} 25x
94°C	1 min	
55°C	1 min	
72°C *	variabel**	
72°C *	10°min	

* 68°C bei Verwendung von Expand Long-Polymerase

** 1 Minute pro 1000 Basenpaare

Falls nicht anderes angegeben, wurde der folgende PCR Reaktionsansatz verwendet:

PCR-Reaktionsansatz:	5 µl PCR-Puffer (Promega)
	1 µl 10 mM dNTPs
	1 µl 10 µM forward Primer
	1 µl 10 µM reverse Primer
	1 µl GoTaq Flexi DNA Polymerase
	21 µl H ₂ O
	20 µl Template in H ₂ O (insgesamt ca. 200 ng)

3.2.2.8.2 „Two Step PCR“ für die Amplifikation von DNA für Rekombinationsklonierung

Die PCR von DNA-Abschnitten für die Rekombinationsklonierung mittels des Gateway-Systems (Invitrogen) wurde in zwei Schritten durchgeführt. Die Sequenzen der in der ersten (internal) und der zweiten (external) PCR verwendeten Oligonukleotide überschneiden sich dabei um 12 bp. Durch diese Primer wurden die Rekombinationssequenzen (*attB*-sites) angefügt. Für diese PCRs wurde das Expand Long Template PCR System (Roche) verwendet.

Tab. 1: Konstruktion der Primer für die „Two Step“ Polymerasekettenreaktion

Die grau hinterlegten Basenpaare repräsentieren die Sequenz der *att*-Stellen. Die Sequenzspezifischen Nukleotide für die Amplifikation bestimmter Gene ist durch X dargestellt.

attB1 internal for	AAAAAGCAGGCTXXXXXXXXXXXXXXXXXX
attB2 internal rev	AGAAAGCTGGGTXXXXXXXXXXXXXXXXXX
attB1 external for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT
attB2 external rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

Falls nicht anders angegeben, wurden die folgenden PCR-Programme verwendet:

1. PCR:		2. PCR:	
94°C	5 min	94°C	5 min
94°C	1 min	94°C	1 min
55°C	1 min	53°C	1 min
68°C	variabel*	68°C	variabel**
68°C	10°min	68°C	10°min
} 13x		} 13x	

* 1 Minute pro 1000 Basenpaare

Falls nicht anders angegeben, wurden die folgenden PCR-Ansätze verwendet. Als Template für die Amplifikation von KSHV-Sequenzen wurde DNA aus der BCBL-1 Zelllinie verwendet. Als Template für die Amplifikation von 3'UTRs diente DNA aus HEK 293-Zellen.

1. PCR-Reaktionsansatz:	5 µl PCR-Puffer 2 (Roche)
	1 µl 10 mM dNTPs
	1 µl 10 µM attB1 internal for
	1 µl 10 µM attB2 internal rev
	1 µl Expand Long DNA Polymerase (Roche)
	21 µl H ₂ O
	20 µl Template in H ₂ O (insgesamt ca. 200 ng)

2. PCR-Reaktionsansatz:	5 µl PCR-Puffer 2 (Roche)
	1 µl 10 mM dNTPs
	1 µl 10 µM attB1 external for
	1 µl 10 µM attB2 external rev
	1 µl Expand Long DNA Polymerase (Roche)
	31 µl H ₂ O
	10 µl aus dem 1. PCR-Reaktionsansatz

3.2.2.9 Rekombinationsklonierung

DNA-Fragmente, welche entsprechende Rekombinationssequenzen des Phagen λ (*attachment sites*, *att sites*) enthielten, konnten mittels Rekombinationsklonierung mit Hilfe des Gateway-Systems (Invitrogen) kloniert werden. Dies erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde ein DNA-Abschnitt (z.B. PCR-Produkt), welcher *attB*-sites enthielt, mittels „BP-Reaktion“ in den *attP*-sites tragenden Vektor pDONR207 rekombiniert. Dabei entstanden flankierende *attL*-sites. Der entstehende Vektor wurde nach der Invitrogen-Nomenklatur „pENTER“ genannt. Mit dem Reaktionsprodukt wurden *E.coli*-Bakterien transformiert, aus welchen das Plasmid anschließend isoliert wurde. Die Klonierungen wurden nach diesem Schritt durch Sequenzierung mit dem Primer DONR-F überprüft. Im zweiten Schritt wurde der DNA-Abschnitt mittels „LR-Reaktion“ in einen *attR*-sites tragenden Zielvektor (Destinationsvektor, DEST) rekombiniert. Mit dem Produkt wurden wiederum *E.coli* transformiert.

Die Ansätze für beide Reaktionen wurden bei Raumtemperatur für mindestens 1 h inkubiert. Anschließend wurden die jeweiligen Clonasen mit 2 µl Proteinase K bei 37°C für 10 min inaktiviert. Von den Reaktionsprodukten wurden jeweils 5 µl für die Transformation von kompetenten *E. coli* (DH5 α) verwendet. Im Einzelnen setzten sich die Reaktionen wie unten stehend zusammen.

BP-Reaktionsansatz:	200 ng PCR-Produkt
	150 ng pDONR207
	2 µl BP-Reaktionspuffer (Invitrogen)
	1 µl BP-Clonase Mix (Invitrogen)
	Ad 10 µl H ₂ O
LR-Reaktionsansatz:	150 ng pENTER
	150 ng pDEST (Zielvektor)
	2 µl LR-Reaktionspuffer (Invitrogen)
	1 µl LR-Clonase Mix (Invitrogen)
	Ad 10 µl H ₂ O

3.2.2.10 TA-Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, welche mittels *Taq*-Polymerase amplifiziert worden waren, konnten durch TA-Klonierung in den Vektor pGEM-T kloniert und mit Hilfe des Primers T7-for sequenziert werden. Dazu wurde das pGEM-T-Vektorsystem (Promega) nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.2.11 Zielgerichtete Mutagenese

Um Punktmutationen oder den Austausch von wenigen Basenpaaren in DNA-Abschnitte einzufügen, wurde das „Quikchange® Site directed mutagenesis Kit“ (Stratagene) nach Herstellerangaben verwendet. Für den Entwurf der Primer wurde das „QuikChange Primer Design Programm“, verfügbar im Internet unter „<http://www.stratagene.com/qcprimerdesign>“, verwendet. Für die Transformation nach der Mutagenese wurden hochkompetente Bakterien XL1-blue (Stratagene) verwendet.

3.2.2.12 Reverse Transkription und Echtzeit-PCR-Quantifizierung (realtime PCR)

3.2.2.12.1 Realtime PCR-Quantifizierung von RNA-Transkripten mittels *TaqMan*TM-PCR

RNA wurde mit Trizol aus den Zellen isoliert. Die Umschreibung in cDNA erfolgte mit Superscript II reverser Transkriptase (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Es wurde jeweils 1 µg RNA und 250 ng Hexanukleotid Random-Primer-Mix (Promega) verwendet. Die cDNA wurde im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt. Die *TaqMan*-PCR wurde im ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) durchgeführt. Die *TaqMan*-Sonden wurden der Universal Probe Library (Roche) entnommen. Um die für die Detektion eines Gens jeweils optimale Kombination aus einem spezifischen Primerpaar und einer Sonde zu entwickeln, wurde die Software „Assay Design Center“ auf der Internetseite „www.universalprobelibrary.com“ (Roche) verwendet. Die PCR wurde mit den folgenden Parametern durchgeführt:

94°C	12 min	} 45x
95°C	20 s	
60°C	1 min	

Dabei wurde nach jedem Zyklus die Fluoreszenz gemessen. Die Datenanalyse erfolgte mit der ABI Prism 7000 Software, welche einen C_t -Wert für jede Reaktion berechnet. Um Unterschiede in den Transkriptmengen eines gegebenen Gens in unterschiedlichen Zelllinien oder unter unterschiedlichen Bedingungen zu berechnen, wurde pro C_t -Wert eine Verdoppelung der Transkriptmenge angenommen. Der Mengenfaktor (x) wurde also durch die Formel $x=2^{-\Delta C_t}$ angenähert. Es wurde der folgende Reaktionsansatz verwendet:

TaqMan-Reaktionsansatz:	5 µl cDNA
	12,5 µl TaqMan Universal Master Mix
	2 µl 10 µM forward Primer
	2 µl 10 µM reverse Primer
	0,25 µl TaqMan Sonde
	0,5 µl ROX Referenzfarbstoff (Invitrogen)
	2,75 µl H ₂ O

3.2.2.12.2 Realtime PCR-Quantifizierung von Micro-RNAs im Light-cycler™

RNA wurde mit Trizol aus 1×10^6 Zellen isoliert und in Wasser aufgenommen. 1 µg RNA wurde einer DNaseI-Behandlung (1U DNaseI in DNaseI-Puffer, 15 min bei Raumtemperatur) unterzogen. Anschließend wurde die DNaseI bei 65°C für 10 min inaktiviert. Die RNA wurde anschließend mit Hilfe des Poly-A-tailing Kits (Ambion) nach Angaben des Herstellers mit Poly-A-Resten an den 3'-Enden versehen. Die RNA wurde durch eine Phenol-Chloroform Extraktion mit anschließender Ethanol-Acetat-Fällung gereinigt und in 11 µl Wasser gelöst. Es folgte die Erststrang-Synthese. Dazu wurde die gesamte RNA mit 1 µg des Ankerprimers „Poly(t)Adpt“ und 1 µl dNTP-Mix (10 mM) gemischt, 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Dann folgte die Zugabe von 4 µl Erststrangpuffer (Invitrogen) und 2 µl DTT (100 µM). Nach 2 min Inkubation bei 42°C wurde 1 U SuperScript II Reverse Transkriptase (Invitrogen) dazugegeben und der Reaktionsansatz bei 42°C für 50 min inkubiert. Die reverse Transkriptase wurde 5 min bei 70°C inaktiviert und die cDNA im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt. Die Quantifizierung der miRNAs erfolgte im Light-Cycler (Roche) unter Benutzung des „FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I Master Mix“ (Roche) nach Angaben des Herstellers in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 5 µl cDNA als Template unter Verwendung jeweils eines miRNA-spezifischen Primers und des Primers „AdptRev“, welcher an die Ankersequenz bindet. Die spezifischen Primer tragen den Namen „RTmiRK(Nummer)for“. Für die Positivkontrollen, und um gleiche Mengen an Template in den einzelnen Proben zu garantieren, wurde der spezifische Primer RTHs5.8Sfor verwendet, welcher an den 3'-Terminus der ubiquitär vorkommenden humanen ribosomalen 5.8S-RNA bindet. Falls nicht anders angegeben, wurde die PCR mit folgenden Parametern durchgeführt:

95°C	10 min		} 45x
95°C	10 s	($\Delta T=20^\circ\text{C/s}$)	
68°C	5 s	($\Delta T=20^\circ\text{C/s}$)	
72°C	6s	($\Delta T=5^\circ\text{C/s}$)	

Dabei wurde nach jedem Zyklus die Fluoreszenz gemessen. Die Datenanalyse erfolgte mit der Light Cycler Software, welche einen C_t -Wert für jede Reaktion berechnet. Für eine

absolute Quantifizierung wurden synthetische miRNAs in definierten Konzentrationen (6×10^{10} , 6×10^8 , 6×10^6 , 6×10^4 Kopien pro μg RNA) als Standard verwendet, welche in Gesamt-RNA aus den jeweiligen Kontroll-Zelllinien verdünnt wurden. Um auf die Kopienzahl der miRNAs pro Zelle zurückrechnen zu können, musste die RNA Menge berechnet werden, die sich aus einer einzelnen Zelle isolieren lässt. Dazu wurde RNA aus 1×10^6 Zellen isoliert, die Konzentration photometrisch bestimmt und die insgesamt isolierte Gesamtmenge durch die eingesetzte Zahl der Zellen geteilt.

3.2.2.13 Microarray-Analysen

Die Qualitätskontrolle der RNA erfolgte im Bioanalyzer (Agilent). Für die Microarray-Analysen wurden von jeder Probe je 100 ng RNA amplifiziert und markiert. Hierfür wurde das Affymetrix Whole-Transcript (WT) Sense Target Labeling Protocol (Affymetrix) ohne rRNA-Reduktion nach Herstellerangaben verwendet. Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Arrays (für die Untersuchung der Gesamt-RNA aus den DG75 und EaHy-Zellen), bzw. Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST Arrays (für die Untersuchung der RISC-Immunpräzipitationen) wurden nach den Herstellerangaben hybridisiert, gewaschen, gefärbt und eingescannt. Die Microarray-Daten wurden auf Qualität geprüft und normalisiert. Microarray-Analysen im Zusammenhang mit den Untersuchungen an Gesamt-RNA aus den KSHV-miRNA exprimierenden DG75- bzw. EaHy-Zellen wurden von Dr. Vladimir Benes (EMBL, Heidelberg) durchgeführt. Microarray-Analysen im Zusammenhang mit der RISC-Immunpräzipitation wurden von Dr. Reinhard Hoffmann am Institut für medizinische Mikrobiologie der TU-München durchgeführt. Alle Microarrays wurden mindestens in Triplikaten durchgeführt.

3.2.2.14 Northern Blots zum Nachweis der miRK12-3

Die RNA wurde mit Hilfe von Trizol (Invitrogen) aus den Zellen isoliert. 30 μg Gesamt-RNA wurden auf einem 15%-igem Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die aufgetrennten Moleküle wurden elektrophoretisch auf eine Hybond-N Nylon-Membran (Amersham Biosciences) übertragen. Die Membran wurde mit einem ^{32}P -markierten Oligonukleotid inkubiert, welches komplementär zu der miRNA miRK12-3-5p war. Die Inkubation erfolgte in ULTRAhyb-Oligo solution (Ambion) nach Herstellerangaben. Die Signale wurden mit einem FLA300 Fluorimager (Fujifilm) detektiert.

3.2.3 Statistik: Überrepräsentation von vorhergesagten miRNA-Bindungsstellen

Zelluläre miRNAs, welche in sechs B-Zelllinien exprimiert werden, wurden dem öffentlich zugänglichen miRNA-Expressionsatlas¹²⁵ entnommen. Sequenzen der miRNAs wurden der miRBase-v.12-Datenbank (<http://microRNA.sanger.ac.uk/sequences>) entnommen. Die Sequenzen der 3'UTRs aller zellulären Gene wurden der Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org>) entnommen. Für diese wurden die mi-RNA-Bindestellen mit Hilfe des PITA-Algorithmus¹¹¹ vorhergesagt. Die Überrepräsentation wurde mit der Hilfe des „Exakten Fischer-Testes“ bestimmt. Für diesen Test wurden die vier Kategorien a, b, c und d mit den Klassifikationen „AGO2 Anreicherung ja/nein“ und „PITA vorhergesagte Bindestelle ja/nein“ aus der folgenden Kreuztabelle abgeleitet:

	AGO2-angereichert	AGO2- nicht angereichert
Vorhergesagte Bindestelle	a	b
Keine vorhergesagte Bindestelle	c	d

Aus diesen Kategorien wurde das Quotenverhältnis mittels der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Quotenverhältnis} = \frac{a:c}{b:d}$$

Die statistische Signifikanz der Assoziation von vorhergesagten Bindestellen und Anreicherung durch RISC-IP wurde als der p-Wert des „Exakten Fisher-Testes“ nach folgender Formel berechnet ($n=a+b+c+d$):

$$p = \frac{a+b! a+c! c+d! b+d!}{n! a! b! c! d!}$$

3.2.4 Zellkultur und Herstellung der Zelllinien

3.2.4.1 Kultivierung und Kryo-Konservierung

Falls nicht anders angegeben wurden die DG75-Zelllinien in RPMI1640-Medium, und HEK293- und EaHy 926-Zellen in D-MEM Medium kultiviert. Die Medien wurden jeweils mit 10% fötalem Kälberserum, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin angereichert. Primäre HUVEC-Zellen (Promocell) wurden in Basalmedium für Endothelzellen (Promocell) kultiviert, welches mit 10% FCS, Gentamycin, Amphoterizin und dem mitgelieferten Medienzusatz angereichert wurde. Alle Zellen wurden bei 37°C in feuchter, 5%-iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Für die Kryo-Konservierung wurden die Zellen 5 min bei 300 g sedimentiert und anschließend bei einer Konzentration von 0,5-1x10⁷ Zellen pro ml

in 1 ml FCS mit 10% DMSO resuspendiert. Die Zellen wurden in Kryo-Röhrchen überführt, in einen „Cryo 1°C Einfrierbehälter“ gegeben und bei -80°C für 24 h abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die Zellen aufzutauen, wurden sie kurz bei 37°C im Wasserbad inkubiert, einmal mit 10 ml Zellkulturmedium gewaschen und anschließend in Kultur genommen.

3.2.4.2 Transfektion

Für die Transfektion von eukaryontischen Zelllinien wurde entweder FuGene 6 Transfektionsreagenz (Roche) oder Lipofectamin 2000 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.4.3 Herstellung der Vektoren für die Expression von micro-RNAs

3.2.4.3.1 Lentivirale Vektoren für die miRNA Expression

Da die verwendeten Zelllinien mit herkömmlichen Transfektionsmethoden nicht mit ausreichender Effizienz transfizierbar waren, wurde ein lentivirales Transduktionssystem benutzt. Es wurden zwei lentivirale Vektoren für die Expression der miRNAs hergestellt. Einer (pLENTI6/V5-10/12) enthielt nur die zehn Intron-kodierten prä-miRNAs, der andere (pLENTI6/V5-1-12) enthielt zusätzlich die zwei miRNAs aus der Kaposin-Region (Abb. 6). Für die Herstellung des Vektors pLENTI6/V5-10/12 wurde eine *Two-Step*-PCR mit den spezifischen Oligonukleotiden KSHV miRK for und KSHV miRK rev durchgeführt. Mittels BP-Reaktion wurde das PCR-Produkt in den Vektor pDONR207 zwischenkloniert und dann mittels LR-Reaktion in den Vektor pLENTI6/V5-DEST rekombiniert. Für die Herstellung des Vektors pLENTI6/V5-1-12 wurden die zwei miRNAs miRK12-10 und miRK12-12 mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide miRK10+12for und miRK10+12rev amplifiziert und in den Vektor pGEM (Promega) nach Angaben des Herstellers zwischenkloniert. Aus diesem wurden die miRNAs mit *BspEI* ausgeschnitten und in den Vektor pDONR207 mit den zehn Intron-kodierten miRNAs ligiert, welcher vorher mit *BspEI* linearisiert und mit CIP dephosphoryliert worden war. Die richtige Orientierung wurde durch Sequenzieren festgestellt. Die 12 miRNAs wurden anschließend durch eine LR-Reaktion in den Vektor pLENTI6/V5-DEST rekombiniert. Als Kontrollvektor wurde der Vektor pLENTI6/V5-eGFP verwendet, welcher eGFP als Reportergen enthielt. Dieser war ein freundliches Geschenk von Oliver Roßmann²⁸.

3.2.4.3.2 pcDNA-Vektoren für die miRNA-Expression

Für die Herstellung des Vektors pcDNA miRK10/12 wurde das intronische miRNA Cluster unter Verwendung der Primer KSHVmiRK(BamHI)for und KSHVmiRK(XhoI)rev PCR mittels PCR amplifiziert und in die *BamHI*- und *XhoI*-Schnittstellen des Vektors pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) kloniert. Der leere Vektor pcDNA wurde durch Spaltung des Vektors pcD-

NA miRK10/12 mit dem Enzym *PmeI* und die anschließende Religation hergestellt. Für die Vektoren, welche die einzelnen KSHV-miRNAs enthalten, wurde eine Region von ca. 300 bp aus der Umgebung der jeweiligen miRNAs unter Verwendung der Primerpaare K12-3 forward und K12-3 reverse bzw. K12-4 forward und K12-4 reverse mittels PCR amplifiziert und in die *XhoI*- und *ApaI*-Schnittstellen des Vektors pcDNA5/FRT/TO kloniert. Für eine weitere Kontrolle wurde die zelluläre miRNA miR206 mit Hilfe der Primer miR206 for und miR206 rev kloniert. Die miRNAs werden von diesem Vektor in normalen HEK293-Zellen konstitutiv exprimiert. In Zellen, welche den Tet-Repressor exprimieren, können die miRNAs induziert durch Doxycyclin exprimiert werden.



Abb. 6: Klonierung der KSHV-kodierten miRNAs.

Gezeigt ist die Latenz-assoziierte Region von KSHV, flankiert von zwei weiteren offenen Leserähmen. Die MicroRNAs sind orange dargestellt. Die Bindestellen der Primer, welche für die Klonierungen verwendet wurden, sind in folgenden Farben abgebildet: Blau: KSHV miRK for und KSHV miRK rev; gelb: miRK10+12for und miRK10+12rev; grün: KSHVmiRK(BamHI)for und KSHVmiRK8XhoI)rev; rot: K12-3 forward und K12-3 reverse; violett: miRK12-4 forward und miRK12-4 reverse. Die *BspEI*-Schnittstelle wurde bei der Herstellung des Vektors pLENTI6V5-1-12 für die Klonierung der miRNAs miRK12-10 und miRK12-12 verwendet.

3.2.4.4 Generierung von Lentiviren für die Transduktion von KSHV-miRNAs

Um Lentiviren für die Transduktion von KSHV-kodierten miRNAs zu generieren, wurde das ViraPower Lentiviral Gateway Expression System (Invitrogen) eingesetzt. Der dabei verwendete „packaging mix“ bestand aus den Plasmiden pLP1, pLP2 und pLP/VSVG in äquimolaren Mengen mit einer DNA-Gesamtkonzentration von 1 µg/µl. Der lentivirale Zielvektor enthielt entweder das eGFP-Gen für die Herstellung der Kontrollzelllinie oder eine, bzw. mehrere KSHV-kodierte miRNAs. Die Lentiviren wurden in der Zelllinie 293FT hergestellt. Diese waren am Tag zuvor in einer Zahl von $1,5 \times 10^6$ auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät worden. Vor der Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch 15 ml OptiMem ohne weitere Zusätze ersetzt. Der Transfektionsansatz wurde nach den vom Hersteller von FuGene 6 (Roche) angegebenen Inkubationszeiten zu den 293FT-Zellen gegeben. Nach 24 h wurde das OptiMem abgenommen und durch 15 ml Producer-Medium ersetzt. Weitere 72 h später wurde der Überstand abgenommen, durch 0,45 µm Spritzenfilter (Millipore) gedrückt und entweder für die Transduktion von Zellen verwendet oder bei -80°C gelagert. 293FT-Zellen wurden grundsätzlich in 293FT-Kulturmedium kultiviert.

Transfektionsansatz:	200 µl Optimem 3 µl Packaging Mix 1 µg Zielvektor 16 µl FuGene 6
Producer-Medium	D-MEM, ergänzt mit: 10 % FCS 6 mM L-Glutamine 1 mM MEM-Natriumpyruvat 0,1 mM MEM-Nichtessentielle Aminosäuren
293 FT-Kulturmedium	D-MEM, ergänzt mit: 10 % FCS 4 mM L-Glutamine 1 mM MEM-Natriumpyruvat 0,1 mM MEM-Nichtessentielle Aminosäuren 500 µg/ml Geneticin (G418)

3.2.4.5 Transduktion mit Lentiviren und Herstellung stabiler Zelllinien

Um Suspensionszellen zu transduzieren, wurde 1 ml lentiviraler Überstand zu 2 ml Zellsuspension (ca. 10^6 Zellen/ml) gegeben. Um adhärenente Zellen zu transduzieren, wurden die Zellen auf 12-well-Platten mit 2 ml Zellkulturmedium kultiviert und mit 1 ml lentiviralen Überstand transduziert. Die das Transgen enthaltenden Zelllinien wurden immer mit der eGFP-transduzierten Kontroll Zelllinie parallel behandelt. Nach ca. 2 Tagen, als das erste GFP-Signal in den Kontroll-Zelllinien sichtbar war, wurde 1 µg/ml Blasticidin zu den Zellen gegeben. Nach 3 Tagen wurde die Blasticidin-Konzentration auf 2 µg/ml erhöht. Nach weiteren 3 Tagen wurde die Blasticidinkonzentration auf die jeweiligen Endkonzentrationen (7,5 µg/ml für lymphatische Zelllinien, 3,5 µg/ml für Endothelzelllinien) erhöht. Die Effizienz der Selektion wurde durch Bestimmung der Anzahl grün fluoreszierender Zellen in der Kontroll Zelllinie mittels Durchflusszytometrie (FACS) abgeschätzt. Nachdem diese 100% erreicht hatte, wurden die Zelllinien für weitere Experimente verwendet.

3.2.4.6 Herstellung von induzierbaren miRNA exprimierenden HEK293 Zelllinien

Flip-In stabile Zelllinien wurden aus der Zelllinie Flp-In T-Rex-293 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers hergestellt. Dazu wurden die Vektoren pcDNA, pcDNA miR206 und pcDNA miRK10/12 verwendet. Die Induktion der miRNA-Expression erfolgte mit 1 µg/ml Doxycyclin, da bei dieser Menge die maximale Expression der miRNAs durch Northern-Blots beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt).

3.2.5 Reportergeren Analysen

3.2.5.1 Herstellung des Luciferase-Reportervektors pSIcheck2-DEST

Um eine schnelle und effiziente Klonierung vieler 3'UTRs in einen Luciferase-Reportervektor zu ermöglichen, wurde der Vektor pSIcheck2 (Promega) kompatibel für die Benutzung mit dem Gateway-System (Invitrogen) gemacht. Dazu wurde der Vektor pSIcheck2 mit *Xba*I an einer einmal vorkommenden Restriktions-Schnittstelle direkt hinter dem *hluc+* Gen (Firefly Luciferase) geschnitten und mit alkalischer Kälberphosphatase dephosphoryliert. Der Vektor pLENTI6V5-DEST wurde ebenfalls mit *Xba*I geschnitten, und die entstehenden Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Bande, welche die *ccdB*-Kassette enthielt (1781bp), wurde aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und in den linearisierten Vektor pSIcheck2 ligiert. Der entstandene Vektor pSIcheck2-DEST wurde in dem *ccdB*-resistenten *E. coli*-Stamm DB3.1 kloniert. Die korrekte Orientierung der Kassette wurde durch Restriktionsverdau (*Eco*RI) verifiziert.

3.2.5.2 Herstellung von miRK12-4-3p Reportervektoren

Es wurden zwei pSIcheck2-Reporterkonstrukte hergestellt, welche statt einer 3'UTR jeweils eine perfekt und eine imperfekt komplementäre Sequenz zu der miRNA miRK12-4-3p enthielten. Dazu wurden die Primer „miRK4(imperfect)sensor_attBfor“ und „miRK4(imperfect)sensor_attBrev“ bzw. „miRK4(perfect)sensor_attBfor“ und „miRK4(perfect)sensor_attBrev“ durch Primerhybridisierung aneinandergelagert: Der Hybridisierungs-Mix (siehe unten) wurde 4 min bei 95°C inkubiert, bei Raumtemperatur abgekühlt und 1:10.000 mit H₂O verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 10 µl als Template für die 2. PCR der „Two Step PCR“ (siehe Abschnitt 3.2.2.8.2) eingesetzt und analog den 3'UTRs kloniert.

Primerhybridisierung:	5 µl for Primer (200 µM)
	5 µl rev Primer (200µM)
	2 10x Oligo Annealing Buffer (Invitrogen)
	8 H ₂ O

3.2.5.3 Luciferase-Repressionsanalysen

Die 3'UTRs wurden durch Rekombinationsklonierung mit Hilfe des Gateway-Systems (Invitrogen) kloniert. Als DONR-Vektor diente der Vektor pDONR207, in welchen die 3'UTRs zwischenkloniert und sequenziert wurden, bevor sie in den Vektor pSIcheck2-DEST kloniert wurden. Die entstehenden Reportervektoren wurden anschließend entweder zusammen mit dem Vektor pcDNA miRK10/12 (miRNA-Vektor) oder einem der pcDNA-Vektoren mit einzelnen miRNAs (pcDNAmiRK3 bzw. pcDNAmiRK4) oder dem leeren Vektor pcDNA als Kontrol-

le in HEK 293-Zellen kotransfiziert. Dazu wurden die HEK 293-Zellen von einer konfluent bewachsenen Platte mittels Trypsin abgelöst und in 20 ml D-MEM aufgenommen. Von der Zellsuspension wurden je 20 μ l in die Vertiefungen einer 24-well Platte mit 500 μ l D-MEM gegeben und am nächsten Tag transfiziert. Der Transfektionsansatz wurde dabei nach den Herstellerangaben für FuGene (Roche) hergestellt und verwendet, und bestand aus 10 ng Reportervektor, 200 ng miRNA-Vektor und 1 μ l FuGene-Transfektionsreagenz (Roche) in 20 μ l Opti-MEM. Nach 16 h Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 100 μ l Passive Lysis Buffer (Promega) lysiert. Das Lysat wurde anschließend mit 900 μ l PBS verdünnt. Die Luciferaseaktivität wurde mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) in einem Multiplattenlesegerät (Fluostar Optima, BMG-Labtech) nach Herstellerangaben bestimmt. Dabei wurden 10 μ l verdünntes Lysat und je 50 μ l Substrat für die Firefly- bzw. Renilla-Luciferase verwendet. Die Messzeit für das Reporter- bzw. Referenzsignal betrug jeweils 5 Sekunden. Die Ergebnisse der Messung wurden auf das Signal des Leervektors pSI-check2-DEST normalisiert und dessen Luciferaseaktivität auf 100% gesetzt. Die Luciferasemessungen wurden mindestens dreimal in Triplikaten durchgeführt.

3.2.5.4 2'O-Methyl-RNA-Derepressionsanalysen

Die Aussaat der Zellen für die Derepressionsanalysen erfolgte wie im vorherigen Abschnitt für die Repressionsanalysen beschrieben. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden 2'O-Methyl-RNAs transfiziert. Der Transfektionsansatz wurde dabei nach den Herstellerangaben für Lipofectamin 2000 (Invitrogen) hergestellt und verwendet und bestand aus 100 pmol 2'O-Methyl-RNA und 2,5 μ l Lipofectamin 2000 in insgesamt 100 μ l Opti-MEM. Nach 6 h wurde das Medium abgenommen und durch 500 μ l frisches D-MEM ersetzt. Die zweite Transfektion mit Reporter- und miRNA Vektoren und die anschließende Messung der Luciferaseaktivität wurden wie im vorherigen Abschnitt durchgeführt.

3.2.6 Analyse der Apoptose

Die Effekte der KSHV-miRNAs auf die Apoptose wurde durch Messung der Caspase 3/7-Aktivität und durch Annexin-V/Propidiumjodid-Färbung analysiert. Der Zelltod wurde durch Inkubation mit 5 μ M Staurosporin (Sigma) für 8 Stunden induziert. DMSO wurde dabei als Kontrolle benutzt.

Für die Annexin-V-Bindungsanalyse wurden 10^5 Zellen in 12-well Platten ausgesät, über Nacht inkubiert und anschließend Staurosporin (5 μ M) bzw. DMSO zugegeben. Adhärenente Zellen wurden trypsiniert, in PBS gewaschen und in Bindepuffer resuspendiert. 1:100 verdünntes Annexin-V-Allophycocyanin (BD Biosciences) und 2 μ g/ml Propidiumjodid wurden

zugegeben, die Zellen für 15 min im Dunkeln inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

Für den Caspase 3/7-Aktivitätstest wurden $2,5 \times 10^4$ HEK293-Zellen in 96-well Platten ausgesät und sofort Staurosporin (5 μ M) bzw. DMSO zugegeben. Die Caspase 3/7-Aktivität wurde unter Verwendung des Caspase-Glo 3/7 Assay Kits (Promega) gemessen und gegen die Proteinkonzentration normalisiert. Die Proteinmenge wurde mit Hilfe des DC-Protein-Assays (BioRad) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

Bindepuffer:	10 mM Hepes/NaOH (pH 7,4)
	140 mM NaCl
	2,5 mM CaCl ₂

3.2.7 Proteintechniken

3.2.7.1 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS)

Für die FACS-Analysen wurden 1×10^6 Zellen nach Bedarf gefärbt, einmal mit FACS-Puffer gewaschen, in 300 μ l FACS-Puffer aufgenommen und in 5 ml BD Falcon Polystyrol Rundbodenröhrchen überführt. Die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung wurde verwendet, um tote Zellen und Zellreste aus der Messung auszuschließen. Die Messung erfolgte im FITC-A-Kanal des FACS-Gerätes. Es wurden jeweils 30.000 Ereignisse gezählt.

FACS Puffer:	PBS mit:
	0,02 % Natriumazid
	2,5 % FCS

3.2.7.2 Pull Down von RISC-Komplexen und Isolierung von RNA

Für die RISC-Immunpräzipitationen (RISC-IP) wurden für jedes Replikat jeweils 5×10^8 Zellen verwendet. Diese wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 10 ml frisch zubereiteten Lysepuffer aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden anschließend durch Zentrifugation bei 20.000 g für 30 min bei 4°C gereinigt und bei -80°C gelagert. Lagerung bei -80°C hatte keinen Einfluss auf die Effizienz der RISC-IP.

Die AGO2-Immunpräzipitationen wurden mit einigen Modifikationen analog zu einem früher beschriebenen Protokoll durchgeführt¹⁸. Dazu wurden 6 μ g eines gereinigten hAGO2-Antikörpers oder eines monoklonalen BrdU-Antikörpers (Kontrolle) zu 5 ml RPMI1640-Medium gegeben und mit 60 μ l Protein-G-Sepharose-Kügelchen (GE Healthcare) in Pierce-Zentrifugenröhrchen (Thermo Scientific) unter konstanter Rotation bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Säulen entleert, einmal mit Lysepuffer gewaschen und mit 5 ml Zelllysate für 2,5 h unter konstanter Rotation bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wur-

de die Sepharose zweimal mit IP-Waschpuffer und einmal mit PBS gewaschen. Zur Gewinnung der RNA wurden die Sepharose-Kügelchen mit 700 µl Qiazol für 5 min inkubiert und die Qiazol-Lysate anschließend gesammelt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Die RNA wurde aus den Lysaten unter Verwendung des miRNeasy Kits nach Herstellerangaben präpariert. Unter Verwendung des miRNeasy-Systems (Qiagen) wurde die Gesamt-RNA aus 100 µl Zelllysat nach Angaben des Herstellers präpariert. Die RNA-Elution erfolgte mit 30 µl Wasser.

Lysepuffer:	25 mM Tris HCL, pH7,5 150 mM KCL 2 mM EDTA 0,5 % NP-40 0,5 mM DTT 1 Protease-Inhibitor-Tablette pro 10 ml
IP-Waschpuffer:	300 mM NaCl 50 mM Tris HCL, pH 7,5 5 mM Mg_2Cl 0,1 % NP-40 1 mM NaF

3.2.7.3 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Die Zelllysate wurden durch Kochen der Zellpellets (5 min, 95°C) in Probenpuffer hergestellt. Die Gelelektrophorese wurde in 12%-igen Polyacrylamid-Trenngelen durchgeführt, welche mit einem 5%-igem Sammelgel überlagert waren. Die Auftrennung erfolgte bei 150 V für 1-2 Stunden. Die Proteine wurden mit Hilfe des Protean II Systems (BioRad) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von Transferpuffer auf Nitrocellulose-Membranen geblottet (Nass-Blot, 100 V, 1 Stunde). Unspezifische Bindestellen wurden durch einstündige Inkubation in TBST (TBS, 0,05% Tween 20) mit 5% Magermilchpulver abgesättigt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1:300) erfolgte in 5 ml TBST bei 4°C über Nacht. Nach fünfmaligem Waschen mit je 100 ml TBST wurde mit dem entsprechenden zweiten Antikörper inkubiert. Für die Fluoreszenz-basierten Western Blots wurden Alexa488-konjugierte Antikörper verwendet (Verdünnung 1:200, 1 Stunde). Es folgten 5 Wasch-Schritte mit je 100 ml TBST. Die Western Blots wurden in einem FLA-300 Fluorimager (Fujifilm) gescannt und die Proteine mit Hilfe der AIDA Image Analyzer Software v.4.00 (Raytest) quantifiziert. Für die Chemilumineszenz-basierten Western Blots wurde ein HRP-konjugierter Antikörper verwendet (Verdünnung 1:1000, 1 Stunde). Es folgten 5 Wasch-Schritte mit je 100 ml TBST. Die Proteine wurden auf einem SuperRX-Film (Fujifilm) mit Hilfe des ECL-Chemilumineszenz Systems (Pierce) visualisiert.

Trenngel, 12%:	2 ml Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 1,25 ml Tris pH8,8 50 µl 10% SDS 1,675 ml Wasser 20 µl 10% APS 2,5 µl TEMED
Sammelgel	1,35 ml Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 0,625 ml Tris pH6,8 25 µl 10% SDS 1,53 ml Wasser 12,5 µl 10% APS 2,5 µl TEMED
Probenpuffer:	62,5 0,5M Tris 6,8 10 % Glycerol 2 % SDS 0,01 % Bromphenolblau
10x Laufpuffer	50 mM Tris 384 mM Glyzin 0,1 % SDS
Transferpuffer (1l):	5,8 g Tris Base 2,9 g Glyzin 0,37 SDS 200 ml Methanol ad 1 l Wasser

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung und Charakterisierung von KSHV-miRNA exprimierenden Zelllinien

4.1.1 Herstellung stabiler Zelllinien

Mit Hilfe der Plasmide pLENTI6/V5-10/12, pLENTI6/V5-1-12 und pLENTI6/V5-eGFP wurden rekombinante Lentiviren hergestellt, mit denen die B-Zelllinie DG75 und die Endothel-Zelllinie EAHy 926 transduziert wurden. Dabei wurde jeweils eine Zelllinie hergestellt, welche die 10 intronischen miRNAs von KSHV enthält (Nomenklatur: „miRK10/12“ oder nur „10/12“), und eine, welche alle 12 KSHV-miRNAs enthält (Nomenklatur: „miRK1-12“ oder nur „1-12“). Als Kontrolle wurde dabei jeweils eine eGFP exprimierende Zelllinie hergestellt. Die Herstellung der Expressionskonstrukte ist in Abschnitt 3.2.4.3 bzw. in Abb. 6 beschrieben. Vier Tage nach der Transduktion waren in der Kontrolle die ersten grünen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Ihr Anteil lag bei beiden Zelllinien bei ca. 5%. Zu diesem Zeitpunkt wurde mit der Selektion mit 1 µg/ml Blasticidin begonnen. Nach ca. 6 Tagen unter Selektion betrug die Anzahl grüner Zellen in der Kontrolle ca. 40% der Gesamtzellzahl (Abb. 7).

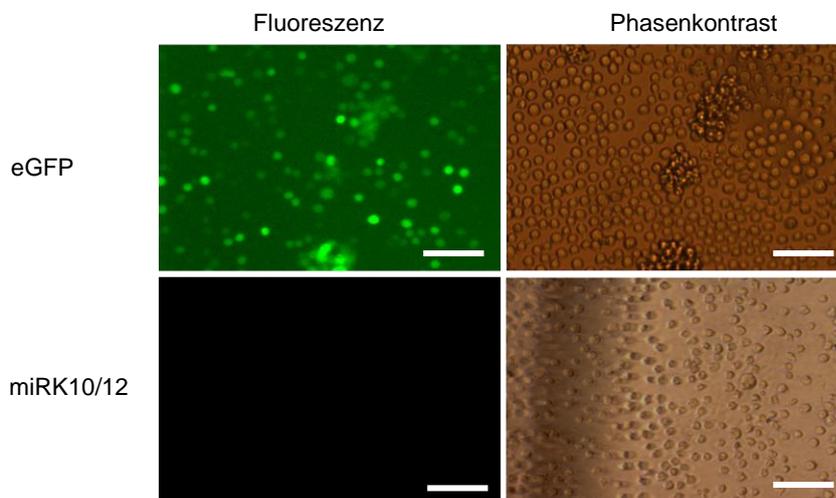


Abb. 7: GFP-Expression in den transduzierten Zelllinien.

Die DG75-Zelllinien wurden mit Hilfe von Lentiviralen Vektoren mit eGFP bzw. den KSHV kodierten miRNAs (miRK10/12) transduziert und 4 Tage nach Transduktion unter Selektion mit 1µg/ml Blasticidin genommen. Sechs Tage später wurde die Effizienz der Selektion im Fluoreszenzmikroskop überprüft. Die Anzahl grüner Zellen betrug zu diesem Zeitpunkt in der eGFP-Transduktion ca. 40%. (Länge des Balkens: 100 µm)

Nach weiteren 3 Tagen wurde die Blasticidinkonzentration auf die jeweiligen Endkonzentrationen (7,5 µg/ml für lymphatische Zelllinien, 3,5 µg/ml für Endothelzelllinien) erhöht. Um die

Effizienz der Selektion abschätzen zu können, wurden die eGFP exprimierenden Zellen ca. alle 3 Tage mittels Durchflusszytometrie analysiert und mit den eGFP-negativen Zelllinien verglichen. Nach etwa 3 Wochen waren 100% der B-Zellen (Abb. 8) und der Endothelzellen (nicht gezeigt) grün, und die Zelllinien konnten für weitere Experimente benutzt werden.

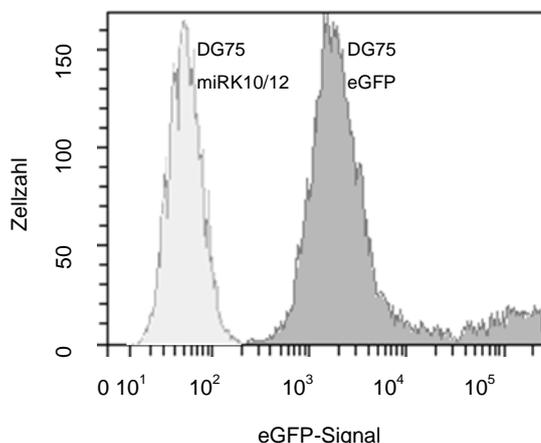


Abb. 8: FACS-Analyse der eGFP-transduzierten DG75-Zelllinie nach Selektion mit Blasticidin.

Nach 3 Wochen unter Selektion mit Blasticidin wurde der Anteil der eGFP exprimierenden Zellen im FITC-Kanal des Durchflusszytometers bestimmt. 100% der Zellen in der eGFP-transduzierten DG75-Zelllinie (dunkelgrau) gaben ein eGFP Signal. Deswegen wurde von einer vollständigen Selektion durch Blasticidin ausgegangen. Zum Vergleich ist eine der mit KSHV-kodierten miRNAs transduzierten Zelllinien (hellgrau) gezeigt. Es wurden jeweils 30.000 Ereignisse gemessen.

4.1.2 Nachweis von KSHV-kodierten miRNAs

4.1.2.1 Northern Blot zum Nachweis von miRNAs

Für eine erste Abschätzung, ob die transduzierten Zellen KSHV-kodierte miRNAs produzieren, wurde ein Northern Blot zur Detektion der miRNA miRK12-3-5p im Labor von Sébastien Pfeffer (IBMP, Strasbourg) durchgeführt (Abb. 9). Die miRNA ließ sich deutlich in den Zelllinien nachweisen, welche mit den intronischen miRNAs (10/12) transduziert worden waren. Die KSHV-positive PEL-Zelllinie BCBL-1 diente als Positivkontrolle. Die verwendete Sonde war komplementär zu der reifen miRNA miRK12-3-5p. Die miRNA erschien nach der Detektion in zwei Banden, welche den erwarteten Größen der prä-miRNA (70 bp) und der maturen miRNA (23 bp) entsprachen. In den Zelllinien, welche mit allen 12 KSHV-kodierten miRNAs (1-12) transduziert worden waren, war die Expression bedeutend schlechter: In den B-Zellen war das Signal sehr schwach ausgeprägt, und in den Endothelzellen nicht erkennbar. In der KSHV-negativen B-Zelllinie BL41 und in den eGFP-transduzierten Zellen war, wie erwartet, kein spezifisches Signal erkennbar.

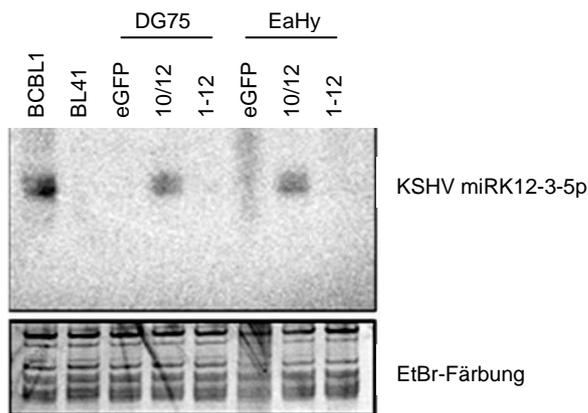


Abb. 9: Nachweis der miRK12-3-5p in den transduzierten Zelllinien durch Northern-Blot.

Aus den transduzierten Zelllinien wurde die Gesamt-RNA isoliert. 30 µg wurden auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (15%) aufgetragen und durch Northern Blot unter Verwendung einer zu miRK12-3-5p komplementären, ³²P-markierten Sonde analysiert. Die miRNA lässt sich in der KSHV-positiven Zelllinie BCBL-1 und in den mit intronischen miRNAs transduzierten Zelllinien nachweisen. Man sieht eine Doppelbande, entsprechend der prä-miRNA und der reifen miRNA (70 bzw. 23 bp, Marker nicht gezeigt). Als Ladekontrolle (untere Bildhälfte) wurde das gleiche Gel mit EtBr angefärbt (Sébastien Pfeffer).

4.1.2.2 Bestimmung von miRNAs mittels Realtime-PCR

Der Nachweis von miRNAs in Northern-Blots ist sehr zeitaufwendig. Auch ist die Quantifizierung durch densitometrische Bestimmung der Bandenintensität nicht sehr genau. Aus diesem Grund wurde der schnelle und unkomplizierte quantitative Nachweis der Micro-RNAs etabliert. Dazu wurde eine von Shi und Chiang entwickelte Echtzeit-PCR-Methode zum Nachweis von reifen miRNAs in *Arabidopsis thaliana*¹⁹⁶ für die Detektion von allen KSHV-kodierten miRNAs und Kontroll-RNAs (let7, 5.8S) im Light-cycler (Roche) modifiziert (Abb. 10 A). In dieser Publikation wurde auch die Spezifität für reife, d.h. fertig prozessierte miRNAs gezeigt. Mit dieser Methode wurden alle KSHV-miRNAs in den B-Zelllinien und in den Endothelzelllinien analysiert. Um lediglich einen qualitativen Nachweis der miRNA-Expression zu führen, wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den C_t-Werten für miRNA exprimierende Zellen und Kontrollzellen als Unterscheidungsmerkmal herangezogen. Dies ist in Abb. 10 B für die zwei Micro-RNAs miRK12-2 und miRK12-6-3p in den B-Zelllinien gezeigt. Die KSHV-positive Zelllinie BCBL-1 exprimierte die miRNAs am stärksten (niedrigster Ct-Wert), gefolgt von der Zelllinie DG75miRK10/12. Auch hier war die Expression in der Zelllinie DG75miRK1-12, wie bereits für miRK-3 im Northern Blot beobachtet, bedeutend schwächer. Der Grund dafür ist nicht bekannt, aber dieser Effekt wurde auch für die anderen miRNAs beobachtet. Daher

wurde in den weiteren Experimenten nur mit den Zelllinien weitergearbeitet wurde, welche lediglich die intronischen miRNAs exprimieren.

Grundsätzlich bildete sich in den PCRs nach einer entsprechend hohen Zahl PCR-Zyklen auch dann ein Produkt, wenn cDNA aus den Kontroll-Zelllinien verwendet wurde. Es wurde postuliert, dass es sich dabei um unspezifisches PCR-Produkt handelte. Um dies zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte auf einem 2,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Nur bei den KSHV-miRNA exprimierenden Zelllinien wurde dabei ein spezifisches Produkt in der erwarteten Größe von 66 bp, entsprechend der Länge der muren miRNA plus des Adapters, gebildet (Abb. 10 C). Um die Spezifität dieser Nachweismethode für reife miRNAs in einem weiteren Experiment zu zeigen, wurden die Produkte der RT-PCRs der miRNAs miRK12-5 und miRK12-11 in den Vektor pGEM-T (Promega) kloniert und sequenziert. Die Sequenzen entsprachen in beiden Fällen der reifen, prozessierten miRNA (Daten nicht gezeigt).

Es wird angenommen, dass die Abundanz der Micro-RNAs auch ihre Funktion in der Zelle beeinflusst. Daher sollte die Expression der miRNAs im Vergleich zur „physiologischen“ Situation untersucht werden. Als physiologisch wurde dabei die Expressionsstärke der miRNAs in der KSHV-positiven Zelllinie BCBL-1 angenommen. Um die Expressionsstärken vergleichen zu können, wurden Standardkurven für die Detektion von miRNAs mit Hilfe synthetischer RNAs erstellt. In Abb. 10 D ist die Standardkurve bei der Detektion der miRNA miRK12-2 gezeigt. Die Gerade zeigt eine Steigung von $-3,835$ C_t -Werten pro Log-Stufe der miRNA-Konzentration (Bestimmtheitsmaß $R^2=0,9997$). Diese Werte wurden auch für die miRNAs miRK12-5 ($y=-3,816$; $R^2=0,9908$) und miRK12-11 ($y=-3,994$; $R^2=0,9980$) ermittelt. Aus den drei Werten ergab sich also eine mittlere Steigung von $-3,88$ C_t -Werten pro Log-Stufe der miRNA-Konzentration. Das bedeutet, dass eine Erhöhung der miRNA-Ausgangskonzentration um den Faktor 10 eine Verschiebung der Amplifikationskurve um 3,88 Zyklen nach vorne bewirkt. Da gilt „ $10,00=1,81^{3,88}$ “, lässt sich für die Bestimmung der Konzentration von miRNAs sagen, dass die Zunahme um einen C_t -Wert einer 1,81-fach geringeren Ausgangskonzentration der miRNA entspricht. Mit Hilfe der Formel „ $x=1,81^{\Delta C_t}$ “ ließen sich somit die miRNA-Konzentrationen in den transduzierten Zelllinien und in den BCBL-Zellen vergleichen. X entsprach dabei dem Vielfachen der miRNA-Konzentration. In Tab. 2 sind in den ersten beiden Spalten die Ergebnisse zusammengefasst. Die Expressionsstärke bzw. die Effizienz der Prozessierung der miRNAs war in den transduzierten Zelllinien für einige miRNAs ähnlich der physiologischen Situation. Die meisten miRNAs waren schwächer exprimiert. Die miRNAs miRK12-4-5p und miRK12-11 waren kaum nachweisbar, und für die miRNAs miRK7 und miRK8 konnte keine spezifische PCR etabliert werden.

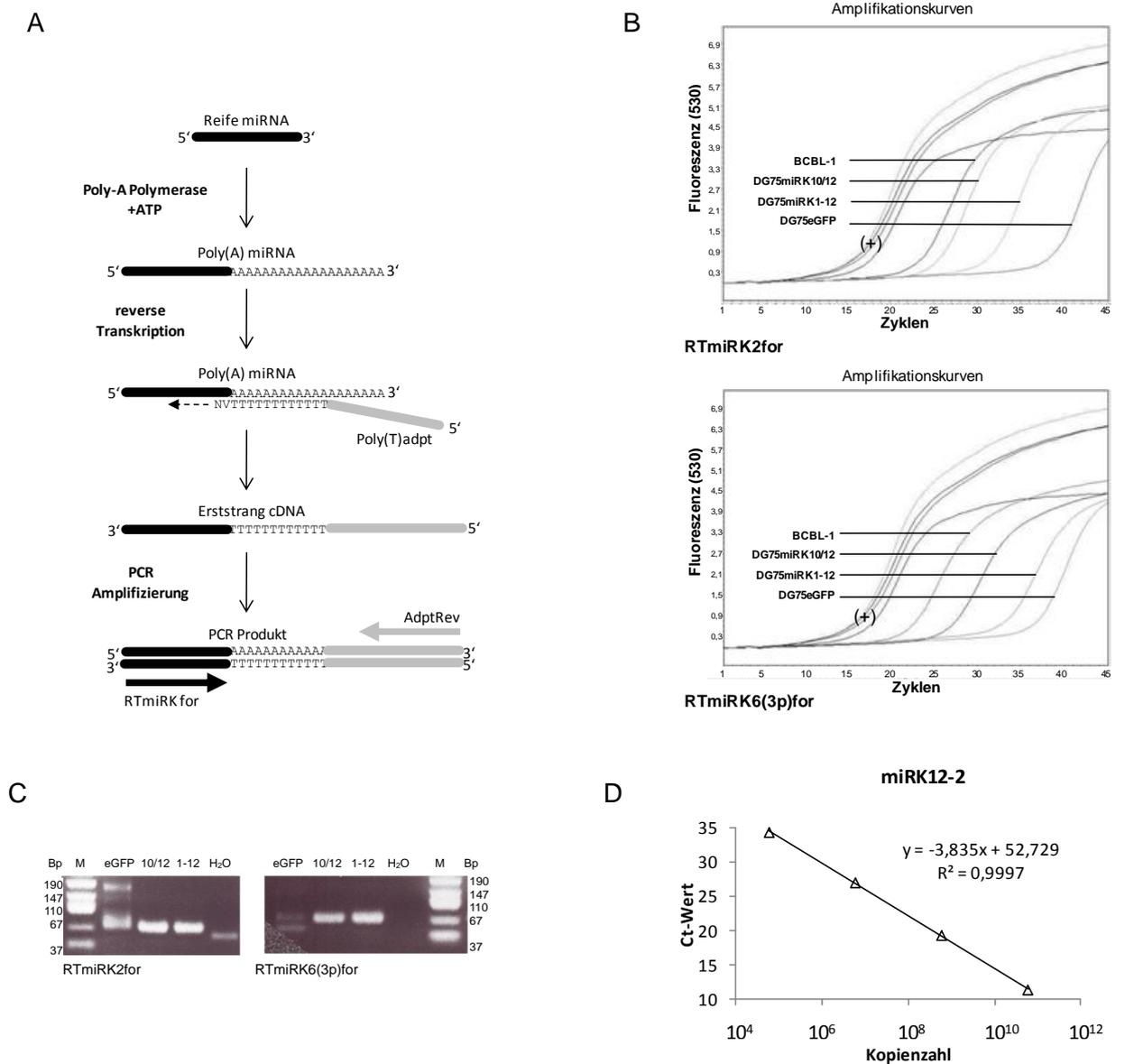


Abb. 10: Nachweis von miRNAs durch Echtzeit-PCR.

(A) Schematische Darstellung des RT-PCR-Nachweises von reifen miRNAs. Die miRNA wird durch die Poly-A-Polymerase am 3'-Ende verlängert. Der Poly(T)-Adapterprimer bindet, da er degeneriert ist, unmittelbar an das 3'-Ende der miRNA und ermöglicht die Erststrangsynthese. Die PCR erfolgt unter Verwendung je eines miRNA-spezifischen und eines Adapter-spezifischen Primers.

(B) Gezeigt sind die Amplifikationskurven beim Nachweis von Micro-RNAs unter Verwendung der spezifischen Primer RTmiRK2for und RTmiRK6(3p)for in den Zelllinien BCBL-1, DG75miRK10/12, DG75miRK1-12 und DG75 eGFP. (+) Bezeichnet die Positivkontrollen für diese 4 Zelllinien unter Verwendung des spezifischen Primers RTHs5.8Sfor, welcher an die Sequenz der ubiquitär vorkommenden 5.8S ribosomalen RNA bindet.

(C) Die PCR-Produkte der Realtime-PCRs mit den DG75-Zelllinien wurden auf ein 2,5%iges Agarosegel aufgetragen. Nur bei den Zelllinien, welche die entsprechenden miRNAs enthalten, sieht man ein spezifisches PCR-Produkt in der erwarteten Größe.

(D) Die Standardkurven der RT-PCR wurden mit Hilfe von RNA-Oligonukleotiden hergestellt, welche der jeweiligen reifen miRNA entsprachen. Gezeigt ist das Ergebnis für miRK12-2. Die Verdünnungen entsprechen (von links nach rechts) 6×10^4 , 6×10^6 , 6×10^8 und 6×10^{10} Kopien.

Tab. 2: Quantifizierung von KSHV miRNAs durch qPCR

Die Expressionsstärke der KSHV-miRNAs in DG75miRK10/12-, EaHymiRK10/12- und BCBL-1 Zellen wurde mittels quantitativer PCR verglichen. Für einige der miRNAs wurde die Kopienzahl pro Zelle in der BCBL-1-Zelllinien bestimmt. Abkürzungen: n.s.= Es konnte unter den verwendeten Bedingungen kein spezifisches PCR-Signal erhalten werden; n.d.= absolute Quantifizierung nicht durchgeführt.

	DG75miRK10/12 Expressionsstärke relativ zu BCBL-1	EaHymiRK10/12 Expressionsstärke relativ zu BCBL-1	BCBL-1 Kopienzahl pro Zelle
miRK12-1	30%	17%	n.d.
miRK12-2	36%	17%	935
miRK12-3-5p	77%	51%	51507
miRK12-4-5p	1%	0%	n.d.
miRK12-4-3p	11%	4%	9799
miRK12-5	23%	15%	126
miRK12-6-5p	117%	45%	13312
miRK12-6-3p	40%	20%	3543
miRK12-7	n.s.	n.s.	n.s.
miRK12-8	n.s.	n.s.	n.s.
miRK12-9-5p	16%	12%	n.d.
miRK12-11	0%	0%	n.d.

Für 6 der KSHV-kodierten miRNAs wurde die absolute Kopienzahl (Kopien pro Zelle) in BCBL-1-Zellen bestimmt. Hierfür wurde unter Verwendung spezifischer Standards (synthetische miRNAs) die jeweilige miRNA-Kopienzahl pro μg RNA bestimmt. Außerdem wurde für die BCBL-1-Zelllinie die RNA-Menge berechnet, welche sich mit der verwendeten Methode (Trizol-Extraktion) durchschnittlich aus einer einzelnen Zelle isolieren lässt (35 pg RNA pro Zelle). Aus diesen Werten ließ sich auf die Kopienzahl pro Zelle zurückrechnen. Die Ergebnisse sind in der dritten Spalte von Tab. 2 zusammengefasst. Für drei der miRNAs, nämlich miRK12-3-5p, miRK12-4-3p und miRK12-6-5p, wurden dabei sehr hohe Kopienzahlen (≥ 10.000 Kopien pro Zelle) gefunden.

4.2 Etablierung eines Luciferase-Reportersystems

Für die Untersuchung von regulatorischen Effekten der KSHV-miRNAs durch Interaktionen mit den 3'UTRs zellulärer Gene wurde ein Luciferase basiertes Testsystem etabliert. Dieses basiert auf dem Vektor pScheck2-DEST (siehe Abschnitt 3.2.5.1), in welchen sich verschiedene 3'UTRs schnell und effizient hinter die kodierende Sequenz der Firefly-Luciferase (Fluc) klonieren lassen. Die 3'UTRs können unter Umständen regulatorisch auf die Luciferase wirken. Die Expressionsstärke der Firefly-Luciferase lässt sich mit Hilfe eines geeigneten Substrates im Lumiometer bestimmen.

4.2.1 Repression des Luciferase-Signals durch KSHV-kodierte miRNAs

Um abzuschätzen, wie stark die regulatorische Wirkung der KSHV-kodierten miRNAs ist, bzw. um für die verwendeten miRK10/12-Expressionsvektoren eine biologische Aktivität der kodierten miRNAs zu beweisen und um eine Positivkontrolle für spätere Experimente zu haben, wurden pScheck2-Reporterkonstrukte hergestellt, welche eine komplementäre Sequenz gegen die miRNA miRK12-4-3p besitzen (siehe Abschnitt 3.2.5.2). Die komplementäre Sequenz war in einem Fall perfekt (Abb. 11 A) und enthielt im anderen Fall drei Fehlpaarungen (Abb. 11 B). Wenn die beiden Reporterkonstrukte mit dem KSHV-miRNA exprimierenden Vektor pcDNAmiRK10/12 in HEK 293-Zellen kotransfiziert wurden, so wurde das Luciferase-Signal im Vergleich zur Kontrolle in beiden Fällen deutlich abgeschwächt. Die Repression betrug im Fall des perfekt komplementären Konstruktes 88% und bei dem nicht vollständig komplementären Konstrukt 73% (Abb. 11 C). Auch für drei weitere miRNAs wurde ein entsprechendes (unvollständig komplementäres) Reporterkonstrukt hergestellt und getestet: miRK12-1 (63% Repression), miRK12-6-3p (63% Repression) und miRK12-11 (57% Repression).

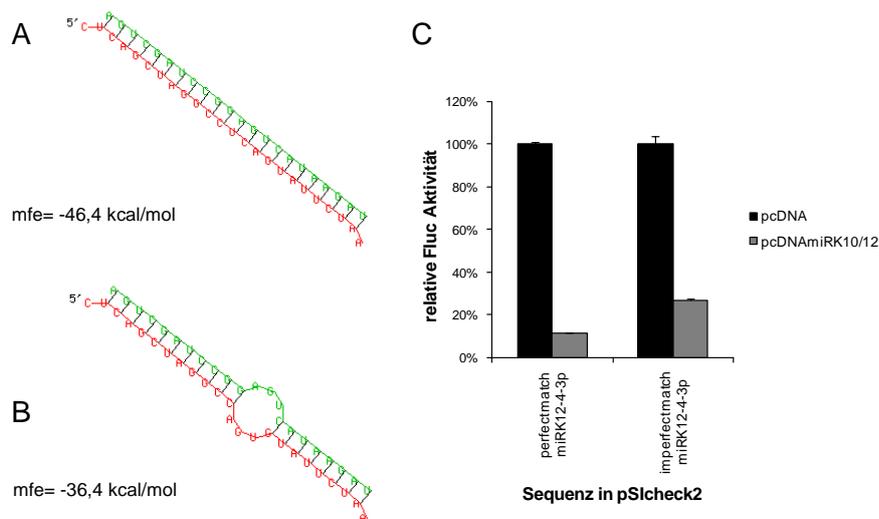


Abb. 11: Repression des Luciferase Signals durch miRK12-4-3p

Gezeigt sind die vorhergesagten Interaktionen zwischen der miRNA miRK12-4-3p (grün) und der perfekt komplementären Ziel-Sequenz (A, rot) bzw. der unvollständigen Target-Sequenz (B, rot). Die mittleren freien Energien (mfe) betragen jeweils -46,4 kcal/mol bzw. -36,4 kcal/mol. Die Vorhersagen wurden mit dem RNA-Hybrid-Algorithmus¹⁷³ berechnet.

(C) Die Kontroll-Luciferasevektoren wurden mit dem KSHV-miRNA exprimierenden Vektor pcDNAmiRK10/12 kotransfiziert (grau). Dabei wurde das Luciferase-Signal durch die miRNA herunterreguliert. Als Kontrolle wurde der leere Vektor pcDNA benutzt (schwarz). Bei perfekter Komplementarität war das Luciferase-Signal um 88% reduziert, bei imperfekter Komplementarität um 73%.

4.2.2 Derepression des Luciferase-Signals durch 2'-O-Methyl RNAs

Regulatorische Effekte, welche durch miRNAs vermittelt werden, lassen sich durch sequenzspezifische Inhibition der betreffenden miRNA aufheben. Als Inhibitor lassen sich RNA-Oligonukleotide verwenden, deren Basen durch eine 2'-O-Methylgruppe modifiziert und deren Sequenz komplementär zu der betreffenden miRNA ist (sogenannte AntagomiRs). Um dieses System zu etablieren, wurden AntagomiRs gegen die entsprechenden KSHV-kodierten miRNAs synthetisiert. Als Kontrolle diente ein AntagomiR gegen die EBV-kodierte miRNA BHRF-1. Anhand der im letzten Abschnitt gezeigten Interaktion zwischen der miRNA miRK12-4-3p und den komplementären Sequenzen wurde getestet, welches Transfektionsreagenz am besten für die AntagomiRs geeignet ist und wie hoch die optimale Konzentration der AntagomiRs ist. Aus Abb. 12 A ist ersichtlich, dass nur bei der Verwendung von Lipofectamin 2000 eine nahezu vollständige Derepression des Luciferase-Signals erreicht werden konnte. Abb. 12 B zeigt die dosisabhängige Derepression des Reporterkonstrukts. Bei einer Konzentration von 50pmol 2'-O-Methyl RNA pro Transfektionsansatz (in 500µl, entsprechend 100nM), war die maximale Derepression erreicht. Aus diesen Ergebnissen wurde die Standard-Transfektionsmethode entwickelt, die in Abschnitt 3.2.5.4 beschrieben ist und welche für alle weiteren Luciferase-Experimente verwendet wurde.

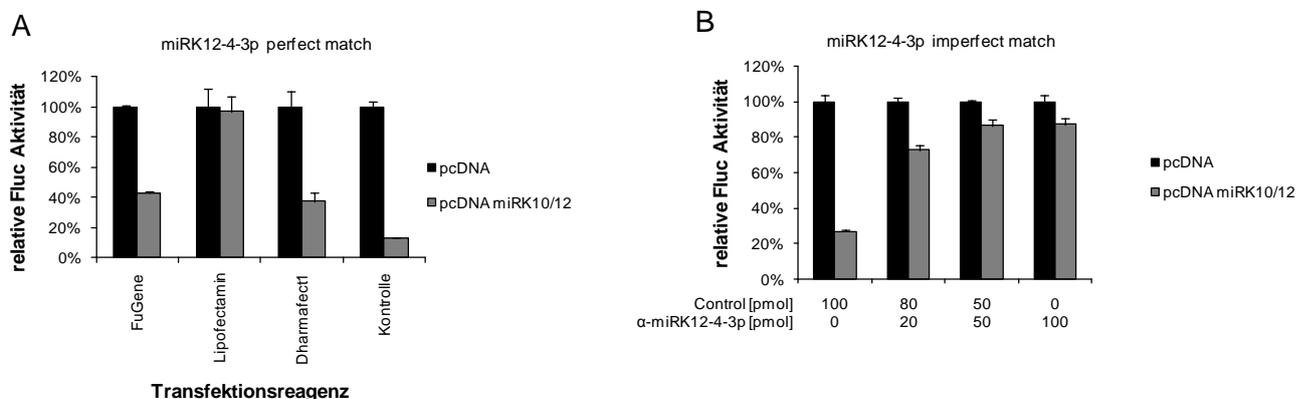


Abb. 12: Transfektion von 2'-O-Methyl RNAs

(A). 50 pmol des spezifischen AntagomiRs gegen miRK12-4-3p wurden unter Verwendung verschiedener Transfektionsreagenzien in HEK 293-Zellen transfiziert. Die Kontrolle wurde ohne Transfektionsreagenz durchgeführt. Anschließend wurde der Luciferase-Reporter (miRK12-4-3p perfect match) mit dem KSHV miRNA-Expressionsvektor pcDNA miRK10/12 bzw. dem Kontrollvektor kotransfiziert.

(B) HEK 293-Zellen wurden unter Verwendung von Lipofectamin mit unterschiedlichen Konzentrationen des AntagomiRs gegen miRK12-4-3p transfiziert. Anschließend wurde der Luciferase-Reporter (miRK12-4-3p imperfect match) mit dem KSHV-miRNA-Expressionsvektor pcDNA miRK10/12 bzw. dem Kontrollvektor kotransfiziert. 50 pmol AntagomiR pro Transfektionsansatz (500µl) sind ausreichend, um eine nahezu vollständige Aufhebung des miRNA-Effektes zu vermitteln.

4.3 Microarray-Analysen identifizieren Caspase 3 als Ziel-Gen für KSHV-kodierte miRNAs

4.3.1 Microarray-Analysen der KSHV-miRNA exprimierenden Zelllinien

Die kanonische Wirkungsweise von miRNAs ist die Inhibition der Translation des betroffenen Proteins. Es ist aber auch bekannt, dass miRNAs die mRNAs ihrer Ziel-Gene destabilisieren können. Deshalb wurden RNA-Microarrays bereits erfolgreich angewendet, um Ziel-Gene für zelluläre miRNAs zu identifizieren¹³⁵. Aus diesem Grund wurde zunächst eine relativ einfache Strategie benutzt, um Ziel-Gene für die miRNAs von KSHV zu identifizieren: Ein genomweiter Microarray Screen, kombiniert mit einer bioinformatischen Analyse zum Auffinden von SEED-Sequenzen in den 3'UTRs der Kandidatengene. Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien EaHy-eGFP und EaHy-miRK10/12 bzw. die Zelllinien DG75-eGFP und DG75-miRK10/12 auf Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Arrays analysiert.

Aus den resultierenden Genlisten wurden die Transkripte ausgesucht, welche in die engere Wahl als Kandidaten für KSHV-miRNA-regulierte Gene kamen. Dies geschah nach folgenden Kriterien: Wenn Gene durch miRNAs reguliert werden, so ist ein destabilisierender Effekt auf die mRNAs nicht besonders stark. Daher wurden die Gene ausgesucht, welche in den Microarrays signifikant zwischen 1,7-fach und 4-fach durch KSHV-miRNAs herunter reguliert wurden. Da das Vorhandensein einer SEED-Paarung als eine wichtige Voraussetzung für miRNA-Regulation betrachtet wird, mussten die Transkripte mindestens einen solchen Match für KSHV-miRNAs aufweisen. Durch dieses Vorgehen wurden in der DG75-Zelllinie 463 Gene identifiziert, welche diesen Kriterien entsprachen. In der EaHy-Zelllinie waren es 825. Dabei gab es 93 Gene, welche in beiden Zelltypen reguliert waren. Die Gene, für welche diese Kriterien zutrafen, sind im Anhang 7.2 gezeigt.

4.3.2 Identifizierung der Caspase 3 als Ziel-Gen für KSHV-kodierte miRNAs

Aus den Listen, welche mit Hilfe der oben genannten Kriterien erstellt worden waren, wurden einige Gene für die Validierung ausgewählt. In erster Linie wurden diese aufgrund ihrer biologischen Funktion ausgesucht. Die 3'UTRs dieser Kandidaten wurden hinter das Luciferase-Gen des Vektors pScheck2-DEST kloniert. Insgesamt wurden 15 3'UTRs kloniert (Tab. 3). Die Luciferase-Assays wurden mindestens dreimal in Triplikaten durchgeführt. Als Positivkontrollen diente diesmal zusätzlich die 3'UTR des Genes SPP1, welches in einer vorhergehenden Publikation als Zielgen für KSHV-miRNAs identifiziert worden war¹⁸⁴. Von allen klonierten Kandidaten verursachten allerdings nur zwei 3'UTRs, nämlich jene der Caspase 3 (Casp3) und des RAD51-assoziierten Proteins, eine reproduzierbare und klare Repression

der Luciferase-Aktivität, wenn sie mit den KSHV-miRNAs kotransfiziert wurde (Abb. 13). Alle anderen 3'UTRs verursachten keinen messbaren Effekt (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3: Kandidaten für Luciferase Assays

Die Tabelle enthält die Gene, deren 3'UTRs für die Untersuchung des Einflusses von KSHV-kodierten miRNAs in den Vektor pSIcheck2 kloniert wurden.

Gensymbol	Gen Name	Ergebnis
CCNT2	Cyclin T2	Nicht reguliert
CDC7	cell division cycle 7 homolog	Nicht reguliert
CENPF	centromere protein F	Nicht reguliert
NEK3	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 3	Nicht reguliert
FANCG	Fanconi anemia, complementation group G	Nicht reguliert
RBBP5	retinoblastoma binding protein 5	Nicht reguliert
TTK	TTK protein kinase	Nicht reguliert
MCM4	minichromosome maintenance complex component 4	Nicht reguliert
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	Nicht reguliert
MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog	Nicht reguliert
TNFAIP1	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1	Nicht reguliert
CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	Reguliert (siehe Abb. 13)
IRF2	interferon regulatory factor 2	Nicht reguliert
TBK1	TANK-binding kinase 1	Nicht reguliert
RAD51AP1	RAD51 associated protein 1	Reguliert (siehe Abb. 13)

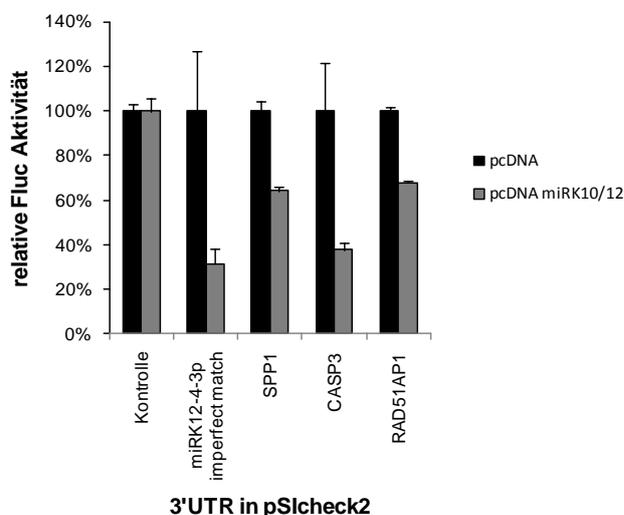


Abb. 13: Die Caspase 3 wird durch die miRNAs von KSHV reguliert

Die 3'UTRs der ausgewählten Transkripte wurden in den Luciferase-Reporter pSIcheck2 kloniert, welcher zusammen mit dem KSHV-miRNA-Expressionsvektor (grau) bzw. einem Kontrollvektor (schwarz) transfiziert wurde. Die Ko-Expression von KSHV-kodierten miRNAs führt zu einer klaren Repression des Luciferase-Signals bei dem Luciferase-CASP3-3'UTR-Fusionskonstrukt. Als Kontrolle diente neben dem Konstrukt mit der unvollständig komplementären miRK12-4-3p-Bindestelle die 3'UTR von SPP1. SPP1 war in einer früheren Publikation¹⁸⁵ als Zielgen für KSHV-kodierte miRNAs identifiziert worden.

4.3.3 Zelluläre Caspase 3 wird durch KSHV-miRNAs reguliert

Um den Effekt der KSHV-miRNAs auf die endogene Caspase 3 zu messen, wurden mit Hilfe des lentiviralen Transduktions-Systems HUVEC-Zelllinien hergestellt, welche die intronischen KSHV-miRNAs stabil exprimieren. In diesen Zellen konnte eine Reduktion der endogenen Caspase 3 im Vergleich zu der eGFP-Kontrolle um 60% beobachtet werden (Abb. 14).

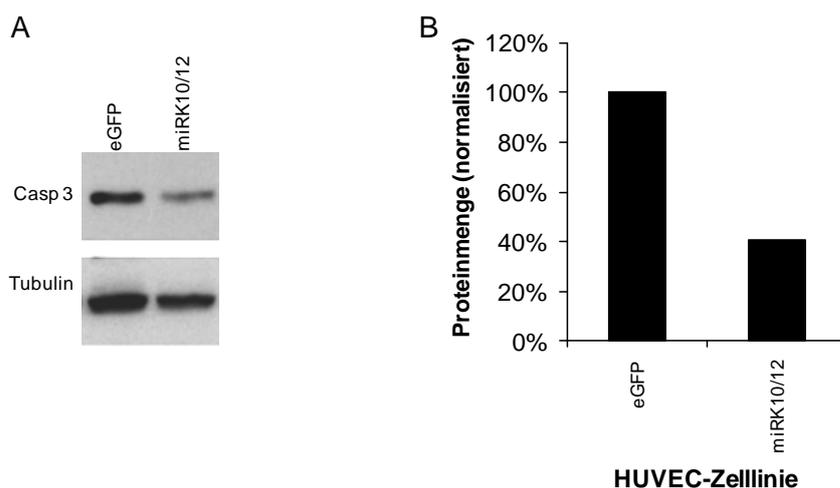


Abb. 14: Die endogene Caspase 3 in HUVEC-Zellen wird durch KSHV miRNAs reguliert

(A) Mit Hilfe rekombinanter Lentiviren wurden HUVEC-Zelllinien hergestellt, welche entweder eGFP oder die intronischen KSHV-miRNAs exprimieren. Aus den Zellen wurden Lysate hergestellt, welche mittels Western Blot mit einem Casp3-spezifischen Antikörper analysiert wurden. (B) Die Proteinmengen wurden densitometrisch bestimmt und auf die Intensitäten der Tubulin-Banden normalisiert. In HUVEC Zellen, welche eGFP oder die intronischen miRNAs von KSHV exprimieren, wird die Caspase 3 um ca. 60% herunter reguliert. (Zelllinien und Western-Blot: Liisa Lappalainen).

4.3.4 miRNAs von KSHV inhibieren die chemisch induzierte Apoptose

Die Caspase 3 spielt eine Schlüsselrolle während des programmierten Zelltodes. Es ist eines der wichtigsten Proteine der Apoptose. Als Effektor-Caspase spaltet es eine Reihe von Schlüsselenzymen der Apoptose^{51,206}. Die Daten im letzten Abschnitt gaben einen starken Hinweis darauf, dass die miRNAs von KSHV einen direkten negativen regulatorischen Einfluss auf Caspase 3 besitzen. Daher stellte sich natürlich die Frage, ob diese miRNAs auch eine messbare Auswirkung auf die zelluläre Apoptose haben. Die folgenden Experimente, welche zur Beantwortung dieser Fragen durchgeführt wurden, entstanden in enger Zusammenarbeit mit Guillaume Suffert aus dem Labor von Sébastien Pfeffer (IBMP, Strasbourg) und Liisa Lappalainen aus dem Labor von Päivi Ojala (Biomedicum, Helsinki).

Es wurde untersucht, ob die KSHV-kodierten miRNAs die Zelle vor Apoptose schützen können. Zu diesem Zweck wurde mit dem Vektor pcDNA miRK10/12 eine HEK293-Zelllinie her-

gestellt, welche die intronischen miRNAs von KSHV nach Induktion durch Doxycyclin exprimiert. Dazu wurde das Flp-In T-Rex-293-System (Invitrogen) verwendet. Als Kontrolle diente eine Zelllinie, die mit dem leeren Vektor pcDNA5 hergestellt worden war. Die induzierbare Expression der miRNAs wurde mittels Northern Blot nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Im ersten Experiment wurden die Zellen mit Staurosporin, einem gut charakterisierten Apoptose-Induktor¹⁹¹, behandelt. Die Zellen wurden dazu in Doxycyclin-haltigem Medium kultiviert und für 8 Stunden mit Staurosporin bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert. Um den Effekt dieser Behandlung auf die Apoptose zu messen, wurde Allophycocyanin (APC)-markiertes Annexin-V benutzt. Dieses bindet an Phosphatidylserin, einen Oberflächenmarker auf frühen apoptotischen Zellen¹¹⁷. Zusätzlich wurden die Zellen mit Propidiumjodid, einem Marker für nekrotische bzw. spät apoptotische Zellen, gefärbt.

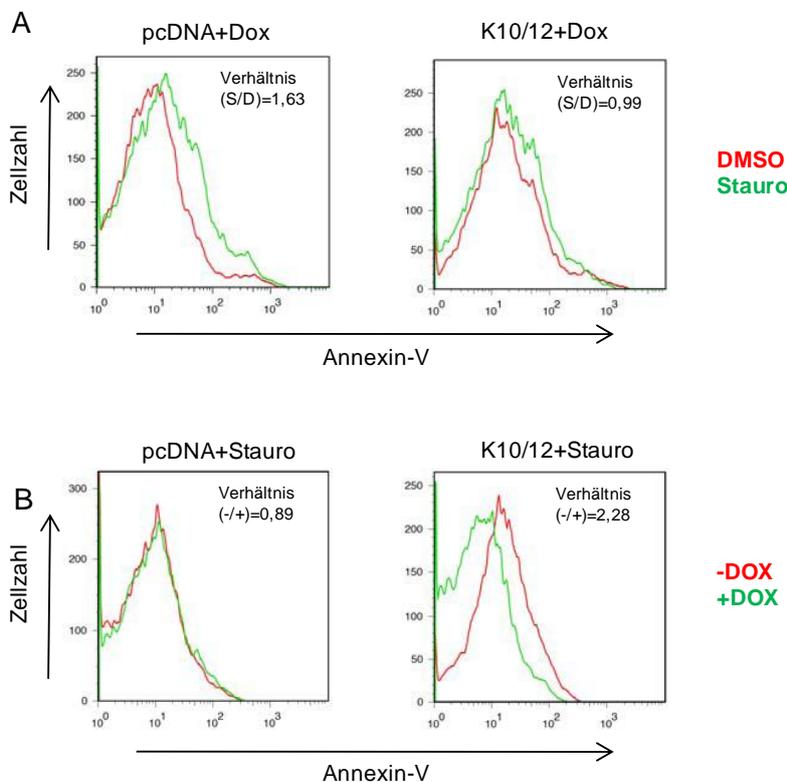


Abb. 15: KSHV-miRNAs vermindern die Staurosporin-induzierte Apoptose in HEK293-Zellen

(A) Je 10^5 Zellen wurden mit Doxycyclin ($1\mu\text{g/ml}$) induziert, für 8 Stunden mit Staurosporin ($5\mu\text{M}$) bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert und anschließend für 15 min mit Annexin-V-APC (BD-Biosciences, 1:100) gefärbt. In den K10/12-Zellen wird, im Gegensatz zur Kontrolle, durch Staurosporin keine Apoptose induziert. (B) Je 10^5 Zellen wurden entweder mit Doxycyclin ($1\mu\text{g/ml}$) inkubiert oder nicht induziert. Anschließend wurde die mit $5\mu\text{M}$ Staurosporin für 8 Stunden induziert, und die Zellen wurden dann für 15 min mit Annexin-V-APC (BD-Biosciences, 1:100) gefärbt. Die Induktion der Genexpression durch Doxycyclin führt in den K10/12-Zellen zu einer Hemmung der Staurosporin-induzierten Apoptose, angezeigt durch eine Verminderung der Annexin-V-Expression. Das APC-Signal wurde in beiden Experimenten durch FACS-Analyse gemessen. Das Gate wurde so gesetzt, dass nekrotische Zellen (Positive Propidiumjodidfärbung) nicht gemessen wurden. Es wurden je 30.000 Ereignisse gemessen (Guillaume Suffert).

Durchflusszytometrische Analysen ergaben, dass die Kontrollzellen eine verstärkte Annexin-V-Bindung im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle zeigten. Im Gegensatz dazu zeigten die KSHV-miRNA exprimierenden Zellen keine signifikante Verschiebung der Annexin-V-Bindung (Abb. 15 A). In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss der Induktion der miRNA-Expression gezeigt (Abb. 15 B). Hierbei wurde die Apoptose in allen Zellen durch Staurosporin induziert und die Zellen ebenfalls mit Annexin-V-APC und Propidiumjodid gefärbt. Wenn die miRNA-Expression durch Zugabe von Doxycyclin induziert wurde, so war eine deutliche Verminderung der Apoptose-Induktion im Gegensatz zu den Nicht-induzierten Zellen zu sehen.

Darüber hinaus wurde der Effekt der KSHV-miRNA-Expression auf die B-Lymphozyten Zelllinie DG75 untersucht. Die Behandlung mit 5 μ M Staurosporin induzierte deutlich die Annexin-V-Bindung auf den DG75 eGFP-Zellen. Dieser Effekt war in den KSHV-miRNA (miRK10/12) exprimierenden Zelllinien deutlich reduziert (Abb. 16).

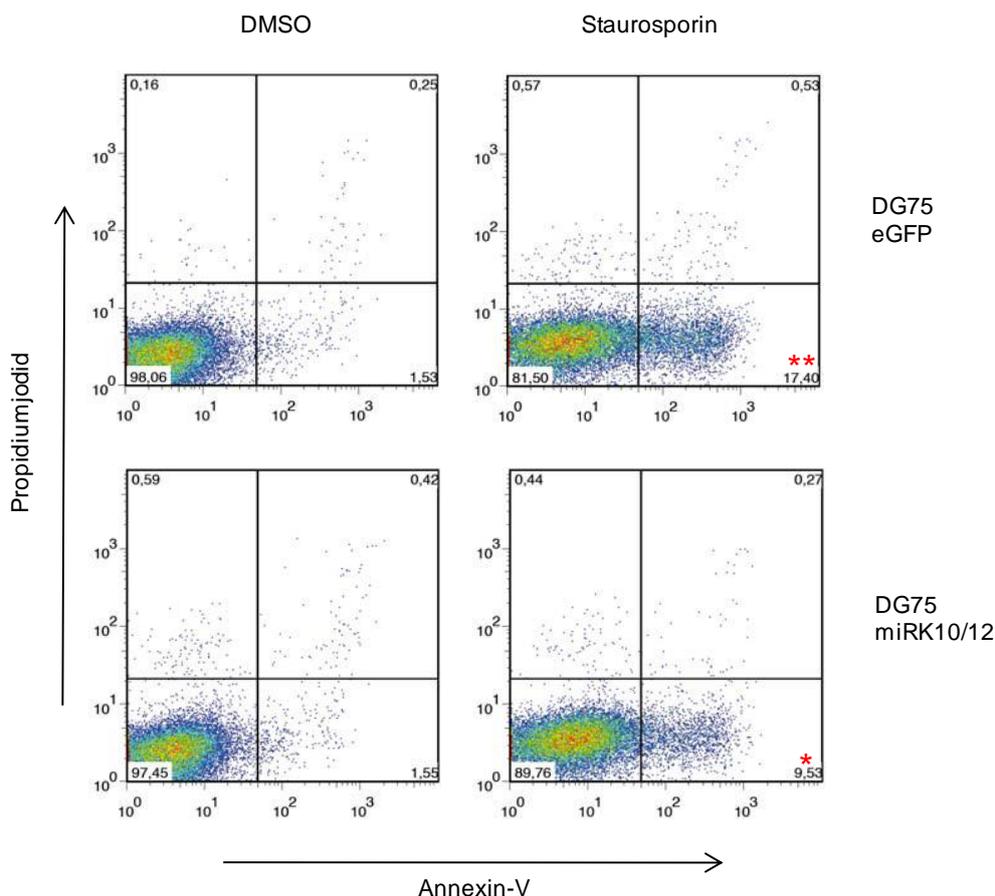


Abb. 16: KSHV-miRNAs vermindern die Staurosporin-induzierte Apoptose in B-Zellen

Die eGFP bzw. miRK10/12 exprimierenden DG75-Zelllinien wurden 8 Stunden lang mit DMSO bzw. 5 μ M Staurosporin behandelt, und das Signal von Annexin-V bzw. Propidiumjodid wurde durch FACS-Analyse gemessen. Im Fall der KSHV-miRNA exprimierenden DG75-Zelllinie (*) wird, im Vergleich zur Kontrolle (**), bei 45% weniger Zellen die Apoptose induziert (Guillaume Suffert).

4.3.5 KSHV-miRNAs inhibieren die Aktivität der zellulären Caspase 3

Zuletzt untersuchten wir auch noch die Aktivität der Effektor-Caspasen durch die Verwendung von DEVD-Aminoluciferin. Dabei handelt es sich um ein Substrat für Casp3 und Casp7, dessen Umsatz in einem Luciferase-Assay messbar ist. In Abb. 17 ist erkennbar, dass die Casp3/7-Aktivitäten nach der Induktion der KSHV-miRNA-Expression mit Doxycyclin deutlich absinken, während sie in der Kontrolle (ein Vektor welcher die zelluläre miR206 exprimiert) nahezu unverändert bleibt.

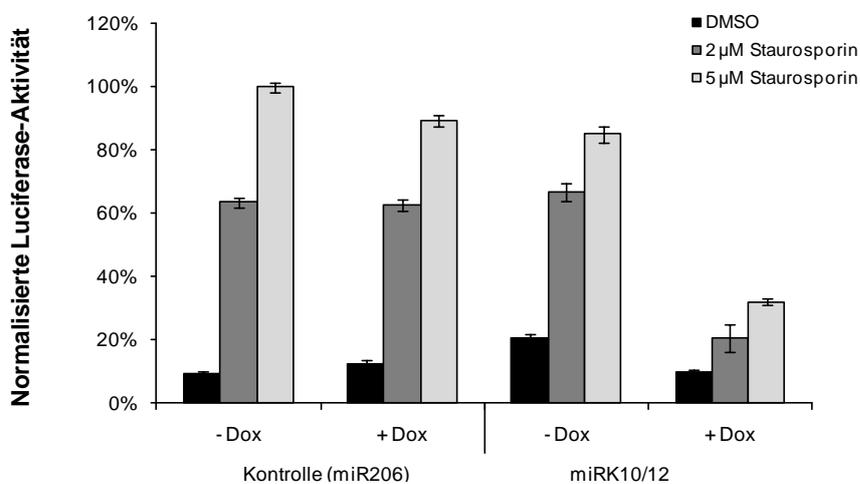


Abb. 17: KSHV-miRNAs inhibieren die Caspase 3/7-Aktivität in HEK293-Zellen

Die induzierbaren HEK293-Zellen, welche entweder die Kontrolle miR 206 oder die intronischen KSHV-kodierten miRNAs exprimieren, wurden entweder mit oder ohne Doxycyclin kultiviert und für 8 Stunden mit DMSO oder 2 µg bzw. 5 µg Staurosporin behandelt. Die Casp3/7-Aktivität wurde im Anschluss gemessen und gegen die Gesamtproteinmenge normalisiert. Die prozentualen Ergebnisse sind relativ zum stärksten gemessenen Wert (Kontrolle (miR206), -Dox, 5 µM Staurosporin) angegeben (Guillaume Suffert).

Mit diesen Experimenten wurde gezeigt, dass die miRNAs von KSHV die Caspase3 regulieren können, was sich in einer verminderten Proteinmenge und einer verminderten Aktivität ausdrückt. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Expression von KSHV-miRNAs die Apoptose inhibieren kann. Ob dabei ein unmittelbarer Zusammenhang besteht und ob die Caspase 3 dabei der einzige apoptotische Faktor ist, welcher durch die KSHV-miRNAs reguliert wird, muss in weiteren Experimenten gezeigt werden.

4.4 Identifizierung von Ziel-Genen von KSHV-miRNAs durch RISC-Immunpräzipitation

4.4.1 RISC-Immunpräzipitation aus humanen B-Zellen

In den letzten Abschnitten wurde gezeigt, dass es grundsätzlich möglich ist, Zielgene für KSHV-miRNAs zu identifizieren, wenn mittels Microarrays die Gesamt-RNA aus KSHV-miRNA exprimierenden Zellen analysiert wird. Diese Methode hat aber auch etliche Nachteile, da sie wenig spezifisch und fehleranfällig ist. Daher wurde versucht, für diesen Zweck eine bessere Methode zu etablieren.

In mehreren aktuellen Publikationen wurde die Immunpräzipitation von RISC-Komplexen, gefolgt von Microarray-Analysen der gefällten mRNAs, angewendet, um Ziel-Gene für zelluläre miRNAs zu identifizieren^{11,18,109,110}. Mit Hilfe eines kürzlich beschriebenen monoklonalen Antikörpers gegen das humane Argonaute-Protein AGO2 (α -Ago2; 11A9)¹⁸¹ wurde ein optimiertes Protokoll etabliert, welches es ermöglicht, RISC-Komplexe zu reinigen. In der Folge sollten daran gebundene miRNAs und mRNAs isoliert werden (RISC-Immunpräzipitation, abgekürzt: RISC-IP). Ein monoklonaler Antikörper gegen BrdU (Abcam) diene in allen Experimenten als Kontrolle für unspezifische Isolierung von RNA. Die Methode ist in Abschnitt 3.2.7.2 beschrieben. Die RNA, welche aus den Präzipitationen gewonnen wurde, konnte durch Microarray Analysen oder durch quantitative PCRs untersucht werden.

4.4.2 Anreicherung von miRNAs durch RISC Immunpräzipitation

Damit die KSHV-kodierten miRNAs ihre biologische Funktion entfalten können, müssen sie an die RISC-Komplexe gebunden werden. Um zu untersuchen, ob dies für die miRNAs von KSHV nachweisbar ist, wurden die RISC-Komplexe aus der Zelllinie DG75miRK10/12 mit Hilfe des AGO2-Antikörpers präzipitiert und die daran gebundene RNA isoliert. Parallel dazu wurde Gesamt-RNA aus dieser Zelllinie isoliert. Die isolierten KSHV-kodierten miRNAs wurden durch die in Abschnitt 4.1.2.2 beschriebene Methode quantifiziert. Analog zu den dort beschriebenen Experimenten konnten die Anreicherungsfaktoren durch Vergleich der C_T -Werte nach den folgenden Formeln berechnet werden:

$$\text{Anreicherung} = 1,81^{(Ct_{\text{GesamtRNA}}) - (Ct_{\text{AGO2IP}})}$$

bzw.

$$\text{Anreicherung} = 1,81^{Ct_{\text{BrdU Kontrolle}} - Ct_{\text{AGO2IP}}}$$

Aus Tab. 4 ist ersichtlich, dass sich durch RISC-Immunpräzipitationen alle untersuchten miRNAs deutlich anreichern lassen. Das bedeutet, dass sie mit den Proteinen des RISC-Komplexes assoziiert sind. Dies war zum einen ein weiterer deutlicher Hinweis darauf, dass die KSHV-kodierten miRNAs in humanen B-Zellen biologisch aktiv sind, zum anderen zeigte es auch, dass das verwendete Protokoll für die Isolierung von RISC-Komplexen geeignet ist.

Tab. 4: Anreicherung von KSHV-kodierten miRNAs durch RISC-Immunpräzipitation

Die C_t -Werte sind jeweils für die qPCRs mit Gesamt-RNA, der RISC-Immunpräzipitation und der Kontroll-Immunpräzipitation angegeben. Aus den C_t -Werten lässt sich der Anreicherungsfaktor der miRNA zwischen der Gesamt-RNA und der RISC-Immunpräzipitation berechnen (Fettdruck). Der in Klammern angegebene Wert bezeichnet die Anreicherung der miRNAs bei der RISC-Immunpräzipitation gegenüber der BrdU-Kontroll-Präzipitation.

	DG75miRK10/12			RISC-IP Anreicherungsfaktor
	C_t AGO2 IP	C_t Gesamt RNA	C_t BrdU Kontrolle	
5.8S (Kontrolle)	21,8	20,2	24	-2,5 (-9,5)
miRK12-1	27,1	31,5	34,9	13,6 (102,3)
miRK12-2	23,7	30,6	34,1	60,0 (478,5)
miRK12-3-5p	21,5	27,5	29,2	35,2 (96,4)
miRK12-4-5p	31,9	37,5	40,0	27,7 (122,2)
miRK12-4-3p	23,5	31,5	33,0	115,2 (280,5)
miRK12-6-5p	26,1	31,8	33,9	29,4 (102,3)
miRK12-6-3p	24,7	29,9	31,7	21,8 (63,6)
miRK12-9-5p	27,1	33,0	35,2	33,1 (122,2)

4.4.3 Microarray Analysen der RISC-Immunpräzipitationen

Um die Gene zu identifizieren, deren mRNA nach der Expression von KSHV-miRNAs an den RISC-Komplex angelagert werden, also höchstwahrscheinlich Ziel-Gene für diese miRNAs darstellen, wurden Microarray-Analysen durchgeführt. Dazu wurde wiederum der AGO2-spezifische Antikörper benutzt, um die RISC-Komplexe aus den Zelllinien DG75-eGFP, DG75miRK10/12 und BCBL-1 zu isolieren. Der BrdU-spezifische Antikörper wurde für die Kontrollen benutzt. Sowohl bei den spezifischen Fällungen, als auch bei der Kontrolle wurden ca. 200-400 ng RNA gewonnen. Für die RNA aus der unspezifischen Fällung wurde angenommen, dass sie die Expressionsprofile der Gesamt-RNA repräsentiert. Die isolierte RNA wurde jeweils in Duplikaten analysiert, und die Anreicherung von Transkripten in den spezifischen RISC-IPs gegenüber der BrdU-Kontrolle wurde berechnet.

4.4.3.1 Identifizierung von Ziel-Genen für zelluläre miRNAs

Die Microarray-Analysen ergaben eine große Anzahl Transkripte, welche sich spezifisch durch die RISC-Immunpräzipitationen anreichern ließen. Für die mRNAs, welche auch in den

Kontroll-Zelllinien durch den AGO2-spezifischen Antikörper angereichert werden konnten, wurde angenommen, dass es sich dabei um Ziel-Gene für zelluläre miRNAs handelt. Um zu testen, ab welchem Anreicherungsfaktor tatsächlich von Ziel-Genen für miRNAs ausgegangen werden kann, wurden untersucht, ob in diesen Transkripten die Bindestellen für zelluläre miRNAs überrepräsentiert sind. Um eine ausreichende Datenmenge für die Berechnungen zu erhalten, wurden nicht nur Microarray-Daten von den BCBL-1- und DG75-Zelllinien verwendet sondern auch noch von weiteren B-Zelllinien (BL41, BL41B95.8, Jijoye), welche für eine Parallelstudie an EBV verwendet wurden. Für die Untersuchung wurde der PITA- (Probability of Interaction by Target Accessibility) Algorithmus benutzt¹¹¹ (siehe Abschnitt 3.2.3). Dazu wurden die Sequenzen der zellulären miRNAs, welche in der Zelllinie DG75 und anderen B-Zelllinien (BL41 und BL41B95.8) exprimiert sind, von dem miRNA-Expressionsatlas¹²⁵ heruntergeladen. Insgesamt ergaben sich dabei 44 zelluläre miRNAs, welche in allen drei Zelllinien exprimiert werden. (siehe Anhang 7.1). Für BCBL-1 und Jijoye waren keine miRNA-Expressionsdaten vorhanden. Mit PITA wurden die 3'UTRs der angereicherten Gene dahingehend untersucht, ob sich auf ihnen energetisch begünstigte Bindestellen für die zellulären miRNAs befinden. Die Berechnungen wurden mit unterschiedlichen Parametern ($\Delta\Delta G$ -Schwellenwerten von 0 unter Verwendung von unterschiedlichen $\Delta\Delta G$ -Schwellenwerten (0 kcal/mol - 10 kcal/mol) durchgeführt. $\Delta\Delta G$ bezeichnet dabei die Interaktionsenergie und ergibt sich aus der Differenz der freien Energie der Sekundärstruktur des Transkriptes und der freien Energie der miRNA-Bindung an das Transkript. Abb. 18 zeigt die Quotenverhältnisse („Odds-ratios“) der vorhergesagten miRNA-Bindestellen für jene Transkripte, welche in den Zelllinien um einen durchschnittlichen Wert von 0,8 bis 3-fach angereichert waren. Man sieht, dass die Bindestellen bereits für Transkripte mit niedrigen Anreicherungsfaktoren hochsignifikant überrepräsentiert waren (Die p-Werte für alle mindestens 1,2x angereicherten Gene sind in Anhang 7.3 angegeben). Erst ab kleinerer Anreicherung als 1,2x ist eine deutliche Verringerung des Quotenverhältnisses zu erkennen, was in diesem Bereich auf ein vermehrtes Vorhandensein von Transkripten ohne vorhergesagte Bindestellen für zelluläre miRNAs hindeutet. Da diese Tendenz bei höheren $\Delta\Delta G$ -Werten bereits für Anreicherungsfaktoren $<1,5$ beobachtet werden kann, wurde der Anreicherungsfaktor von 1,5x als Schwellenwert für miRNA-regulierte Gene angenommen. Somit konnten mit höherer Stringenz die Transkripte ausgeschlossen werden, welche nicht durch miRNAs reguliert werden. Die Daten zeigen, dass es mit Hilfe der Microarray-Analyse von RISC-IPs unter der Verwendung bestimmter Parameter möglich ist, Ziel-Gene für miRNAs in B-Zellen zu identifizieren.

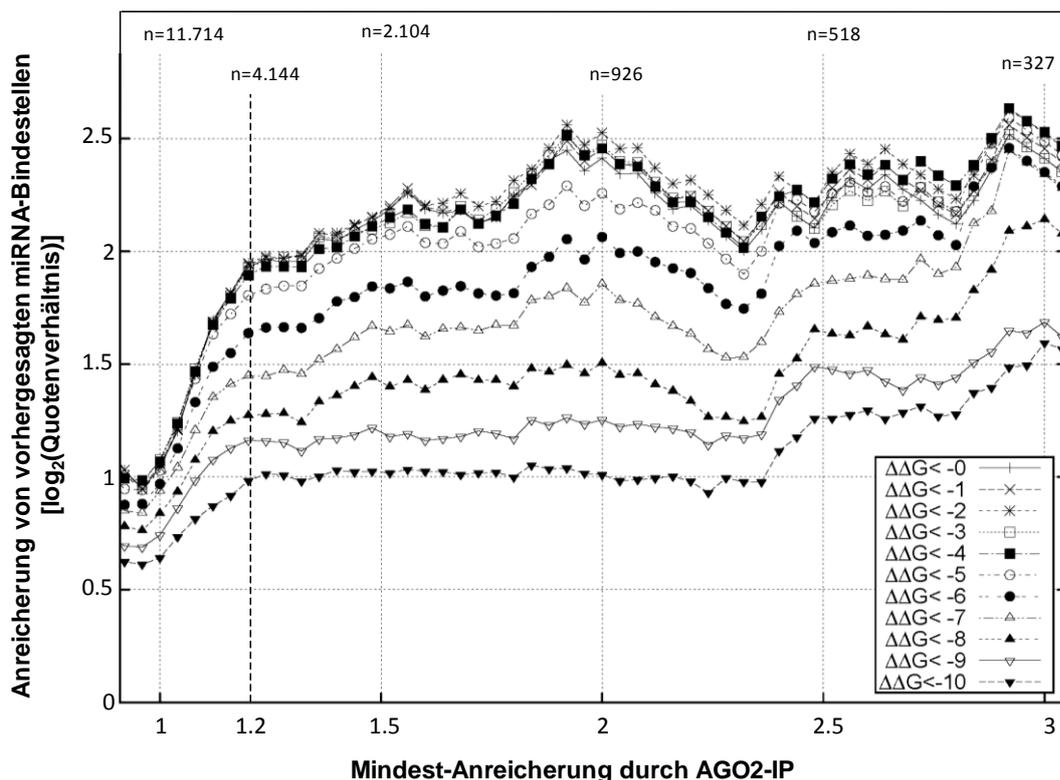


Abb. 18: Überrepräsentation vorhergesagter Bindestellen für zelluläre miRNAs

Mit den RNAs aus RISC-IPs unterschiedlicher B-Zelllinien wurden Microarray-Analysen durchgeführt. In B-Zellen exprimierte, zelluläre miRNAs wurden dem miRNA-Expressions-Atlas¹²⁵ entnommen. Bindestellen dieser miRNAs auf den 3'UTRs von Transkripten, welche durch die IP angereichert worden waren, wurden mit Hilfe der PITA-Software unter Verwendung unterschiedlicher $\Delta\Delta G$ -Schwellenwerte analysiert. Die Anreicherung von vorhergesagten Bindestellen wurde durch das Quotenverhältnis (siehe Abschnitt 3.2.3) ausgedrückt und auf der y-Achse aufgetragen. Auf der x-Achse ist angegeben, um welchen Faktor die Gene mindestens angereichert waren (Durchschnitt aller Zelllinien) und wie groß die entsprechende Gruppe war (n). Ein merklicher Abfall des Quotenverhältnisses ist für Transkripte mit einem Anreicherungsfaktor $< 1,2$ zu sehen. Die Einheit für die angegebenen $\Delta\Delta G$ -Werte ist kCal/mol. Die p-Werte wurden durch den „Exakten Fischer-Test“ (siehe Abschnitt 3.2.3) bestimmt und sind für den Schwellenwert „mindestens 1,2-fache Anreicherung“ in Anhang 7.3 gezeigt.

4.4.3.2 Identifizierung von Ziel-Genen für KSHV-kodierte miRNAs

Ziel-Gene für virale miRNAs können entweder ausschließlich von viralen miRNAs oder zusätzlich von zellulären miRNAs reguliert werden. Im ersten Fall sollten die Transkripte nur in den RISC-IPs angereichert sein, welche die viralen miRNAs exprimieren. Für Transkripte, welche sowohl von viralen als auch von zellulären miRNAs reguliert werden, sollte die Anreicherung in den BCBL-1- bzw. DG75miRK10/12-Zellen deutlich größer sein als in der Kontroll-Zelllinie DG75-eGFP. Um die Zahl der Falsch-Positiven möglichst gering zu halten, wurde eine Reihe stringenter Kriterien definiert, nach welchen ein Transkript als Ziel-Gen für KSHV-miRNAs eingestuft wurde. Diese sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Einige der Transkripte waren in BCBL-1 und in DG75miRK10/12 angereichert, andere nur in BCBL-1. Der Grund dafür war vermutlich einerseits die geringere Expressionsstärke der KSHV-miRNAs in DG75miRK10/12 (vgl. Tab. 2) und konnte andererseits auch an der Tatsache liegen, dass in dieser Zelllinie ausschließlich die intronischen KSHV-miRNAs exprimiert werden. Grundsätzlich wurden Transkripte auch dann als KSHV-miRNA reguliert betrachtet, wenn sie nur in der BCBL-1-Zelllinie angereichert waren.

Darüber hinaus sollte möglichst ausgeschlossen werden, dass Ziel-Gene für zelluläre miRNAs, welche durch die KSHV-Infektion induziert werden, als Falsch-Positive gedeutet wurden. Daher wurden alle Transkripte aussortiert, welche in den BrdU-Kontrollen der Immunpräzipitationen um mehr als einen Faktor 1,5x in BCBL-1 gegenüber DG75miRK10/12 angereichert waren.

Insgesamt konnten 72 Gene identifiziert werden, welche diesen Kriterien entsprachen. Diese sind in Anhang 7.4 aufgelistet.

Tab. 5: Kriterien für KSHV-miRNA-Ziel-Gene

Ziel-Gene für miRNAs mussten folgende Kriterien erfüllen:

1. KSHV-miRNA Ziel-Gene, welche nicht von zellulären miRNAs reguliert werden

- a) Durchschnittliche Anreicherung in DG75-eGFP: <1,2
- b) Durchschnittliche Anreicherung in BCBL-1: >3,0
- c₁) Durchschnittliche Anreicherung in DG75miRK10/12: >2,0 : Zeigt an, dass das Gen von einer der 10 intronischen miRNAs reguliert wird.
- c₂) Durchschnittliche Anreicherung in DG75miRK10/12: <2,0: Entweder ein Ziel-Gen für andere als die intronischen KSHV-miRNAs, oder der Grund ist die schwächere Expression von KSHV-miRNAs in der Zelllinie DG75miRK10/12.

2. KSHV-miRNA-Ziel-Gene, welche zusätzlich von zellulären miRNAs reguliert werden

- a) Anreicherung in DG75-eGFP: >1,2
- b) Anreicherung in BCBL-1 mindestens 3-fach stärker als in DG75-eGFP

3. Zusatzkriterium: Keine Induktion der Gene durch KSHV-Infektion

- Anreicherung in den BrdU-IPs von BCBL-1 nicht >1,5-fach höher als in den BrdU-IPs von DG75-eGFP

4.4.4 Validierung zellulärer KSHV-miRNA-Ziel-Gene durch TaqMan-PCR

Von den KSHV-miRNA-Ziel-Genen, welche im letzten Abschnitt als solche definiert worden waren, wurden 11 für die Validierung mittels TaqMan-PCRs ausgewählt. Dazu wurden nochmals RISC-Immunpräzipitationen für die drei Zelllinien in je zwei unabhängigen Replikaten durchgeführt. Die gewonnene RNA wurde in cDNAs umgeschrieben, welche für die quantitativen PCRs benutzt wurden. Die Expressionshöhe wurde jeweils auf das Gen HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, Accession-Number: NM_000194.2) normalisiert.

Bei HPRT handelt es sich um ein „house-keeping gene“, welches häufig als Referenz in TaqMan-Analysen eingesetzt wird, da es sehr konstante Expressionsstärken in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen und Gewebe zeigt⁷⁶. HPRT war außerdem in keiner Microarray-Analyse der AGO2-spezifischen RISC-IPs angereichert. Als Positivkontrollen dienten die mRNA von Cyclin E1 (CCNE1) und die nicht-kodierende RNA H19. Für beide wurde kürzlich gezeigt, dass ihre mRNAs in AGO2-IPs von HEK 293-Zellen angereichert sind²¹². Cyclin E1 ist außerdem als Ziel-Gen für die zellulären miRNAs hsa-miR-16 und hsa-miR-15a bekannt^{9,138}. Beide Transkripte sind in allen Zelllinien konstant etwa 8x angereichert (Abb. 19).

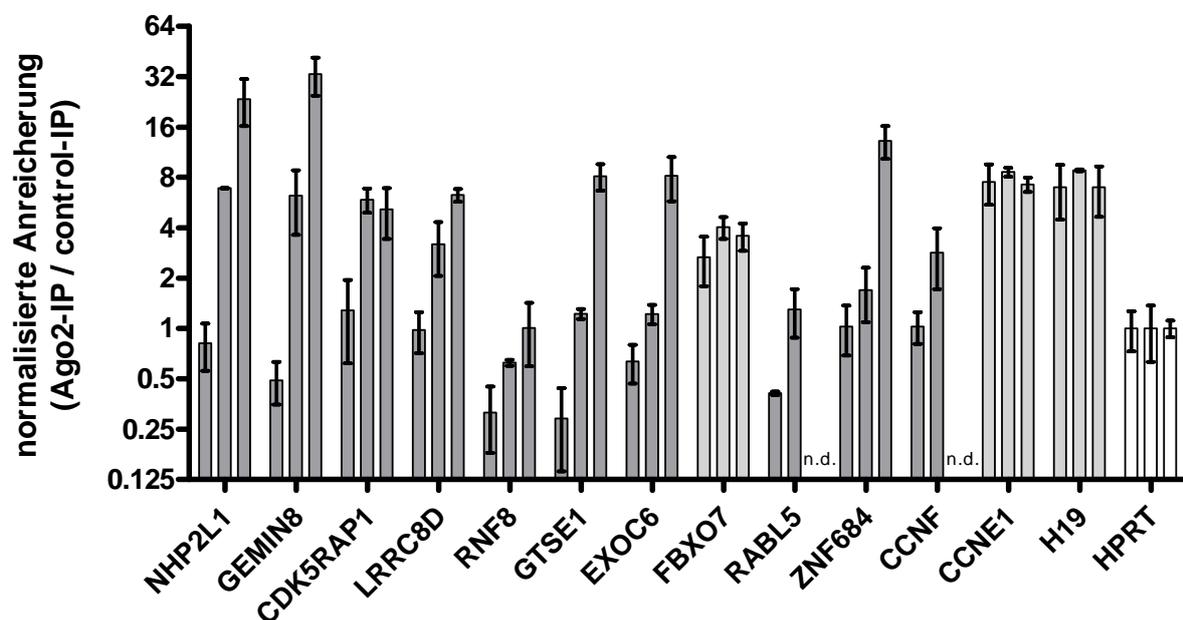


Abb. 19: Validierung von Ziel-Genen für KSHV-miRNAs durch TaqMan-PCR

Die durch RISC-Immünpräzipitation gewonnene RNA wurde revers transkribiert und mittels Real-Time-PCR analysiert. Gezeigt ist die Anreicherung der Transkripte in AGO2-Immünpräzipitationen gegenüber der Kontroll-IP in jeweils drei Zelllinien (DG75-eGFP: linker Balken, DG75miRK10/12: Mittlerer Balken, BCBL-1: Rechter Balken, n.d.: Nicht detektiert) nach Normalisierung auf das HPRT-Transkript. Transkripte mit deutlicher Anreicherung in DG75miRK10/12 und BCBL1 (KSHV-miRNA-Ziel-Gene) sind in Dunkelgrau, Ziel-Gene für zelluläre miRNAs in Hellgrau gezeichnet.

Für 9 der 11 KSHV-miRNA-Ziel-Gene war die Anreicherung sowohl in BCBL-1-Zellen, als auch in den DG75miRK10/12-Zellen signifikant. ZNF684 war nur in den BCBL-1-Zellen deutlich angereichert. Für RABL5 und CCNF lagen die Transkriptmengen bei den BCBL-1-Zellen unter der Nachweisgrenze, weshalb die Anreicherung in den AGO2-IPs in dieser Zelllinie nicht ordentlich quantifiziert werden konnte. In der DG75miRK10/12-Zelllinie wurde die Anreicherung aber bestätigt. Die spezifische Anreicherung konnte also für 10 von 11 Genen

durch TaqMan-PCRs bestätigt werden. Die niedrigere Expressionsstärke der KSHV-miRNAs in der Zelllinie DG75miRK10/12 gegenüber BCBL-1 (vgl. Tab. 1) spiegelte sich auch in der Stärke der Anreicherungen wieder. Das einzige Gen, welches nicht durch die TaqMan-PCRs als Ziel-Gen für KSHV-miRNAs bestätigt werden konnte, war FBXO7. Dieses war in allen Zelllinien in der AGO2-IP ca. 4-fach angereichert, ein Hinweis auf eine Regulation durch zelluläre miRNAs.

4.4.5 Luciferase-Assays bestätigen 4 von 6 Kandidaten als KSHV-miRNA-Ziel-Gene

Um zu bestätigen, dass es sich bei den in den letzten Abschnitten identifizierten Genen um Ziel-Gene für KSHV-kodierte miRNAs handelt, sollten die 3'UTRs der bestätigten Kandidaten in den Luciferase Vektor pScheck2-DEST kloniert werden. Für sechs von ihnen (NHP2L1, LRRC8D, EXOC6, GEMIN8, ZNF684 und CDK5RAP1) war die Klonierung erfolgreich. Mit den Reporter-Vektoren wurden Luciferase-Assays durchgeführt, indem sie zusammen mit dem KSHV-miRNA exprimierenden Vektor pcDNA-miRK10/12 in HEK 293-Zellen transfiziert wurden. Während die Expression der KSHV-miRNAs keinen Effekt auf die NHP2L1- und GEMIN8-Reporter-Konstrukte hatten, konnte in den restlichen eine signifikante Abschwächung des Luciferase-Signals beobachtet werden (Abb. 20). Die stärkste Inhibition wurde für den LRRC8D-Reporter beobachtet (~50%). Der Effekt auf die 3'UTR von CDK5RAP1 war relativ schwach (~15%), aber dennoch signifikant und reproduzierbar.

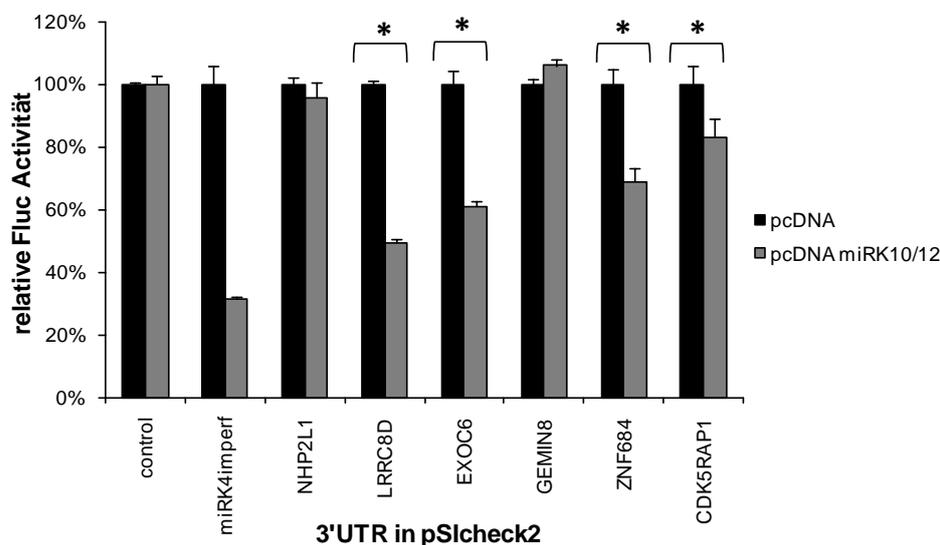


Abb. 20: Validierung von Ziel-Genen für KSHV-miRNAs durch Dual-Luciferase-Assays

Reportervektoren mit den 3'UTR-Sequenzen der Kandidatengene wurden entweder mit einer Kontrolle (schwarz) oder einem KSHV-miRNA exprimierenden Vektor (grau) in HEK 293-Zellen kotransfiziert. Vier der Kandidaten-3'UTRs (gekennzeichnet durch Sternchen) verursachten eine signifikante Repression der Firefly Luciferase-Expression. Als Negativkontrolle diente der Vektor pScheck2-DEST, als Positivkontrolle der Vektor pScheck2 mit der unvollständig komplementären Sequenz für KSHV-miRK12-4-3p.

4.4.6 miRK12-3-5p reguliert LRRC8D über eine einzelne Bindestelle in der 3'UTR

LRRC8D (LRRC5) ist ein leucinreiches Typ III-Transmembranprotein, welches wahrscheinlich bei der Proliferation und Aktivierung von Lymphocyten und Makrophagen eine Rolle spielt¹²¹. Berechnungen möglicher Bindungen der KSHV-miRNAs an die 3'UTR von LRRC8D mit Hilfe des RNA-Hybrid-Algorithmus führten zur Vorhersage einer starken Interaktion zwischen miRK12-3-5p und der 3'UTR (minimale freie Energie: -28,4kcal/mol; Abb. 21 A+B; Anhang 7.6). Um zu überprüfen, ob die Expression von miRK12-3-5p für die Regulation der Luciferase-Aktivität in dem LRRC8D-3'UTR-Reporterkonstrukt verantwortlich ist, wurden Derepressionsanalysen mit Hilfe einer zu miRK12-3-5p komplementären 2'-O-Methyl-RNA, durchgeführt. Die Inhibition von miRK12-3-5p führte zu einer konzentrationsabhängigen Aufhebung der Repression des Luciferase-Signals (Abb. 21 C). Wurde dagegen der leere Vektor benutzt, so konnte weder ein Effekt der KSHV-miRNAs noch der AntagomiRs beobachtet werden.

Um zu testen, ob sich an der vorhergesagten Position tatsächlich eine Bindestelle der miRNA an die mRNA von LRRC8D befindet, wurden in dem Luciferase-Vektor 5 Basenpaare aus der vermuteten SEED-Region (Abb. 21 A, angezeigt durch einen schwarzen Balken) mutiert (SEED(mut5), siehe Anhang 7.7). Diese vermeintliche SEED-Sequenz entspricht nicht der kanonischen SEED-Sequenz von miRNAs, welche normalerweise die Basenpaare 2-7 auf der miRNA überspannt, da sie auf den Basenpaaren 3-8 von miRK12-3-5p liegt¹³⁰. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass perfekte SEED-Paarungen kein absolut verlässlicher Indikator für miRNA-3'UTR-Wechselwirkungen sind^{58,88}. Wenn der auf diese Weise mutierte Reportervektor zusammen mit dem KSHV-miRNA exprimierenden Vektor in HEK 293-Zellen kotransfiziert wurde, so war keine Repression mehr zu beobachten. Die gleichen Effekte wurden beobachtet, wenn anstatt des pcDNA miRK10/12-Vektors ein pcDNA basierter Vektor verwendet wurde, welcher nur die miRNA miRK12-3 exprimiert (pcDNA miRK3, Abb. 21 D). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bindung von miRK12-3-5p an diese eine Bindungsstelle in der 3'UTR von LRRC8D notwendig und hinreichend ist, um den inhibitorischen Effekt zu vermitteln.

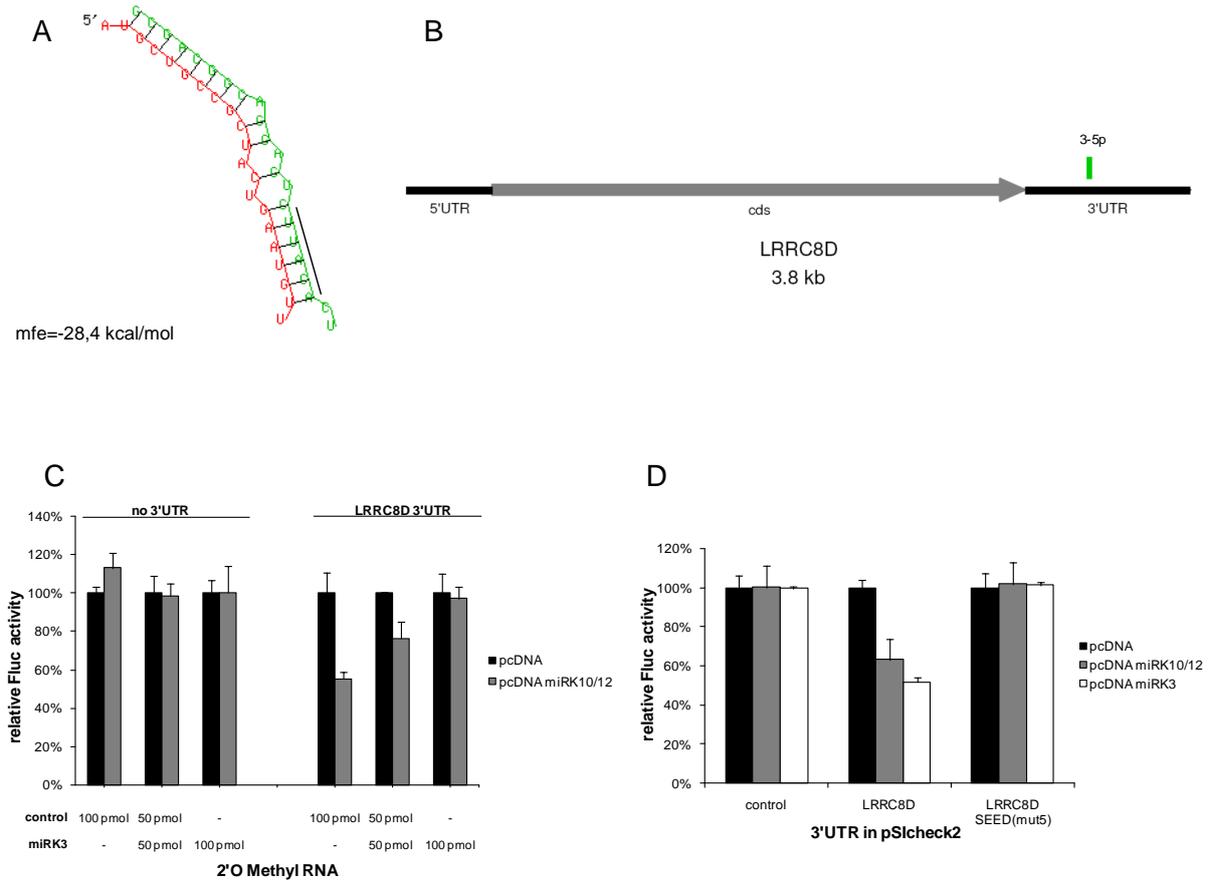


Abb. 21: LRR8D ist ein Ziel-Gen für die Micro-RNA miR12-3-5p

(A) Die Verwendung des RNA-Hybrid-Algorithmus führte zur Vorhersage einer starken Interaktion von miR12-3-5p (grün) und der 3'UTR von LRR8D (rot). Der schwarze Balken kennzeichnet die Basenpaare, welche der vermeintlichen SEED-Sequenz der miRNA entsprechen.

(B) Gezeigt ist die Position der Bindestelle für miR12-3-5p (grün) auf der mRNA von LRR8D (cds = kodierende Sequenz).

(C) Gezeigt sind Luciferase-Derepressionsanalysen mit einem Inhibitor der miRNA miR12-3-5p (AntagomiR, α -miR12-3-5p). Als Kontrolle wurde ein AntagomiR gegen die EBV-miRNA BHRF1 verwendet. Der Reportervektor für die 3'UTR von LRR8D wurde dabei entweder mit einer Kontrolle (schwarz) oder dem KSHV-miRNA exprimierenden Vektor (grau) kotransfiziert. Weder die Expression der miRNAs noch die Verwendung der 2'-O-Methyl-RNAs hatte einen Einfluss auf die Luciferase-Expression in der Kontrolle. Im Gegensatz dazu führte die Kotransfektion des spezifischen AntagomiRs im Fall des LRR8D-Reporterkonstruktes zu einer konzentrationsabhängigen Derepression des Luciferase-Signals.

(D) Die Reporter-Vektoren wurden entweder mit der Kontrolle (pcDNA, schwarz) mit den 10 intronischen KSHV-miRNAs (pcDNA miR10/12, grau) oder der einzelnen KSHV-miRNA miR12-3 (pcDNA miR3, weiß) kotransfiziert. Die Reporter-Vektoren enthielten die Wildtyp-3'UTR von LRR8D oder eine Mutante mit 5 ausgetauschten Basen in dem vermeintlichen SEED-Match der miR12-3-5p-Bindestelle. Als Kontrolle diente der leere Vektor pScheck2-DEST. Die KSHV-miRNA vermittelte Repression der Luciferase-Aktivität ist nach der Mutation der Bindestelle nicht mehr vorhanden.

4.4.7 NHP2L1 und GEMIN8 enthalten miRNA-Bindestellen im kodierenden Bereich

Für zwei der 3'UTRs, welche in den Luciferase-Assays untersucht wurden (NHP2L1 und GEMIN8), konnte kein regulatorischer Effekt durch KSHV-miRNAs nachgewiesen werden. In diesen beiden Fällen wurde vermutet, dass sich die Bindestellen für KSHV-miRNAs möglicherweise nicht auf der 3'UTR, sondern auf der kodierenden Sequenz oder der 5'UTR der entsprechenden mRNA befinden. Denn auch wenn sich bisher die meisten Studien über miRNA-Bindestellen auf die 3'UTRs konzentriert haben, so gibt es doch auch aktuelle Arbeiten, die zeigen, dass sich miRNA-Bindestellen durchaus auf 5'UTRs oder in kodierenden Bereichen befinden können^{130,146,220}. Die Berechnung von möglichen Bindungen von KSHV-miRNAs an die mRNAs von GEMIN8 bzw. NHP2L1 mit Hilfe des RNA-Hybrid-Algorithmus¹⁷³ führte zu der Vorhersage, dass sich starke Bindungsstellen für KSHV-miRNAs in Bereichen der kodierenden Sequenz befinden (Abb. 22 A+B).

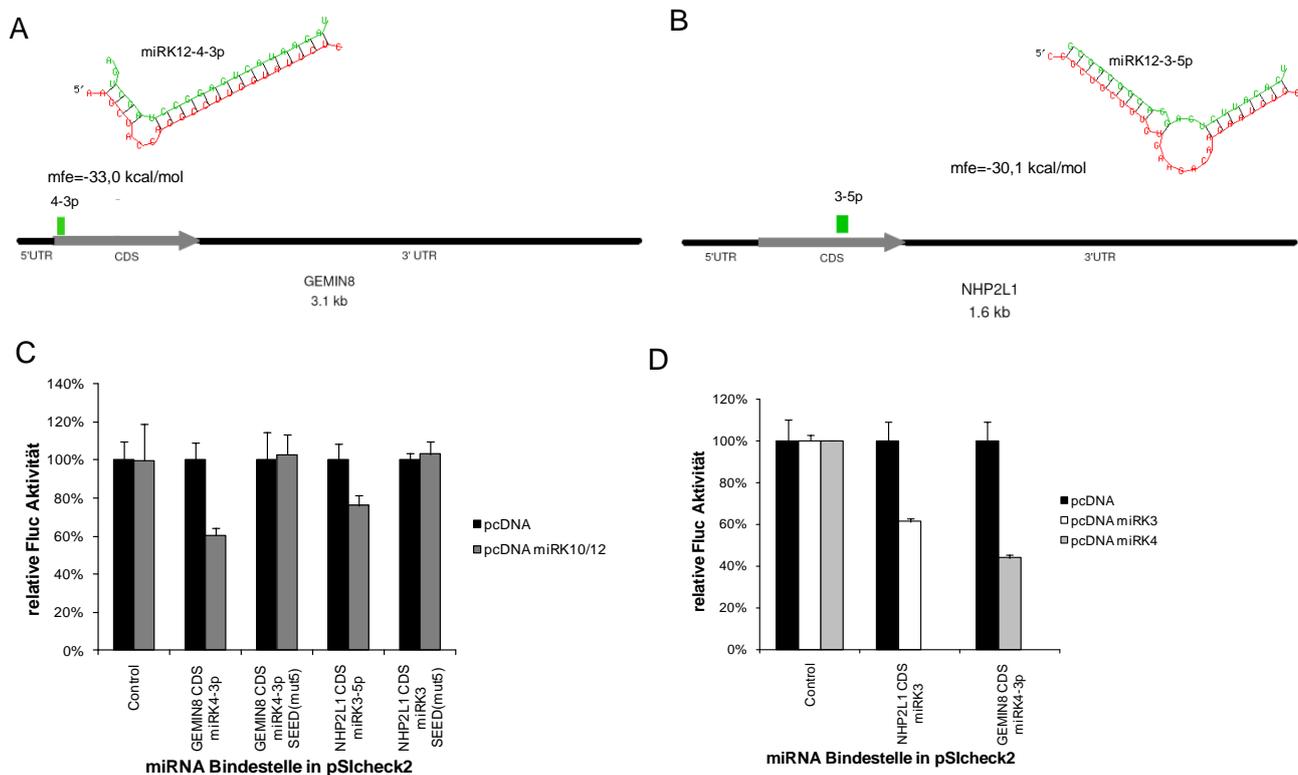


Abb. 22: Bindestellen für KSHV-kodierte miRNAs in den kodierenden Bereichen von GEMIN8 und NHP2L1

Die Interaktionen zwischen den mRNAs (rot) von GEMIN8 (A) bzw. NHP2L1 (B) und den KSHV-miRNAs (grün) wurden mit Hilfe des RNA-Hybrid-Algorithmus vorhergesagt. Die vorhergesagten Interaktionen liegen jeweils in der kodierenden Sequenz (CDS).

(C) Die Bindestellen wurden als Wildtyp und mit mutiertem SEED-Match in den Vektor pScheck2-DEST kloniert, und mit dem KSHV-miRNA-Expressionsvektor (grau) bzw. einem Kontrollvektor (schwarz) kotransfiziert. Die Repression durch die KSHV-kodierten miRNAs ist nur im Fall der beiden Wildtyp-Bindestellen zu sehen.

(D) Die Reporterstrukturen mit den Wildtyp-Bindestellen wurden mit Vektoren mit individuellen KSHV-miRNAs kotransfiziert. Bei den entsprechenden Bindestellen kommt es zur Repression des Luciferase-Signals.

Um zu überprüfen, ob die vorhergesagten Bindestellen tatsächlich funktionell sind, wurden sie in den Vektor pSIcheck2-DEST hinter das Luciferase-Gen kloniert. Mit diesen Konstrukten wurden anschließend Dual-Luciferase-Assays durchgeführt. Beide Bindestellen führten dabei zu einer Regulation der Luciferase bei gleichzeitiger Expression der KSHV-miRNAs. Um sicher zu gehen, dass diese beiden Bindestellen wirklich für den regulatorischen Effekt durch die KSHV-miRNAs verantwortlich sind, wurden diese Bindestellen mutiert. Dies geschah durch das Einfügen von 5 Punktmutationen im Bereich des SEED-Matches (mut5, siehe Anhang 7.7). Diese Mutationen führten zu einer vollständigen Aufhebung des regulatorischen Effektes (Abb. 22 C). Um sicher zu gehen, dass die genannten miRNAs jeweils alleine für den regulatorischen Effekt verantwortlich waren, wurden die Luciferase-Reporter mit einem Vektor kotransfiziert, welcher jeweils nur die entsprechende individuelle Micro-RNA exprimiert. Dabei konnte der Repressionseffekt ebenfalls beobachtet werden (Abb. 22 D).

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die KSHV-miRNAs auch einen regulatorischen Effekt auf das endogene Protein vermitteln. Daher wurden quantitative Western Blots unter Verwendung von Antikörpern gegen GEMIN8 und NHP2L1 verwendet. Ein Antikörper gegen β -Aktin diente dabei als Ladekontrolle. Für NHP2L1 wurde kein spezifisches Signal detektiert (Daten nicht gezeigt), aber für GEMIN8 wurde in der DG75-miRK10/12-Zelllinie eine 2,5-fache Reduzierung der Proteinmenge gegenüber der Zelllinie DG75-eGFP gemessen (Abb. 23). Der Versuch, auch die anderen Zielgene im Western Blot zu untersuchen, scheiterte an der mangelnden Verfügbarkeit von funktionierenden Antikörpern.

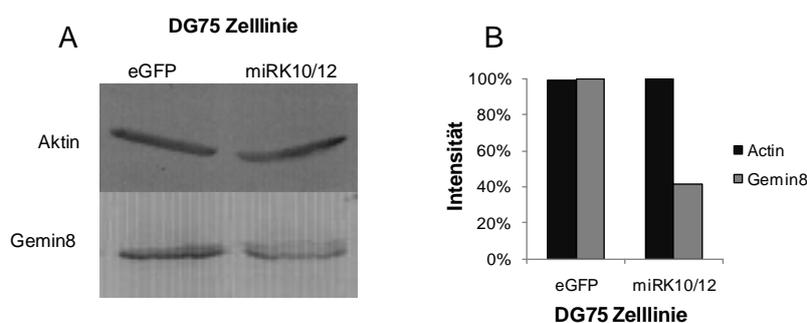


Abb. 23: Endogenes GEMIN8 ist in KSHV-miRNA-exprimierenden B-Zellen reduziert

Aus den KSHV-miRNA exprimierenden DG75-Zelllinien, bzw. der Kontrolle wurden Lysate hergestellt und mittels Western Blot mit einem GEMIN8-spezifischen Antikörper analysiert. Die Proteine wurden im Anschluss mit Alexa488-konjugierten Sekundärantikörpern angefärbt, im Fluorimager gescannt (A) und die Intensität der Banden mit Hilfe der AIDA Image Analysis-Software quantifiziert (B). Die GEMIN8 Menge ist nach Normalisierung auf Aktin in den KSHV-miRNA exprimierenden Zellen gegenüber der Kontrolle ca. 2,5-fach reduziert.

In der Zusammenfassung zeigen diese Experimente, dass es mit Hilfe von AGO2-spezifischen Antikörpern möglich ist, spezifisch Zielgene für miRNAs zu isolieren und dabei Zielgene für KSHV-kodierte miRNAs zu identifizieren. Für die Validierung wurden aus diesen

Genen zufällig, also ohne auf eine spezifische biologische Funktion zu achten, einige für eine Validierung mittels Luciferase-basierter Methoden ausgesucht. Bemerkenswerter Weise konnte dabei für alle Gene der Einfluss der KSHV-miRNAs bestätigt werden. In drei Fällen konnten die Bindestellen identifiziert werden, welche in zwei Fällen nicht in der 3'UTR sondern in der kodierenden Sequenz lagen. In dieser Arbeit wurde die RISC-Immunpräzipitation mit spezifischen AGO2-Antikörpern zum ersten Mal im Zusammenhang mit viralen miRNAs verwendet. Da bei den Validierungen alle 6 untersuchten Gene bestätigt werden konnten, ist anzunehmen, dass es sich bei den meisten anderen identifizierten Genen auch um echte Zielgene handelt. Es kann also eine Art Katalog mit 72 Zielgenen für KSHV-miRNAs angeboten werden, welcher die Grundlage für weitergehende Forschungen bildet. Welche der identifizierten miRNA-mRNA-Wechselwirkungen dabei letztendlich tatsächlich einen Vorteil für das Virus bieten, muss in zukünftigen Studien ermittelt werden.

5 Diskussion

5.1 Auswahl und Herstellung der miRNA exprimierenden Zelllinien

Die publizierten Studien, welche zur Identifizierung von Ziel-Genen für KSHV-miRNAs durchgeführt wurden, benutzten artifizielle Zellkultursysteme, wie z.B. HEK293. In dieser Doktorarbeit sollten jedoch Zelllinien benutzt werden, welche den natürlichen Wirtszellen für KSHV möglichst ähnlich sind. Nur so konnte man davon ausgehen, dass das Transkriptom in den Zellen möglichst viele echte Zielgene für die miRNAs enthält und die miRNA Expression ähnlich wie in KSHV infizierten Zellen ist. KSHV zeigt einen Tropismus für B-Zellen und Endothelzellen. Daher wurde für beide Zelltypen ein Modellsystem entwickelt. Als B-Zell-Modell wurde die Zelllinie DG-75 benutzt^{20,77}. Dabei handelt es sich um eine etablierte Burkitt's Lymphom-Zelllinie, welche negativ für EBV ist. Diese Zelllinie wird im Zusammenhang mit Herpesviren oft als B-Zell-Modell verwendet. Sie ist leicht zu handhaben und wächst schnell. Diese Zelllinie ist schwer zu transfizieren. Daher blieb der Versuch, stabile KSHV-miRNA exprimierende Zellen mit konventionellen Transfektionsmethoden herzustellen, ohne Erfolg. Daher wurde dafür ein lentivirales Transduktionssystem benutzt. Bei diesem System gelangen die Lentiviren, welche in ihrer RNA das Transgen und einen Selektionsmarker tragen, in die Zielzelle. Die virale RNA wird revers transkribiert, aktiv in den Nukleus transportiert und stabil in das Wirtsgenom integriert. Dadurch wird eine langfristige und stabile Expression möglich^{33,63,132}.

Die Zelllinie EaHy 926 ist eine häufig verwendete Modell-Zelllinie für vaskuläre Endothelzellen. Sie wurde durch Fusion von humanen Zellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) und der permanenten Lungenkarzinomzelllinie A549/8 gewonnen, weist Merkmale von hochdifferenzierten Endothelzellen auf und ist leicht zu handhaben⁶⁶. Die KSHV-miRNA exprimierenden Endothelzellen wurden mit Hilfe der gleichen lentiviralen Überstände wie die B-Zelllinien hergestellt. Die eGFP-Kontrolle diente einerseits als Negativkontrolle für die miRNA exprimierenden Zelllinien und war andererseits Kontrolle für die erfolgreiche Herstellung der Zelllinien und die vollständige Selektion.

5.2 Vergleich der Microarray-Analysen aus Gesamt-RNA und RISC-Immunpräzipitationen

5.2.1 Microarray-Analysen an Gesamt-RNA

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Methoden verwendet, um zelluläre Transkripte zu identifizieren, welche als Kandidaten für eine Regulation durch KSHV-kodierte miRNAs in

Frage kommen: Erstens Microarrays mit Gesamt-RNA von Zellen, welche die miRNAs exprimieren und zweitens Microarrays mit RNA, welche mit Hilfe von AGO2-spezifischen Antikörpern aus dem RISC-Komplex von miRNA-exprimierenden Zelllinien, bzw. virusinfizierten Zellen gewonnen worden war.

Der erste Ansatz wurde während der Entstehung dieser Arbeit zuerst benutzt. Zu diesem Zeitpunkt war noch kein spezifischer Antikörper gegen Komponenten des RISC-Komplexes verfügbar, welcher für *Pull-Down*-Experimente in Frage gekommen wäre. Der Ansatz schien gerechtfertigt, da Lim et al. kurz zuvor zeigen konnten, dass miRNAs nicht nur die Translation inhibieren, sondern mRNAs auch destabilisieren können¹³⁵. Außerdem wurden in der Zwischenzeit von Mark Samols et al. zwei Zielgene für KSHV-kodierte miRNAs durch einen ähnlichen Ansatz in HEK293-Zellen identifiziert¹⁸⁵. Es wurde davon ausgegangen, dass die wenigsten Gene, welche in den KSHV-miRNA exprimierenden Zelllinien reguliert sind, direkte Zielgene für die miRNAs darstellen und vermutet, dass viele Gene aufgrund miRNA-induzierter Veränderungen in der Zelle sekundär reguliert werden.

Da der verwendete Ansatz mit lentiviral transduzierten Zelllinien etliche Artefakte generiert, welche durch Veränderungen in der Zelle durch die lentivirale Transduktion, eGFP-Expression, Zellkulturbedingungen usw. zustande kommen, wurde durch bioinformatische Methoden versucht, diejenigen Gene zu filtern, welche aufgrund ihrer Eigenschaften für Regulation durch die miRNAs in Frage kommen. Aufgrund der beschränkten Anforderung an die Komplementarität zwischen miRNAs und ihren Bindungsstellen kam dafür in erster Linie die Komplementarität der Seed-Sequenz in Betracht, da diese als eine Hauptvoraussetzung für eine Interaktion zwischen einer miRNA und ihrer Bindestelle ist. Also wurden nur diejenigen Gene ausgewählt, welche mindestens einen Seed-Match in ihrer 3'UTR besaßen. Die miRNA-mRNA-Wechselwirkungen, welche nicht von einem perfekten SEED-match abhängig sind^{58,88}, bleiben bei diesem Ansatz jedoch unberücksichtigt.

Die Vorhersagen für miRNA-targets wurden weiter eingegrenzt, und zwar aufgrund der Tatsache, dass der Einfluss von miRNAs auf die Transkripte eher schwach ist. Es wurden nur Kandidaten beachtet, welche maximal 4-fach herunter reguliert waren. Auch nach diesen Untersuchungen blieben noch sehr viele Kandidaten übrig, nämlich insgesamt 1195 Gene in beiden Zelltypen. Dabei konnte keine Aussage darüber gemacht werden, warum lediglich 93 Gene in beiden untersuchten Zelltypen reguliert waren, während die überwiegende Anzahl in nur einer der beiden Zelllinien reguliert wurde. Vermutlich liegt dies aber an den grundsätzlich unterschiedlichen Expressionsprofilen dieser beider Zelllinien.

Die Tests, welche für eine Bestätigung der Regulation durch miRNAs herangezogen werden, sind arbeitsintensiv und aufwendig. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit ein Gateway-

kompatibler Luciferase-Vektor hergestellt wurde, welcher die Klonierung der 3'UTRs erheblich erleichtert, sind echte Hochdurchsatz-Methoden bisher nicht entwickelt. Daher wurde nur eine relativ geringe Anzahl der Kandidaten in den Luciferase-Assays getestet. Insgesamt gelang es, vierzehn 3'UTRs zu klonieren. Durch die Luciferase-Assays konnten dabei die Caspase 3 und RAD51AP1 als Zielgene bestätigt werden. Durch seine wichtige Funktion in der Apoptose war die Casp3 natürlich ein besonders interessantes Gen, welches im Kontext der KSHV-kodierten miRNAs weiter untersucht wurde. Das sollte aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass die Ausbeute identifizierter Zielgene insgesamt recht gering ausfiel: Von 14 klonierten 3'UTRs wurde nur zwei bestätigt, weshalb nach einer besseren Methode zur Identifizierung von Zielgenen für miRNAs gesucht wurde.

5.2.2 Vorteile der RISC-IP-Methode

In der Zwischenzeit wurde der Zugang zu einem AGO2-spezifischen monoklonalen Antikörper ermöglicht¹⁸¹. Dieser war bereits dazu benutzt worden, um zelluläre miRNA-Zieltranskripte in HEK 293-Zellen zu identifizieren¹⁸. Mit diesem Werkzeug untersuchten wir sowohl die KSHV-miRNA exprimierenden Zelllinien DG75 miRK10/12 und EaHy926 miRK10/12 als auch eine KSHV-positive Zelllinie (BCBL-1). Dabei wurde analysiert, welche Transkripte sich sowohl nach KSHV-miRNA-Expression als auch nach KSHV-Infektion spezifisch aus den RISC-Komplexen anreichern lassen. Die Verwendung von KSHV-positiven Zellen hätte in den früheren Microarrays mit Gesamt-RNA keinen Sinn gemacht, da durch die Infektion weitreichende Veränderungen im Transkriptom der Zelle stattfinden, die mit miRNA-vermittelten Effekten nichts zu tun haben.

Natürlich bestand die Gefahr, dass die Anreicherung der mRNAs unspezifisch ist, z.B. durch Bindung der mRNAs an die verwendeten Sepharose-Beads. Dieser Effekt wurde auch beobachtet. Bei der Verwendung des Kontroll-Antikörpers wurde immer auch eine bestimmte Menge RNA isoliert. Aber es konnte gezeigt werden, dass sich die RISC-gebundenen RNAs bei Verwendung des AGO-Antikörpers im Vergleich zu der BrdU-Kontrolle deutlich anreichern lassen. Entscheidend war, dass die mRNAs ab einem bestimmten Anreicherungsfaktor eindeutig überdurchschnittlich viele vorhergesagte Bindestellen für bekannte miRNAs enthielten. Dies war der wichtigste Befund für die Festlegung der Kriterien, nach welchen Gene als Zielgen für miRNAs definiert wurden. Bereits ab einer unerwartet schwachen Anreicherung von unter 1,2x war eine deutliche Häufung von miRNA-Bindestellen in den mRNAs aus den RISC-IPs zu erkennen. Dabei muss erwähnt werden, dass die Kriterien, nach welchen anschließend die Kandidaten ausgesucht wurden (z.B. Anreicherung mindestens 1,5x), sehr stringent gewählt wurden. Weniger strenge Kriterien hätten vermutlich eine noch größere Menge an Zielgenen identifiziert. Die Liste enthielt nach der Auswertung lediglich 72 Kandi-

daten. Davon wurden elf Transkripte mittels TaqMan-PCR untersucht und dabei 10 bestätigt. Das elfte (FBXO7) verhielt sich dabei wie ein Ziel-Gen für zelluläre miRNAs, da es auch in den Kontroll-Zelllinien durch die RISC-IP angereichert werden konnte. Die Untersuchung der 3'UTRs von sechs Kandidatengen konnte vier Kandidaten auf Anhieb bestätigen. Für die zwei fehlenden wurde gezeigt, dass sie Bindestellen für KSHV-miRNAs in ihrer kodierenden Sequenz besitzen. Es wurden also alle untersuchten Gene bestätigt, im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten, in welchen nur zwei von 15 Kandidatengen bestätigt wurden.

Es ist also eine besondere Stärke dieses Ansatzes gegenüber den Microarrays an Gesamt-RNA, dass die Möglichkeit zur Identifizierung von echten miRNA-mRNA-Wechselwirkungen besteht. Das macht die Experimente unempfindlicher gegen andere experimentelle Variabilitäten, welche z.B. durch die lentivirale Transduktion oder die Zellkulturbedingungen entstehen können. Die Kombination aus *Pull-Downs* von RISC-Komponenten und Microarray Analysen wurde in dieser Arbeit das erste Mal mit Erfolg verwendet, um Ziel-Gene von viralen miRNAs zu identifizieren. Außerdem unterstreichen diese Ergebnisse allgemein den enormen Wert des RISC-IP-Microarray-Ansatzes bei der Identifikation von Ziel-Genen für miRNAs.

5.3 Vergleich mit anderen Studien

In den letzten Jahren konnten einige Transkripte identifiziert werden, welche durch KSHV-miRNAs reguliert werden. Daher wurde analysiert, ob sich die dort identifizierten Gene auch in unseren Studien wiederfinden. Keines der bisher publizierten Zielgene erfüllte jedoch unsere sehr stringenten Kriterien, die angesetzt wurden, um ein Gen als Zielgen für KSHV zu bezeichnen. Einige ließen sich aber dennoch in unseren Microarray-Analysen von RISC-IPs spezifisch in Zellen anreichern, welche KSHV-miRNAs exprimieren. Im Anhang 7.5 auf Seite 93 sind die Ergebnisse in einer Tabelle zusammengefasst.

Viele der früher entdeckten Ziel-Gene wurden aufgrund der Tatsache gefunden, dass KSHV eine miRNA (miRK12-11) enthält, welche ortholog zu der zellulären miRNA hsa-miR-155 ist^{82,197}. Insgesamt identifizierten Gottwein et al. in diesen Arbeiten 12 Gene, welche durch diese miRNA reguliert werden. Sie verwendeten dabei Microarrays mit Gesamt-RNA von miRK12-11 exprimierenden Zellen. Auch sie suchten vor der Validierung mittels Luciferase-Assays nach *Seed-Matches* für die miRK12-11. In unseren RISC-IP-Analysen fanden wir, dass 3 von 12 (25%) dieser Gene mindestens 2-fach und ein Gen mindestens 1,5-fach in den BCBL-1 Zellen angereichert werden konnten. Für eines dieser Gene (SLA, Src-like-adaptor) war die Anreicherung dabei sehr stark (18,3-fach). In den KSHV-miRNA exprimierenden DG-75-Zelllinie (DG75-miRK10/12) wurde für diese Gene keine

Anreicherung gefunden. Dies lässt sich durch die Tatsache erklären, dass diese Zellen ausgerechnet miRK12-11 aus unbekanntem Grund nicht exprimieren (vgl. Tab. 2). Auch für NK-Zell-Liganden MIC-A und MIC-B war eine Regulation durch miRNAs beschrieben worden^{154,199,200}. In den Microarray-Analysen der RISC-IPs wurde eine deutliche Anreicherung dieser Transkripte gefunden und zwar sowohl in den BCBL-1 Zellen als auch in der DG75miRK10/12 Zelllinie. Diese Anreicherung wurde auch durch TaqMan-PCRs bestätigt. Keine Anreicherung wurde gefunden für die in drei weiteren Studien entdeckten Ziel-Gene THBS (Samols et al.)¹⁸⁵, BCLAF (Ziegelbauer et al.)²²⁴, LDOC1, MATR3, TM6SF1, und PHF17 (Skalsky et al.)¹⁹⁷. Auch für die Caspase 3 wurde keine Anreicherung beobachtet. Es muss betont werden, dass für Transkripte, welche in den AGO2-Pulldowns nicht angereichert werden können, eine Regulation durch miRNAs nicht ausgeschlossen werden kann. Dies kann folgende Gründe haben: Erstens könnten einige der Transkripte in den untersuchten Zellen schwach exprimiert werden und somit unter der Nachweisgrenze der Microarrays liegen. In dieser Studie wurde das für die Transkripte LDOC1 und TM6SF1 beobachtet. Zweitens ist die Fähigkeit einer miRNA, ein bestimmtes Transkript zu beeinflussen, von der Expressionsstärke sowohl der miRNA als auch des Zielgens abhängig und wird somit durch die verwendeten Zelllinien beeinflusst. Der wichtigste Aspekt ist aber, dass der in dieser Arbeit verwendete Ansatz auf der Immunpräzipitation von nur einem bestimmten Argonauten-Komplex (Ago2) beruht. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Regulation von anderen Transkripten durch virale miRNAs vorzugsweise von anderen Ago-Proteinen (AGO1, 3 und 4) und ihren Komplexen vermittelt wird.

5.4 Funktion der KSHV-kodierten miRNAs

Micro-RNAs wurden mittlerweile bei einer Vielzahl von Herpesviren gefunden. Der Nutzen für das Virus bei der Benutzung von miRNAs ist naheliegend: Das Virus kann die Zelle, z.B. während der latenten Phase, in weiten Maßen beeinflussen, ohne dafür auf Proteine zurückzugreifen, welche das Immunsystem des Wirtes stimulieren. Dennoch ist noch nicht viel über die Funktion von miRNAs in der Biologie dieser Viren bekannt. In den meisten Arbeiten wurde die Funktion der identifizierten Ziel-Gene herangezogen, um über die Funktion der miRNAs zu spekulieren.

Ein Beispiel für den Nachweis einer biologischen Funktion der miRNAs ist die Regulation der NK-Zell-Liganden MIC-A und MIC-B, welche von Nachmani et al. beschrieben wurde¹⁵⁴: Dort wurde mit Hilfe von NK-Zell-Cytotoxizitäts-Assays gezeigt, dass miRK12-7 exprimierende Zelllinien weniger anfällig für die Zerstörung durch natürliche Killer-Zellen sind. Hier leistet

eine KSHV-kodierte miRNA einen Beitrag für das Virus, um dem Immunsystem zu entkommen.

Insgesamt ist bekannt, dass einzelne miRNAs hunderte von zellulären Genen regulieren können^{5,192}. Es ist nicht zu erwarten, dass die Regulation jedes Gens zu einem spezifischen, für das Virus vorteilhaften Effekt führt. Bartel und Chen kategorisierten die miRNA-mRNA-Interaktionen in „switch“, „tuning“ und „neutral“¹⁴. „Switch“ bedeutet, dass ein Gen durch eine miRNA nahezu funktionell abgeschaltet wird. „Tuning“ bedeutet eine funktionelle Feinregulierung des Ziel-Gens und „neutral“ bedeutet, dass ein Zielgen zwar reguliert wird, aber nur innerhalb eines Bereiches, der sich nicht auf die Funktion des entsprechenden Gens auswirkt. Übertragen auf virale miRNAs bedeutet dies, dass „switch“ und „tuning“ für das Virus vorteilhaft sind, während sich „neutrale“ Interaktionen nicht auf die Virusreplikation auswirken. Es sind also letztendlich immer funktionelle Analysen notwendig, um die biologische Relevanz einer miRNA-mRNA-Wechselwirkung zu beweisen. Daher wurde auch untersucht, ob sich die Regulation der Caspase 3 durch KSHV-kodierte miRNAs auf die Fähigkeit der Zellen auswirkt, in Apoptose zu gehen.

Der apoptotische Prozess kann zum Einen durch intrazelluläre Faktoren ausgelöst werden, wie z.B. Cytochrom c oder SMAC/DIABLO, welche aus den Mitochondrien ausgeschüttet werden. Andererseits können extrazelluläre Signale den programmierten Zelltod induzieren. Im ersten Fall wird die Caspase 9 aktiviert, welche die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktiviert^{100,178}. Im zweiten Fall werden pro-apoptotische Todesrezeptoren durch Liganden, wie z.B. TRAIL oder FasL, aktiviert. Dies führt zu einer Stimulierung der Caspasen 8 und 10, welche ihrerseits ebenfalls die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktivieren⁴⁷. Die apoptotischen Signale laufen also in jedem Fall bei den Effektor-Caspasen zusammen, was die Rolle der Caspase 3 als Schlüsselprotein der Apoptose betont. Es ist bekannt, dass diese zelluläre Funktion, welche einen Organismus unter anderem vor virusinfizierten Zellen oder Krebsentstehung schützt, von KSHV während der latenten Phase durch virale Proteine beeinflusst wird¹⁷⁷. Der Befund, dass Zellen, welche KSHV-kodierte miRNAs exprimieren, zu einem gewissen Grad vor Apoptose geschützt sind, und dies möglicherweise auf die Regulation der Effektor-Caspase CASP3 durch die miRNAs zurückzuführen ist, bedeutet die Entdeckung eines neuen Mechanismus, durch welches KSHV dem Immunsystem seines Wirtes ausweicht.

Das zweite Protein, welches mit Hilfe dieser Methode gefunden wurde war RAD51AP1. Dabei handelt es sich um ein DNA-bindendes Protein, welches homologe Rekombination vermittelt und wichtig für die Aufrechterhaltung der Genom-Integrität ist¹⁴⁸. KSHV ist dafür be-

kannt, DNA-Reparatur durch Expression von v-Cyclin zu induzieren¹¹⁶ daher könnte auch die Regulierung von RAD51AP1 eine wichtige Rolle im Kontext der viralen Infektion spielen.

Für die Gene, welche mittels der RISC-IP als Ziel-Gene für KSHV-kodierte miRNAs identifiziert worden waren, wurden bisher keine funktionellen Analysen durchgeführt. Einige der Gene wurden mittels Luciferase-Assays als Zielgene bestätigt. Leider ist kaum eines von ihnen so „prominent“ wie die CASP3. Dennoch besitzen einige von ihnen interessante Funktionen: LRRC8D, auch bekannt als LRRC5, gehört zu einer hochkonservierten Familie von *Leucin-Rich-Repeat*-Proteinen, welche wichtige Rollen in der B-Zellentwicklung spielen¹²¹. Interessanterweise ist bekannt, dass KSHV-infizierte B-Zellen hochgradig in ihrer Entwicklung und ihrer Funktion gestört sind². Möglicherweise spielen die KSHV-miRNAs bei dieser Entwicklungsstörung eine spezifische Rolle. EXOC6 bzw. SEC15 ist ein Bestandteil des oktameren Exocyst-Komplexes, welcher wichtige Funktionen während der Exocytose erfüllt¹⁰³. Für CDK5RAP (CDK5 Regulatory Subunit Associated Protein) ist bekannt, dass es während des Zellzyklus beim Eintritt in die M-Phase eine Rolle spielt¹⁶⁰.

Obwohl die Kandidaten für die Validierung mittels RT-PCR und Luciferase-Assays zufällig ausgewählt wurden, ließen sich nahezu alle getesteten Zielgene bestätigen. Da die Auswahlkriterien für die Targets sehr stringent gewählt wurden, kann man davon ausgehen, dass die meisten angereicherten Gene in diesen Listen auch tatsächlich durch die miRNAs reguliert werden. Ein Blick auf diese Liste zeigt, dass sich darunter ebenfalls viele Gene mit potenzieller Funktion für die Biologie von KSHV befinden. Die 72 identifizierten Ziel-Gene wurden mit Hilfe der DAVID-Datenbank (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery)^{57,104} auf ihre Zugehörigkeit zu biologischen Prozessen (GO-biological processes) und Stoffwechselwegen (KEGG-Pathways) hin untersucht. Etliche Zielgene waren wichtigen zellulären Prozessen zugeordnet. Darunter waren Gene, welche an der Apoptose beteiligt sind, überdurchschnittlich viele Regulatoren des Zellzyklus und Gene aus Signaltransduktions-Kaskaden des angeborenen Immunsystems. Die interessantesten sind in Tab. 6 zusammengefasst.

Tab. 6: Biologische Funktion der durch RISC-IP-Analysen identifizierten KSHV-miRNA-Zielgene

Die identifizierten Zielgene wurden mit Hilfe der DAVID-Datenbank auf ihre Zugehörigkeit zu bestimmten Stoffwechselwegen oder biologischen Prozessen hin getestet.

Zellzykluskontrolle (GO-BP); p=0,0028	
Gen-Symbol	Gen-Beschreibung
NHP2L1	NHP2 NON-HISTONE CHROMOSOME PROTEIN 2-LIKE 1 (S. CEREVISIAE)
SUV39H1	SUPPRESSOR OF VARIATION 3-9 HOMOLOG 1 (DROSOPHILA)
PPP3CA	PROTEIN PHOSPHATASE 3, CATALYTIC SUBUNIT, ALPHA ISOFORM (CALCINEURIN A ALPHA)
RNF8	RING FINGER PROTEIN 8
GTSE1	G-2 AND S-PHASE EXPRESSED 1
MNAT1	MENAGE A TROIS HOMOLOG 1, CYCLIN H ASSEMBLY FACTOR (XENOPUS LAEVIS)
TUSC4	TUMOR SUPPRESSOR CANDIDATE 4
FOSL1	FOS-LIKE ANTIGEN 1
CCNF	CYCLIN F
CDK5RAP1	HOMO SAPIENS CDK5 REGULATORY SUBUNIT ASSOCIATED PROTEIN 1, TRANSCRIPT VARIANT 1
Jak-STAT-Signalweg (KEGG); p=0,022	
Gen-Symbol	Gen-Beschreibung
PIK3CA	PHOSPHOINOSITIDE-3-KINASE, CATALYTIC, ALPHA POLYPEPTIDE
SOCS3	SUPPRESSOR OF CYTOKINE SIGNALING 3
IL22RA1	INTERLEUKIN 22 RECEPTOR, ALPHA 1
TLR-Signalweg (KEGG); p=0,062	
Gen-Symbol	Gen-Beschreibung
PIK3CA	PHOSPHOINOSITIDE-3-KINASE, CATALYTIC, ALPHA POLYPEPTIDE
NFKBIA	NUCLEAR FACTOR OF KAPPA LIGHT POLYPEPTIDE GENE ENHANCER IN B-CELLS INHIBITOR, ALPHA
Apoptose (KEGG); p=0,044	
Gen-Symbol	Gen-Beschreibung
PIK3CA	PHOSPHOINOSITIDE-3-KINASE, CATALYTIC, ALPHA POLYPEPTIDE
PPP3CA	PROTEIN PHOSPHATASE 3, CATALYTIC SUBUNIT, ALPHA ISOFORM (CALCINEURIN A ALPHA)
NFKBIA	NUCLEAR FACTOR OF KAPPA LIGHT POLYPEPTIDE GENE ENHANCER IN B-CELLS INHIBITOR, ALPHA
mRNA-Prozessierung (GO-BP); p=0,011	
Gen-Symbol	Gen-Beschreibung
NHP2L1	NHP2 NON-HISTONE CHROMOSOME PROTEIN 2-LIKE 1 (S. CEREVISIAE)
RBM22	RNA BINDING MOTIF PROTEIN 22
SF3B5	SPLICING FACTOR 3B, SUBUNIT 5, 10KDA
GEMIN5	GEM (NUCLEAR ORGANELLE) ASSOCIATED PROTEIN 5
GEMIN8	GEM (NUCLEAR ORGANELLE) ASSOCIATED PROTEIN 8
Transkription (GO-BP); p=0,014	
Gen-Symbol	Gen-Beschreibung
ZNF569	ZINC FINGER PROTEIN 569
ZNF607	ZINC FINGER PROTEIN 607
FOSL1	FOS-LIKE ANTIGEN 1
ZNF545	KIAA1948 PROTEIN
ZNF383	ZINC FINGER PROTEIN 383
ZNF184	ZINC FINGER PROTEIN 184 (KRUPPEL-LIKE)
DKFZp779O175	HYPOTHETICAL PROTEIN DKFZP779O175
ZNF670	ZINC FINGER PROTEIN 670
SUV39H1	SUPPRESSOR OF VARIATION 3-9 HOMOLOG 1 (DROSOPHILA)
PPRC1	PEROXISOME PROLIFERATIVE ACTIVATED RECEPTOR, GAMMA, COACTIVATOR-RELATED 1
ZNF564	ZINC FINGER PROTEIN 564
MNAT1	MENAGE A TROIS HOMOLOG 1, CYCLIN H ASSEMBLY FACTOR (XENOPUS LAEVIS)
ZNF420	ZINC FINGER PROTEIN 420
ZNF684	ZINC FINGER PROTEIN 684
MED6	MEDIATOR OF RNA POLYMERASE II TRANSCRIPTION, SUBUNIT 6 HOMOLOG (YEAST)

5.5 miRNA-Bindestellen in kodierenden Bereichen

Bisher wurden die Bindestellen der meisten miRNAs bei Tieren, welche endogene mRNAs funktionell regulieren, in den 3'UTRs der Ziel-Gene entdeckt. Die überwiegende Anzahl aller Studien von miRNA-mRNA-Wechselwirkungen konzentrierten sich daher auf die 3'UTRs der regulierten Ziel-Gene, einschließlich dieser Arbeit. In jüngster Zeit wächst aber auch die Zahl der Berichte, welche in den offenen Leserahmen oder in den 5'UTRs von mRNAs Bindestellen für zelluläre miRNAs beschreiben, obgleich diese dort seltener vorkommen^{71,130,135,146}. Eine weitere Studie beschreibt, dass durch die Einführung einer zu *let-7*-miRNA komplementären Bindestelle in die 5'UTR der Luciferase eines Expressions-Systems die Luciferase ebenso effektiv reguliert wird wie durch eine entsprechende Bindestelle in der 3'UTR¹⁴¹.

In den RISC-Pulldowns wurden unter anderen zwei mRNAs (GEMIN8 und NHP2L1) angereichert, deren 3'UTRs in Luciferase-Assays nicht durch KSHV-miRNAs beeinflusst werden. Durch bioinformatische Vorhersagen wurden potentielle Bindestellen für diese miRNAs in den kodierenden Bereichen gefunden, welche mit der Luciferase unseres Reporter-Systems fusioniert wurden. Je eine Bindestelle aus der kodierenden Sequenz beeinflusste dabei die Luciferase-Expression. Bindestellen für KSHV-kodierte miRNAs können sich also auch außerhalb der 3'UTR der regulierten mRNA befinden. Was für zelluläre miRNAs kürzlich das erste Mal beschrieben wurde⁶⁷, konnte somit in dieser Arbeit das erste Mal für KSHV-miRNAs gezeigt werden.

5.6 Ausblick

Das Ziel dieser Studie war die Identifikation zellulärer Zielgene von KSHV-kodierten miRNAs. Vor allem die Immunpräzipitation von RISC-Komplexen durch AGO2-spezifische Antikörper ist dafür ein vielversprechender Ansatz, da alle in Folge untersuchten Kandidaten auf Anhieb durch weitere biochemische Methoden bestätigt werden konnten. Diese Arbeit bietet somit eine umfassende Liste von Zielgenen für KSHV-miRNAs an. Möglicherweise verhalten sich viele dieser schwachen Regulationen neutral oder kommen erst durch ihre konzertierte Aktion zur Wirkung. Letztendlich müssen also die biologisch relevanten Effekte im Zusammenspiel von Virus und Wirt herausgearbeitet und genau untersucht werden. Für den Anfang konnte die Regulation der Apoptose durch die KSHV-miRNAs gezeigt werden. Dabei muss jedoch noch untersucht werden, ob die Caspase 3 hier den einzigen Faktor darstellt oder ob es noch weitere miRNA-mRNA-Wechselwirkungen gibt, welche an diesem Effekt beteiligt sind, und inwieweit diese eine Rolle während der KSHV-Infektion spielen.

6 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AIDS	Erworbenes Immunschwäche Syndrom (<i>engl.</i> acquired immune deficiency syndrome)
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCBL-1	<i>engl.</i> Body cavity based lymphoma cell line 1
bp	Basenpaare
Bsd	Blasticidin-S-Deaminase
C	Cytosin
CIP	Alkalische Kälberphosphatase
CMV	Cytomegalovirus
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum (<i>engl.</i> fetal calf serum)
G	Guanin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes simplex-Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
KSHV	Kaposisarkom assoziiertes Herpesvirus
m	Milli
m	Meter
min	Minute
miRNA	Micro-RNA
mRNA	Boten-RNA (<i>engl.</i> messenger-RNA)
n	Nano
p	Pico
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>engl.</i> polymerase chain reaction)

PEG	Polyethylenglykol
PEL	Primäres Effusions-Lymphom
PITA	Probability of Interaction by Target Accessibility
qPCR	Quantitative PCR
RIP	RISC-Immunpräzipitation
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
rT	Reverse Transkription
s	Sekunde
siRNA	Short interfering RNA
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
Upm	Umdrehungen pro Minute
z. B.	Zum Beispiel

7 Anhang

7.1 In B-Zellen exprimierte miRNAs

Die folgenden 44 miRNAs wurden dem miRNA-Expressionsatlas¹²⁵ entnommen und sind laut diesem exprimiert in den Zelllinien "hsa_Burkitt-DG-75", "hsa_Burkitt-BL41-mock" und "hsa_Burkitt-BL41-95-EBV"

hsa-let-7a	hsa-miR-19b	hsa-miR-30b	hsa-miR-142-3p
hsa-let-7d	hsa-miR-20a	hsa-miR-30c	hsa-miR-142-5p
hsa-let-7f	hsa-miR-21	hsa-miR-30d	hsa-miR-146a
hsa-let-7g	hsa-miR-210	hsa-miR-30e	hsa-miR-155
hsa-miR-15a	hsa-miR-25	hsa-miR-32	hsa-miR-181a
hsa-miR-15b	hsa-miR-26a	hsa-miR-92a	hsa-miR-181b
hsa-miR-16	hsa-miR-26b	hsa-miR-93	hsa-miR-186
hsa-miR-17	hsa-miR-27a	hsa-miR-103	hsa-miR-301a
hsa-miR-18a	hsa-miR-27b	hsa-miR-106b	hsa-miR-378
hsa-miR-191	hsa-miR-29a	hsa-miR-130b	hsa-miR-425
hsa-miR-19a	hsa-miR-29b	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-454

7.2 Kandidaten für eine direkte Regulierung durch KSHV-miRNAs

Die Kandidaten wurden aus den Microarrays mit Gesamt-RNA der KSHV-miRNA exprimierenden Zelllinien EaHy und DG75 (vgl. 4.3.1) extrahiert. Die Transkripte waren zwischen 1,7-fach und 4-fach herunter reguliert und enthielten mindestens einen SEED-Match gegen KSHV-miRNAs. Aus Platzgründen werden hier nur die Kürzel der Gen-Namen, durch Semikolons getrennt, angegeben.

7.2.1 Kandidaten aus den DG75-miRK10/12-Zellen

($\Sigma=463$)

ABCA1;ABCC10;ACAP1;ACO1;ACOX1;ACPL2;ACSL1;ADAM17;ADAM19;ADAT2;ADORA2A;ADSS;AEBP2;AGK;AGL;AHI1;ALCAM;ANKLE1;ANKLE2;ANKRD13C;ANKRD39;ANKRD44;APAF1;APLP2;APOBEC3G;ARCN1;ARHGAP19;ARL5B;ARL8A;ARMC8;ASB2;ATF5;ATG4D;ATP1A1;ATXN10;AUH;B4GALT5;BAG5;BCL7A;BIRC3;BTN3A3;C10orf12;C10orf137;C11orf47;C14orf104;C14orf138;C14orf43;C15orf17;C17orf75;C17orf85;C18orf22;C19orf2;C1orf149;C1orf174;C2orf37;C3orf60;C4orf43;C5orf24;C5orf35;C6orf108;C6orf192;CALML4;CAMK4;CBLL1;CCDC117;CCDC41;CCDC49;CCDC69;CCPG1;CD22;CD38;CD4;CDC42;CDC42SE1;CDKN1B;CDKN2D;CFDP1;CHD2;CHID1;CHML;CKAP5;CLCN6;CLIP1;CLPTM1L;CMTM3;CMTM8;CNR1;COMMD10;COPI;COTL1;CPOX;CRAMP1L;CREB3L2;CREB5;CRTAP;CSAD;CSK;CSRP1;CXCR5;CXorf23;DACT3;DAP;DBN1;DDX17;DENND4B;DENND5A;DENND5B;DERL1;DLG3;DNAJB1;DNAJB2;DNAJB4;DNAJB5;DNAJC21;DOCK8;DOT1L;EAF1;ECT2;EFNB2;EIF2C2;EIF2C3;ELMO1;EML2;ENDOD1;ESR2;ETNK1;ETS2;EVL;EZH1;FAHD1;FAM102A;FAM102B;FAM108C1;FAM116A;FAM118A;FAM177A1;FAM40A;FBXO11;FBXO46;FBXO6;FBXO8;FCHSD2;FERMT3;FLJ12529;FLJ25006;FLJ31306;FLNB;FNBP4;FTSJD1;FUBP1;FUCA1;FUT8;GABARAPL1;GATS;GCAT;GCLM;GCNT1;GLS;GOLPH3L;GORASP1;GOSR1;GPR160;GPR172A;GRAMD1C;GRB2;GRINA;GTPBP8;HDAC7;HEG1;HHEX;HIATL1;HIBADH;HIGD1A;HIVEP2;HMG20A;HMG2B;HSH2D;HSPH1;HYOU1;ICAM1;ICK;IL21R;IL27RA;IL28RA;INO80;INPP5B;INPP5E;IQGAP2;IRF2;IRF4;ITPKB;ITPR1;JAG1;JHDM1D;JMY;KAT2A;KBTBD6;KCNK6;KDEL2;KIAA0146;KIAA0182;KIAA0494;KIAA1219;KIAA1333;KIAA1737;KIF3A;KHLH24;KLRC4;LASP1;LDLRAP1;LHFPL2;LIG3;LIMA1;LIN7C;LMNB2;LOC100131989;LOC342892;LOC400027;LOC729776;LOC730051;LPAR2;LPCAT1;LPAT1;LRRC25;LRR1Q3;LRRK1;LUC7L;LZTFL1;LZTS1;MAP3K8;MAP4;MAPKAPK5;MAST3;MDH2;MED14;MED21;METTL10;MGC29506;MICAL3;MLH3;MLLT6;MEPE1;MRPS25;MSL2;MTHFD2;MTMR15;MTX3;MXD1;NAP5;NASP;NCAPG2;NCKIPSD;NCOR1;NDRG3;NECAP2;NEDD4;NFKB1B;NHEDC2;NPAS2;NSBP1;NUAK2;NUCB1;NUCKS1;NUFIP2;NUP210;NUP35;ODF2;OLFML2A;OPTN;ORAI2;OSBPL3;PAK2;PANK4;PAPOLA;PARP1;PARP12;PCID2;PCNXL3;PDCD4;PDIA6;PDIK1L;PDS5A;PHAX;PHC3;PHF19;PHKB;PHTF2;PIAS3;PLAGL2;PLEKHF2;PLEKHJ1;PMAIP1;PNKD;POGZ;POLR1E;POR;PORN;PPFIA1;PPL4;PPM1G;PPP1R12A;PPP1R16B;PPP2CA;PPP2R5C;PPP3R1;PREP;PREX1;PRKD2;PRKD3;PRXK;PRXK;PRPF3;PTK2B;PTPRJ;QTRTD1;RAB11FIP4;RAB33B;RAB3GAP1;RAB5B;RAB7A;RAB7L1;RAB8A;RAB8B;RABGGTB;RAD23A;RAD52;RAF1;RARA;RBBP5;RBM15;RBM25;RBM28;RBM38;RCOR1;RCSD1;RGS10;RICTOR;RNF10;RNF115;RNF166;RPN1;RPS6KA1;RSAD1;SACM1L;SAFB2;SCLT1;SEC24D;SEMA4A;SERPINB9;SFRS14;SGPP1;SH2B3;SH2D3A;SH2D3C;SH3RF1;SLC20A1;SLC22A15;SLC25A25;SLC25A27;SLC25A39;SLC25A42;SLC33A1;SLC44A2;SLC48A1;SMAD5;SMAP1;SMARCC2;SMG7;SMURF2;SNRNP40;SNRNP48;SOD2;SP2;SPATA5;SPEN;SPG21;SREBF1;SSR3;SSRP1;STAR1;STARD3;STAU1;STXBP3;SU DS3;SUMO1;SWAP70;TADA2B;TAF4B;TAF8;TBC1D10B;TBC1D20;TBCCD1;TCERG1;TCF12;TERF2IP;TESK2;TFE3;THUMP D1;TIGD1;TLE3;TLK1;TMBIM1;TMC6;TMEM123;TMEM159;TMEM192;TMEM48;TMTC4;TMUB2;TNFAIP1;TOB1;TP53INP2;TPD52;TPM2;TRA2A;TRIM4;TSPYL4;TTC14;TTC9;TTF2;TUBE1;TUBGCP3;TXLNA;TYRP1;UAP1L1;UBE4B;UBFD1;UBQLN2;UBTF;UIMC1;ULK3;USP45;VPS26B;WBP2;WDR32;WDR33;WDR44;WDR51B;WDYHV1;WEE1;WHSC1;WHSC2;WIPF2;YPE L1;YTHDC2;YWHAH;ZBTB10;ZBTB2;ZBTB20;ZBTB34;ZBTB41;ZBTB8;ZDHHC18;ZDHHC23;ZGPAT;ZNF22;ZNF227;ZNF294; ZNF345;ZNF561;ZNF587;ZNF664;ZNF721;ZNF770;ZNF823;ZNR2

7.2.2 Kandidaten aus den EaHy-miRK10/12-Zellen

($\Sigma=825$)

ACACA;ACAD8;ACOT7;ACTR6;ADIPOR2;ADSS;AGPAT2;AGPAT5;AGPS;AKAP12;AKIRIN2;ALDH3A2;ALDH7A1;ALG14;ALK BH4;ALKBH8;ALS2CL;ANGPT1;ANKLE2;ANKRD13C;ANKRD32;ANTXR2;ANXA5;AP2A1;AP2A2;AP3D1;APAF1;APBA1;APL N;APLP2;APPL1;ARFIP1;ARHGAP11A;ARHGAP18;ARHGAP21;ARHGAP26;ARHGAP29;ARHGAP5;ARHGEF3;ARID4A;ARID 4B;ARL13B;ARL14;ARL6IP1;ARL6IP6;ARPC1A;ARPC4;ARRB1;ASCC3;ASF1A;ASF1B;ATAD2;ATAD2B;ATE1;ATP11C;ATP1 3A3;ATXN1;B3GNT2;B4GALT1;B4GALT6;BAG5;BBS7;BCKDHB;BCL10;BCL2L11;BICD2;BIN1;BMPR2;BRCA2;BRMS1L;BR WD1;BSG;BUB1;BUB3;C10orf18;C11orf30;C12orf32;C12orf41;C12orf48;C14orf100;C14orf104;C14orf108;C14orf145;C14orf14 7;C14orf43;C15orf40;C16orf75;C17orf75;C17orf85;C18orf55;C19orf2;C1orf103;C1orf174;C1QBP;C21orf66;C2CD2;C2orf34;C3 orf62;C4orf15;C4orf16;C4orf30;C4orf32;C4orf43;C4orf46;C5orf22;C5orf44;C6orf62;C8orf38;C9orf25;C9orf3;CALM1;CALML4;C AND1;CARHSP1;CASK;CASP2;CASP3;CASP8;CASP9;CBX5;CCDC117;CCDC47;CCDC58;CCDC75;CCDC76;CCN D1;CCNF;CCNT2;CD109;CD40;CD47;CD70;CD93;CDC2;CDC42;CDC42SE2;CDC7;CDK9;CDKAL1;CDKN2C;CENPF;CENPQ ;CEP120;CEP76;CERK;CFAR;CHD1;CHD2;CHD9;CHM;CHRNA5;CHRN1;CLASP1;CLIC2;CLSPN;CNIH3;CNNM3;CNOT6L ;CNTLN;COL4A2;COPG;COPS7B;COX16;CPS1;CPSF2;CREBZF;CRKL;CSAD;CSDA;CSE1L;CSNK1A1;CSNK1G1;CSTF1;C STF2;CTAGE5;CTBP1;CTDSPL2;CUEDC1;CWF19L1;CXorf15;CYB5B;CYP26B1;DAAM1;DCP2;DDAH1;DDX46;DEDD;DHC R24;DHX35;DLD;DMTF1;DNA2;DNAJB14;DNAJB4;DNAJC14;DNAJC21;DNAJC5;DSN1;DTL;DUSP4;DUSP6;DUT;E2F1;EAF1 ;EEA1;EED;EGFL7;E124;EID1;EID2B;EIF1AX;EIF2S2;ELAVL2;ELF2;ELK3;ELMO1;EML4;ENAH;ENDOGL1;EPHA4;ERAP2;E RMP1;ESAM;ETAA1;EXOC5;EXOC6;EXOSC6;EXTL2;FAF2;FAHD1;FAM102B;FAM108B1;FAM111B;FAM172A;FAM175B;FA

M53C;FAM55C;FAM73A;FAM76B;FANCD2;FANCG;FAR1;FBXW7;FCHO2;FDFT1;FGFR1OP2;FKBP5;FLI1;FLJ12529;FMNL3;FRMD3;FRMD4B;FRY;FUBP1;FUBP3;FUT8;FYTTD1;G3BP1;G3BP2;GALNT13;GALNT4;GALNT7;GCC2;GDAP2;GIMAP7;GINS1;GLT8D3;GNAI1;GNL3L;GPBP1;GPR177;GPSM2;GRPEL2;GSN;GSPT1;GTF2I;H2AFV;HACL1;HAVCR2;HBS1L;HECTD1;HECTD2;HELLS;HIRA;HMG20A;HMGB2;HMGB3;HMGCR;HNRNPA3;HNRNPD;HNRNPF;HNRNPH3;HNRNPR;HNRPDL;HOK3;HRH1;HS2ST1;HYAL2;IFNAR1;IFNE1;IFNGR2;IFT80;IFT81;IL1RAPL1;IL6ST;ILF3;INCENP;INO80C;INPP5A;INSM2;IPO11;IPO8;IQCB1;IQGAP1;IRAK2;IRF2;ITFG3;ITGA10;ITGA6;ITGB5;ITPKB;JAK1;JAK2;JAM3;KBTBD4;KCTD12;KCTD3;KIAA0146;KIAA0232;KIAA0754;KIAA0776;KIAA1199;KIAA1274;KIAA1462;KIAA1522;KIAA1586;KIAA2026;KIF11;KIF3C;KLF9;KLHDC3;KLHL5;KLHL6;KPNA1;KRAS;KRIT1;KSR2;L3MBTL3;LANCL1;LAPTM5;LARP4;LARS;LHX2;LIAS;LIG1;LIMD1;LMBR1;LMNB2;LOC100128274;LOC100129502;LOC100129905;LOC100130123;LOC100131989;LOC100132181;LOC100133914;LOC203547;LOC253039;LPCAT3;LPAT1;LPHN2;LPIN1;LPIN2;LRIG2;LRP12;LRRC40;LRRC58;LRRC8B;LRRC8C;LSS;LTBP3;LTBP4;LYSMD4;MACF1;MALL;MAN2A1;MAP2;MARCH5;MASTL;MAZ;MBD4;MBNL1;MBTD1;MCM10;MCM4;MCM5;MDM1;MDM2;MDM4;MED4;MEF2A;MEGF9;MEIS2;METTL4;METTL7A;MFN2;MIB1;MIER3;MKLN1;MLF1IP;MMP14;MMRN2;MN1;MND1;MOBK1A;MOCS3;MPZL2;MRE11A;MRFAP1L1;MSL2;MSL3;MTF2;MTFMT;MTMR10;MTMR9;MYO5A;NAB1;NAP1L4;NARG1;NARG1L;NAT11;NAV1;NCAPG;NCAPG2;NCBP1;NCOA3;NCOR1;NDNL2;NEIL3;NET1;NFAT5;NFKBIA;NFYA;NID1;NIPBL;NLK;NLR3;NLRP1;NOD1;NOL9;NPAC;NPAS2;NPAT;NPDC1;NRGN;NRP2;NSBP1;NT5DC1;NTNG2;NUCKS1;NUP155;OPA1;ORAI2;OSBP1;OSBP3;OSMR;OTUD6B;P2RY5;PAK2;PALB2;PAPD4;PAPOLA;PARP14;PAXIP1;PBXIP1;PCNA;PCSK7;PCTK2;PCYOX1;PCYT1A;PDE4D;PDE6D;PDGFB;PDGFC;PDS5A;PECAM1;PEX13;PGAP1;PGM2L1;PHACTR2;PHAX;PHF14;PHF21A;PHKG2;PIF1;PIK3R1;PIK3R3;PKN2;PLAA;PLCB1;PLCG1;PLEKHO2;PLK4;PLRG1;PMAIP1;POGZ;POLE3;POLH;POLQ;POLS;POMT2;PPF1BP1;PIIB;PPI4;PPI5;PPL;PPM1F;PPP1CB;PPP3R1;PPTC7;PRKACB;PRKAR2A;PRKD2;PRKD3;PRKDC;PRKX;PRPF38B;PRSS23;PRTFDC1;PSIP1;PTPN11;PTPRB;PTPRE;PTPRR;PUS7L;RAB11A;RAB35;RAB4A;RAB5B;RAB8A;RAD51AP1;RAD52;RANBP2;RANBP6;RAP2A;RAPGEF1;RAPGEF5;RBBP4;RBBP5;RBL1;RBM12B;RBM14;RBM15;RBM22;RBM25;RBM3;RECQL;REEP3;REL;RFC1;RFC2;RGL1;RHOB;RHOBTB1;RICTOR;RIF1;RILPL2;RLF;RNASE1;RNF213;RNF219;ROD1;RPN1;RPRD1A;RRM2B;RRP15;RSF1;RSRC2;RYK;S1PR1;SAFB;SAFB2;SAMHD1;SAV1;SC4MOL;SCARB2;SCARF1;SCD5;SCLT1;SCML1;SCOC;SEC31A;SELO;SEMA6B;SEN1;SEN6;SERAD3;SESN1;SFPQ;SFRS10;SFRS11;SFRS12;SFRS14;SFRS3;SGIP1;SGK269;SH2D3C;SH3BP2;SH3BP5;SH3D19;SHMT1;SHPRH;SHROOM3;SHROOM4;SIKE;SKIV2L2;SKP1;SLC12A2;SLC16A1;SLC25A37;SLC29A1;SLC30A7;SLC35E4;SLC39A9;SLC44A1;SLC4A7;SLC5A3;SLC6A6;SLTM;SMAD1;SMAD3;SMAD5;SMARCC1;SMC2;SMC3;SMC4;SMC5;SMC6;SNCG;SNRK;SNRNP48;SNRPD3;SNX4;SORBS2;SORL1;SOS1;SOS2;SOX4;SPAST;SPCS2;SPEN;SPIN3;SPTY2D1;SQLE;SR140;SREBF1;SSH2;SSR3;SSU72;ST3GAL5;STARD8;STIP1;STRN3;STX16;STX6;STXBP3;STXBP5;SUCLA2;SUDS3;SUFU;SVIP;SWAP70;SYCP2L;SYNCRIP;SYT1;TACC1;TAF15;TAF5;TAOK2;TBC1D24;TBCCD1;TBK1;TBL1X;TBL1XR1;TCEA2;TCF4;TCF7L1;TEP1;TET3;TGFBRAP1;TGIF2;THUMPD1;TIA1;TIPL1;TIPL2;TJP1;TLE4;TM4SF18;TMEM123;TMEM135;TMEM156;TMEM159;TMEM168;TMEM200A;TMEM49;TME57;TMEM66;TMEM77;TMEM97;TMOD3;TNFSF15;TNFSF9;TOMM22;TOP2B;TOPBP1;TOR1AIP1;TOR3A;TP53;TPR;TPST2;TRA2A;TRAPP10;TRIB2;TRIM2;TRIM21;TRIM23;TRIM52;TRIM59;TRMT2B;TRPC1;TRRAP;TSGA10;TSN;TSPAN15;TSPAN3;TSPAN9;TTC37;TTF2;TTK;TUSC1;TWF2;TXNDC1;TXNDC10;TXNDC13;TXNIP;UBA6;UBE2H;UBE2J1;UBE2N;UBE4B;UBN1;UBXN4;UBXN7;UCHL5;UHMK1;UNC119B;UNG;USP22;USP34;USP37;USP38;UTP15;UTRN;UTX;VASP;VISA;VPS13A;WDFY1;WDHD1;WDR43;WDR51B;WDR76;WDR89;WEE1;WIBG;WRB;XIRP2;XPO4;XPO7;YES1;YPEL2;YTHDC2;YWHAH;ZBTB1;ZBTB20;ZBTB34;ZBTB6;ZC3H12C;ZC4H2;ZDHHC17;ZDHHC6;ZEB1;ZFP112;ZFP91;ZFR;ZFX;ZFYVE16;ZHX1;ZMAT3;ZMYM1;ZMYM2;ZMYM6;ZNF146;ZNF207;ZNF217;ZNF235;ZNF238;ZNF294;ZNF323;ZNF326;ZNF362;ZNF488;ZNF518A;ZNF521;ZNF551;ZNF587;ZNF644;ZNF652;ZNF684;ZNF721;ZNF740;ZNF800;ZYG11B

7.2.3 Kandidaten in beiden Zelllinien

($\Sigma=93$)

ADSS;ANKLE2;ANKRD13C;APAF1;APLP2;BAG5;C14orf104;C14orf43;C17orf75;C17orf85;C19orf2;C1orf174;C4orf43;CALML4;CCDC117;CCDC41;CDC42;CHD2;COPG;CSAD;DNAJB14;DNAJC21;EAF1;ELMO1;FAHD1;FAM102B;FLJ12529;FUBP1;FUT8;HMG20A;HMGB2;IRF2;ITPKB;KIAA0146;LMNB2;LOC100131989;LPAT1;MSL2;NCAPG2;NCOR1;NPAS2;NSBP1;NUCKS1;ORAI2;OSBP3;PAK2;PAPOLA;PDS5A;PHAX;PMAIP1;POGZ;PPI4;PPP3R1;PRKD2;PRKDC;PRKX;PRPF38B;RAB5B;RAB8A;RAD52;RBBP5;RBM15;RBM25;RICTOR;RPN1;SAFB2;SCLT1;SFRS14;SH2D3C;SMAD5;SNRNP48;SPEN;SREBF1;SSR3;STXBP3;SUDS3;SWAP70;TBCCD1;THUMPD1;TMEM123;TMEM159;TRA2A;TTF2;UBE4B;WDR51B;WEE1;YTHDC2;YWHAH;ZBTB20;ZBTB34;ZNF294;ZNF587;ZNF721

7.3 Anreicherung vorhergesagter Bindungsstellen in den Zielgenen zellulärer miRNAs

Potenzielle Bindestellen für zelluläre miRNAs in den 3'UTRs der Transkripte, welche durch AGO2-IPs um mindestens einen Faktor 1,2x in unterschiedlichen B-Zellen angereichert waren (Zielgene für zelluläre miRNAs), wurden mit Hilfe des PITA-Algorithmus vorhergesagt. Unterschiedliche Schwellenwerte für $\Delta\Delta G$ wurden verwendet, um eine Verzerrung durch zu stringente oder zu lockere Kriterien zu vermeiden. Der p-Wert bezieht sich auf die Wahrscheinlichkeit, dass miRNA-Bindestellen unter den gegebenen Parametern überrepräsentiert sind.

$\Delta\Delta G$ cut off	Quotenverhältnis	log Quotenverhältnis	p-Wert
0	5,476	2,453	6,19E-55
-1	5,534	2,468	9,31E-57
-2	5,289	2,403	2,06E-57
-3	5,239	2,389	5,15E-60
-4	5,084	2,346	6,19E-63
-5	4,480	2,164	1,06E-61
-6	3,928	1,974	3,36E-60
-7	3,397	1,764	5,76E-59
-8	2,797	1,484	2,62E-53
-9	2,487	1,314	7,81E-52
-10	2,169	1,117	5,40E-47

7.4 RISC-IP-Analysen identifizieren Ziel-Gene für KSHV-miRNAs

Ziel-Gene für miRNAs mussten folgende Kriterien erfüllen:

KSHV-miRNA-Ziel-Gene, welche nicht von zellulären miRNAs reguliert werden (Liste 1 & 2)

- a) Durchschnittliche Anreicherung in DG75-eGFP: <1,2
- b) Durchschnittliche Anreicherung in BCBL-1: >3,0
- c₁) Durchschnittliche Anreicherung in DG75miRK10/12: >2,0 : Zeigt an, dass das Gen von einer der 10 intro-nischen miRNAs reguliert wird. **(Liste 1)**
- c₂) Durchschnittliche Anreicherung in DG75miRK10/12: <2,0: Entweder ein Ziel-Gen für andere als die intro-nischen KSHV-miRNAs oder der Grund ist die schwächere Expression von KSHV-miRNAs in der Zelllinie DG75miRK10/12. **(Liste 2)**

KSHV-miRNA-Ziel-Gene, welche zusätzlich von zellulären miRNAs reguliert werden (Liste 3)

- a) Anreicherung in DG75-eGFP: >1,2
- b) Anreicherung in BCBL-1 mindestens 3-fach stärker als in DG75-eGFP

Zusatzkriterium: Keine Induktion der Gene durch KSHV-Infektion

Expressionshöhen in den BrdU-IPs von BCBL-1 nicht >1,5-fach höher als DG75-eGFP

Rot: Untersucht mit TaqMan-PCRs und bestätigt. **Blau:** Untersucht mit TaqMan-PCRs, nicht bestätigt.

1: Transkripte angereichert in BCBL-1 (>3x) und DG75miRK10/12 (>2x)

Gen-Symbol	Gen-Beschreibung
NHP2L1	NHP2 non-histone chromosome protein 2-like 1 (S. cerevisiae) (NHP2L1), transcript variant 1, mRNA.
GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1 (GTSE1), mRNA.
CDK5RAP1	CDK5 regulatory subunit associated protein 1
GEMIN8	gem (nuclear organelle) associated protein 8 (GEMIN8), transcript variant 3, mRNA.
RNF8	ring finger protein 8 (RNF8), transcript variant 1, mRNA.
NISCH	nischarin (NISCH), mRNA.

2: Transkripte angereichert in BCBL-1 (>3x), Anreicherung in DG75miRK10/12 (<2,0x)

Gen-Symbol	Gen-Beschreibung
RABL5	RAB, member RAS oncogene family-like 5 (RABL5), mRNA.
FBXO7	chromosome 17 open reading frame 81 (C17orf81), transcript variant 2, mRNA.
FAM86C	family with sequence similarity 86, member C (FAM86C), transcript variant 1, mRNA.
C22orf28	chromosome 22 open reading frame 28 (C22orf28), mRNA.
C9orf6	chromosome 9 open reading frame 6, mRNA (cDNA clone MGC:8859 IMAGE:3910513), complete cds.
SF3B5	splicing factor 3b, subunit 5, 10kDa (SF3B5), mRNA.
LOC492303	FAM51A1 pseudogene (LOC492303) on chromosome 1.
AHCY	S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY), mRNA.
PPP3CA	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform (PPP3CA), mRNA.
C17orf81	chromosome 17 open reading frame 81 (C17orf81), transcript variant 2, mRNA.
ZNF184	zinc finger protein 184 (ZNF184), mRNA.
MECR	mitochondrial trans-2-enoyl-CoA reductase (MECR), nuclear gene encoding mitochondrial protein
C16orf13	chromosome 16 open reading frame 13 (C16orf13), transcript variant 1, mRNA.
GEMIN5	gem (nuclear organelle) associated protein 5 (GEMIN5), mRNA.
WASF1	WAS protein family, member 1 (WASF1), transcript variant 1, mRNA.
MNAT1	menage a trois homolog 1, cyclin H assembly factor (Xenopus laevis) (MNAT1), mRNA.
TUSC4	tumor suppressor candidate 4 (TUSC4), mRNA.
IL22RA1	interleukin 22 receptor, alpha 1 (IL22RA1), mRNA.
CYC1	cytochrome c-1 (CYC1), mRNA.
ZNF569	zinc finger protein 569 (ZNF569), mRNA.
hCG_1641703	similar to hCG1641703 gene:ENSG00000217644

PIK3CA	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide (PIK3CA), mRNA.
WRNIP1	Werner helicase interacting protein 1 (WRNIP1), transcript variant 1, mRNA.
TBC1D14	TBC1 domain family, member 14 (TBC1D14), transcript variant 1, mRNA.
DARS2	aspartyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (DARS2)
NAF1	nuclear assembly factor 1 homolog (S. cerevisiae) (NAF1), transcript variant 1, mRNA.
ARHGAP23	similar to Rho GTPase-activating protein 23 gene:ENSG00000167433
APBA3	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 3 (X11-like 2) (APBA3), mRNA.
ZFP82	zinc finger protein 82 homolog (mouse) (ZFP82), mRNA.
TOM1L1	target of myb1 (chicken)-like 1 (TOM1L1), mRNA.
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), mRNA.
hCG_2004593	ribosomal protein L17-like (LOC645296), mRNA.
LOC541472	hypothetical LOC541472, mRNA (cDNA clone IMAGE:3463942), complete cds.
ZNF829	zinc finger protein 829 (ZNF829), mRNA.
FOSL1	FOS-like antigen 1 (FOSL1), mRNA.
SNORA75	small nucleolar RNA, H/ACA box 75 (SNORA75) on chromosome 2.

3: Transkripte angereichert in BCBL-1 und DG75-eGFP, aber mind. 3x stärker in BCBL-1 als in DG75-eGFP

Gen-Symbol	Gen-Beschreibung
ZNF684	zinc finger protein 684 (ZNF684), mRNA.
LRRC8D	leucine rich repeat containing 8 family, member D (LRRC8D), mRNA.
CCNF	cyclin F (CCNF), mRNA.
RBM22	RNA binding motif protein 22 (RBM22), mRNA.
C6orf66	chromosome 6 open reading frame 66 (C6orf66), mRNA.
VRK3	vaccinia related kinase 3 (VRK3), transcript variant 1, mRNA.
NDUFA7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 7, 14.5kDa (NDUFA7), mRNA.
CANT1	calcium activated nucleotidase 1 (CANT1), mRNA.
MED6	mediator complex subunit 6 (MED6), mRNA.
PPRC1	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator-related 1 (PPRC1), mRNA.
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (NFKBIA), mRNA.
LETM2	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 2 (LETM2), mRNA.
R3HDM2	R3H domain containing 2 (R3HDM2), mRNA.
MRPL10	mitochondrial ribosomal protein L10 (MRPL10), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
SLC1A5	solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5 (SLC1A5), mRNA.
C14orf119	chromosome 14 open reading frame 119, mRNA (cDNA clone MGC:4950 IMAGE:3458006)
ZNF420	zinc finger protein 420 (ZNF420), mRNA.
ZNF799	zinc finger protein 799 (ZNF799), mRNA.
C18orf55	chromosome 18 open reading frame 55 (C18orf55), mRNA.
ZNF564	zinc finger protein 564 (ZNF564), mRNA.
SUV39H1	suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila) (SUV39H1), mRNA.
MTFMT	mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase (MTFMT), nuclear gene encoding mitochondrial protein,
C17orf44	chromosome 17 open reading frame 44, mRNA (cDNA clone MGC:142124 IMAGE:8322616)
MAP1S	microtubule-associated protein 1S (MAP1S), mRNA.
ZNF383	zinc finger protein 383 (ZNF383), mRNA.
GNRHR2	gonadotropin-releasing hormone (type 2) receptor 2 (GNRHR2) on chromosome 1.
ZNF607	zinc finger protein 607 (ZNF607), mRNA.
FAM86D	Protein FAM86D gene:ENSG00000163612
ZNF670	zinc finger protein 670 (ZNF670), mRNA.
NDUFB10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10, 22kDa (NDUFB10), mRNA.

KSHV-miRNA-Ziel-Gen, erfüllt nicht alle o.g. Kriterien, wurde aber durch TaqMan-PCR bestätigt

Gen-Symbol	Gen-Beschreibung
EXOC6	exocyst complex component 6 (EXOC6), transcript variant 1, mRNA.

7.5 Vergleich mit anderen Studien (Publizierte Zielgene)

Keines der bisher publizierten Zielgene erfüllte unsere sehr stringenten Kriterien, welche angesetzt wurden, um ein Gen als Zielgen für KSHV zu bezeichnen. Einige ließen sich aber dennoch in unseren RISC-IP-Analysen anreichern. Transkripte, welche >2-fach in den KSHV-positiven BCBL-1-Zellen gegenüber nichtinfizierten Zellen angereichert waren, sind rot markiert. Transkripte, welche >1,5-fach angereichert waren sind orange markiert. Die blau markierten Zielgene wurden in den verwendeten Zelllinien nicht exprimiert und können deshalb auch nicht angereichert werden. Die Anreicherung von MICA und MICB wurde in TaqMan-Analysen bestätigt (Daten nicht gezeigt).

KSHV miR-K12-11 and hsa miR-155 targets (Gottwein et al. Nature 2007)⁸²

Gen-Symbol mRNA-Beschreibung

BCLAF1	Homo sapiens BCL2-associated transcription factor 1 (BCLAF1), transcript variant 1, mRNA.
AGTRAP	Homo sapiens angiotensin II receptor-associated protein (AGTRAP), transcript variant 1, mRNA.
BACH1	Homo sapiens BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1 (BACH1)
FOS	Homo sapiens v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS), mRNA.
IKBKE	Homo sapiens inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon (IKBKE)
MAP3K10	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10 (MAP3K10), mRNA.
TWF1	Homo sapiens twinfilin, actin-binding protein, homolog 1 (Drosophila) (TWF1), mRNA.
PIK3CA	Homo sapiens phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide (PIK3CA), mRNA.
RFK	Homo sapiens riboflavin kinase (RFK), mRNA.
RPS6KA3	Homo sapiens ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3 (RPS6KA3), mRNA.
SAMHD1	Homo sapiens SAM domain and HD domain 1 (SAMHD1), mRNA.
SLA	Homo sapiens Src-like-adaptor (SLA), transcript variant 1, mRNA.

KSHV miRNA targets (Skalsky et al. Journal of Virology 2007)¹⁹⁷

Gen-Symbol mRNA-Beschreibung

LDOC1	Homo sapiens leucine zipper, down-regulated in cancer 1 (LDOC1), mRNA.
MATR3	Homo sapiens matrin 3 (MATR3), transcript variant 1, mRNA.
TM6SF1	Homo sapiens transmembrane 6 superfamily member 1 (TM6SF1), mRNA.
PHF17	Homo sapiens PHD finger protein 17 (PHF17), transcript variant L, mRNA.

KSHV miRNA targets (Samols et al. PLoS Pathogens 2007)¹⁸⁵

Gen-Symbol mRNA-Beschreibung

THBS1	Homo sapiens thrombospondin 1 (THBS1), mRNA.
SPP1	Secreted Phosphoprotein 1

KSHV miRNA target (Ziegelbauer et al., Nature Genetics 2008)²²⁴

Gen-Symbol mRNA-Beschreibung

BCLAF1	Homo sapiens BCL2-associated transcription factor 1 (BCLAF1), transcript variant 1, mRNA.
---------------	---

KSHV miRNA target (KSHV-miR-K12-7) (Nachmani et al. Cell Host Microbe 2009)¹⁵⁴

Gen-Symbol mRNA-Beschreibung

MICB	Homo sapiens MHC class I polypeptide-related sequence B (MICB), mRNA.
MICA	Homo sapiens MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA), mRNA.

7.6 Sequenz von LRRC8D und miRK12-3-5p-Bindestelle

Accession: NM_001134479 LRRC8D transcript variant 1; Bindestelle: Grün hinterlegt.

```

1  CCATGTTACG CTTTGTCTAA TTCCCTCGT TACAGAGTCA TGTGCTGCTG
51  CTCCCGTCGC CGCTGCTGCC GCTGCCGCTG CCGCCGCCCG TGGTGCCCGG
101 GTCCTCCCGC CGCGCTTCGA GGTGGCAGCC GCGGGCGGGG CCGCGGGAGC
151 AGGGTCCAGG GTGCAGCGCG CCTTCGCCGC CCCGGCGCGT CCCGGTGCAG
201 CCGCCGCCCG CCGCCGGTGA TGCCGCCACC TCCGGCCTCA GCATAAGCCG
251 TGGCTTGGCG GCCGAGCTGC ACCCCAAGGA AGTGCACGGC TGTCTATAAC
301 GTGCTGCCGG GTCTCAGGAT GGAGGAGTGA AGTCTCCTGT CGCCGTGGTT
351 CCAGCTCCCG GAGCTCGCCC AAGCCCGCTC CCCAGAGAGC GCCCTGAGAG
401 AACAGGTGGG CCGCTTGGTC CAGGAATGTT TACCCTTGCG GAAGTTGCAT
      M F T L A E V A S      Frame 3
451 CACTTAATGA CATTACGCCA ACTTACCGAA TCCTGAAACC ATGGTGGGAT
      L N D I Q P T Y R I L K P W W D      Frame 3
501 GTGTTTTATG ATTACCTAGC TGTTGTTATG TTAATGGTAG CCATCTTTGC
      V F M D Y L A V V M L M V A I F A      Frame 3
551 AGGAACCATG CAACTTACCA AAGATCAGGT GGTCGTGTTG CCAGTATTGC
      G T M Q L T K D Q V V C L P V L P      Frame 3
601 CATCTCTGT AAATCAAAG GCACATACAC CACCAGGAAA TGCCGAGGTC
      S P V N S K A H T P P G N A E V      Frame 3
651 ACCACCAACA TCCCAAAGAT GGAAGCAGCC ACCAACCAAG ACCAAGATGG
      T T N I P K M E A A T N Q D Q D G      Frame 3
701 GCGGACAACA AACGACATTT CCTTTGGGAC ATCTGCTGTG ACACCTGACA
      R T T N D I S F G T S A V T P D I      Frame 3
751 TACCTCTCAG AGCCACATAT CCTCGCACAG ATTTCGCACT TCCAAATCAG
      P L R A T Y P R T D F A L P N Q      Frame 3
801 GAGGCAAAGA AAGAGAAGAA AGATCCAACA GGTCGAAAAA CAAACTTGGA
      E A K K E K K D P T G R K T N L D      Frame 3
851 TTTTCAGCAA TATGTATTTA TTAATCAAAT GTGTACCAT CTGGCCCTTC
      F Q Q Y V F I N Q M C Y H L A L P      Frame 3
901 CGTGGTATT TAAGTACTTT CCATACCTAG CTCTTATACA TACTATTATT
      W Y S K Y F P Y L A L I H T I I      Frame 3
951 CTCATGGTCA GTAGCAACTT TTGGTTCAAA TATCCAAAAA CATGCTCAAA
      L M V S S N F W F K Y P K T C S K      Frame 3
1001 AGTAGAACAT TTTGTTTCAA TATTAGGAAA GTGCTTTGAA TCCCTTTGGA
      V E H F V S I L G K C F E S P W T      Frame 3
1051 CGACAAAAGC GTTGTCTGAG ACAGCATGCG AAGACTCAGA GGAAAACAAG
      T K A L S E T A C E D S E E N K      Frame 3
1101 CAGAAATAA CAGTGCCCA GACTTACCA AAGCATGTTT CTACCAGCAG
      Q R I T G A Q T L P K H V S T S S      Frame 3
1151 TGATGAAGGG AGCCCCAGTG CCAGTACACC AATGATCAAT AAAACTGGCT
      D E G S P S A S T P M I N K T G F      Frame 3
1201 TTAATTTTC AGCTGAGAAG CCTGTGATTG AAGTCCCAG CATGACAATC
      K F S A E K P V I E V P S M T I      Frame 3
1251 CTGGATAAAA AGGATGGAGA GCAGGCCAAA GCCCTGTTTG AGAAAGTGAG
      L D K K D G E Q A K A L F E K V R      Frame 3
1301 GAAGTCCCGT GCCCATGTGG AAGATAGTGA CTTGATCTAT AAACCTATG
      K F R A H V E D S D L I Y K L Y V      Frame 3
1351 TGGTCCAAAC AGTTATCAAA ACAGCCAAGT TCATTTTTAT TCTCTGCTAT
      V Q T V I K T A K F I F I L C Y      Frame 3
1401 ACAGCGAACT TTGTCAACGC AATCAGCTTT GAACACGTCT GCAAGCCCAA
      T A N F V N A I S F E H V C K P K      Frame 3
1451 AGTTGAGCAT CTGATTGGTT ATGAGGTATT TGAGTGCACC CACAATATGG
      V E H L I G Y E V F E C T H N M A      Frame 3
1501 CTTACATGTT GAAAAAGCTT CTCATCAGTT ACATATCCAT TATTTGTGTT
      Y M L K K L L I S Y I S I I C V      Frame 3
1551 TATGGCTTTA TCTGCCTCTA CACTCTCTTC TGGTTATTCA GGATACCTTT
      Y G F I C L Y T L F W L F R I P L      Frame 3
1601 GAAGGAATAT TCTTTGAAA AAGTCAGAGA AGAGAGCAGT TTTAGTGACA
      K E Y S F E K V R E E S S F S D I      Frame 3
1651 TTCCAGATGT CAAAAACGAT TTTGCGTTCC TTCTTCACAT GGTAGACCAG
      P D V K N D F A F L L H M V D Q      Frame 3
1701 TATGACCAGC TATATTCCAA GCGTTTGGT GTGTCTTGT CAGAAGTTAG
      Y D Q L Y S K R F G V F L S E V S      Frame 3
1751 TGAATAAAA CTTAGGGAAA TTAGTTTGAA CCATGAGTGG ACATTTGAAA
      E N K L R E I S L N H E W T F E K      Frame 3
1801 AACTCAGGCA GCACATTTCA CGCAACGCCC AGGACAAGCA GGAGTTGCAT
      L R Q H I S R N A Q D K Q E L H      Frame 3
1851 CTGTTTCATG TGTCGGGGGT GCCCGATGCT GTCTTTGACC TCACAGACCT
      L F M L S G V P D A V F D L T D L      Frame 3
1901 GGATGTGCTA AAGCTTGAAC TAATTCAGA AGCTAAAATT CCTGCTAAGA
      D V L K L E L I P E A K I P A K I      Frame 3

```

1951 TTTCTCAAAT GACTAACCTC CAAGAGCTCC ACCTCTGCCA CTGCCCTGCA
S Q M T N L Q E L H L C H C P A Frame 3

2001 AAAGTTGAAC AGACTGCTTT TAGCTTTCTT CGCGATCACT TGAGATGCCT
K V E Q T A F S F L R D H L R C L Frame 3

2051 TCACGTGAAG TTCACTGATG TGGCTGAAAT TCCTGCCTGG GTGTAATTTGC
H V K F T D V A E I P A W V Y L L L Frame 3

2101 TCAAAAACCT FCGAGAGTTG TACTTAATAG GCAATTTGAA CTCTGAAAAC
K N L R E L Y L I G N L N S E N Frame 3

2151 AATAAGATGA TAGGACTTGA ATCTCTCCGA GAGTTGCGGC ACCTTAAGAT
N K M I G L E S L R E L R H L K I Frame 3

2201 TCTCCACGTG AAGAGCAATT TGACCAAAGT TCCCTCCAAC ATTACAGATG
L H V K S N L T K V P S N I T D V Frame 3

2251 TGGCTCACA TCTTACAAAG TTAGTCATTC ATAATGACGG CACTAAACTC
A P H L T K L V I H N D G T K L Frame 3

2301 TTGGTACTGA ACAGCCTTAA GAAAATGATG AATGTCGCTG AGCTGGAAC
L V L N S L K K M M N V A E L E L Frame 3

2351 CCAGAACTGT GAGCTAGAGA GAATCCACA TGCTATTTTC AGCCTCTCTA
Q N C E L E R I P H A I F S L S N Frame 3

2401 ATTTACAGCA ACTGATTTA AAGTCCAATA ACATTGCGAC AATTGAGGAA
L Q E L D L K S N N I R T I E E Frame 3

2451 ATCATCAGTT TCCAGATTT AAAACGACTG ACTTGTTTAA AATTATGGCA
I I S F Q H L K R L T C L K L W H Frame 3

2501 TAACAAAATT GTTACTATTC CTCCCTCTAT TACCCATGTC AAAAAGTGG
N K I V T I P P S I T H V K N L E Frame 3

2551 AGTCACTTTA TTTCTCTAAC AACAACTCG AATCCTTACC AGTGGCAGTA
S L Y F S N N K L E S L P V A V Frame 3

2601 TTTAGTTTAC AGAACTCAG ATGCTTAGAT GTGAGCTACA ACAACATTC
F S L Q K L R C L D V S Y N N I S Frame 3

2651 AATGATTCCA ATAGAATAG GATTGCTTCA GAACCTGCAG CATTTCATA
M I P I E I G L L Q N L Q H L H I Frame 3

2701 TCACTGGPAA CAAAGTGGAC ATTCTGCCAA AACAAATGTT TAAATGCATA
T G N K V D I L P K Q L F K C I Frame 3

2751 AAGTTGAGGA CTTTGAATCT GGGACAGAAC TGCATCACCT CACTCCCAGA
K L R T L N L G Q N C I T S L P E Frame 3

2801 GAAAGTTGGT CAGCTCTCCC AGCTCACTCA GCTGGAGCTG AAGGGGAAC
K V G Q L S Q L T Q L E L K G N C Frame 3

2851 GCTTGGACCG CCTGCCAGCC CAGCTGGGCC AGTGTGGGAT GCTCAAGAAA
L D R L P A Q L G Q C R M L K K Frame 3

2901 AGCGGGCTTG TTGTGGAAGA TCACCTTTTT GATACCCTGC CACTCGAAGT
S G L V V E D H L F D T L P L E V Frame 3

2951 CAAAGAGGCA TTGAATCAAG ACATAAATAT TCCCTTTGCA AATGGGATTT
K E A L N Q D I N I P F A N G I * Frame 3

3001 AAATAAGAT AATATATGCA CAGTGATGTG CAGGAACAAC TTCCTAGATT

3051 GCAAGTGCTC ACGTACAAGT TATTACAAGA TAATGCATTT TAGGAGTAGA

3101 TACATCTTTT AAAATAAAAC AGAGAGGATG CATAGAAGGC TGATAGAAGA

3151 CATAACTGAA TGTTCAATGT TTGTAGGGTT TTAAGTCATT CATTCCAAA

3201 TCATTTTTTT TTTTCTTTTG GGGAAAGGGA AGGAAAAATT ATAATCACTA

3251 ATCTTGTTTC TTTTTAAATT GTTTGTAAGT TGGAATGCTGC CGCTACTGAA

3301 TGTTTACAAA TTGCTTGCCCT GCTAAAGTAA ATGATTAAAT TGACATTTTC

3351 TTAATATATC ACCTTTTTTTG AGGGGTCTTA ATTTACTTTG CTTAATTGGT

3401 GCAATATTGC TTTAACTCCG TTCACTAAAG ACAAACACAT CAAGTCCAAA

3451 CTTGTAAATT TAGATTTGCT GAAATACTGA TTTATTTCCCT GTTTTAATTT

3501 AAAGTGCCTC AAGTAAGCAC CTCTCACAAC AGTTGACTGG TACTGCTGCT

3551 CCTGAGCACC TCGTGTACATA GATTTTATAC TCTTACAGAC TTGGAATGCA

3601 GTAGAGGTAT GTGGATTTTT AGGGGTTTTG TTTTTTTAAG AATAAGTAAC

3651 AAGAAATAAC ACATTTCTTA ATAATAGCTT TTTTGACATA GTTTGGAGTT

3701 CTGATTATAT GGTACATTTT TCTACCAGTA ATATAGGGTT GCCAATAAAT

3751 AGAAAATGTT TTCTAAAAAT AAATTTTATT ACAACAAAAA AAAAA

7.7 Mutationen in den SEED-Matches der vermeintlichen Zielgene

Gezeigt sind die miRNAs und die Interaktionen mit ihren Bindungsstellen in den mRNAs von LRRC8D (a), NHP2L1 (b) und GEMIN8 (c). Die Basenpaare, welche in den entsprechenden Bindestellen mutiert wurden, sind rot markiert.

a)

```
LRRC8D (mut5):  5' AUGCUGCCG-CUACUCACCAGU 3'
LRRC8D:        5' AUGCUGCCG-CUACUGAAUGUU 3'
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
miRK12-3 (5p): 3' GCGACGGCAGGAGUCUUACACU 5'
```

b)

```
NHP2L1 (mut5): 5' CCGCUGCUGUGUGAAGACAAGCACAGCC 3'
NHP2L1:       5' CCGCUGCUGUGUGAAGACAAGAAUGUGC 3'
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
miRK12-3 (5p): 3' GCGACGGCAGGAG-----UCUUACACU 5'
```

c)

```
GEMIN8 (mut5): 5' AAGCUACCAGGCCUUGGACACAGAC 3'
GEMIN8:       5' AAGCUACCAGGCCUUGGUAUUCUC 3'
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
miRK12-4-3p:  3' AG-UCGA---UCCGGAGUCAUAAGA 5'
```

8 Literaturverzeichnis

- ¹ V. Ambros, *et al.*, "A uniform system for microRNA annotation," *RNA*. **9**(3), 277 (2003).
- ² M. Arguello, *et al.*, "Disruption of the B-cell specific transcriptional program in HHV-8 associated primary effusion lymphoma cell lines," *Oncogene* **22**(7), 964 (2003).
- ³ L. Arvanitakis, *et al.*, "Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus," *Blood* **88**(7), 2648 (1996).
- ⁴ U. H. Athale, *et al.*, "Influence of HIV epidemic on the incidence of Kaposi's sarcoma in Zambian children," *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **8**(1), 96 (1995).
- ⁵ D. Baek, *et al.*, "The impact of microRNAs on protein output," *Nature* **455**(7209), 64 (2008).
- ⁶ S. Bagga, *et al.*, "Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation," *Cell* **122**(4), 553 (2005).
- ⁷ M. E. Ballestas, P. A. Chatis, and K. M. Kaye, "Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen," *Science* **284**(5414), 641 (1999).
- ⁸ M. E. Ballestas and K. M. Kaye, "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 mediates episome persistence through cis-acting terminal repeat (TR) sequence and specifically binds TR DNA," *J. Virol.* **75**(7), 3250 (2001).
- ⁹ N. Bandi, *et al.*, "miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer," *Cancer Res.* **69**(13), 5553 (2009).
- ¹⁰ O. Barad, *et al.*, "MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues," *Genome Res.* **14**(12), 2486 (2004).
- ¹¹ T. E. Baroni, *et al.*, "Advances in RIP-chip analysis : RNA-binding protein immunoprecipitation-microarray profiling," *Methods Mol. Biol.* **419**, 93 (2008).
- ¹² P. Barozzi, *et al.*, "B cells and herpesviruses: a model of lymphoproliferation," *Autoimmun. Rev.* **7**(2), 132 (2007).
- ¹³ D. P. Bartel, "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function," *Cell* **116**(2), 281 (2004).
- ¹⁴ D. P. Bartel and C. Z. Chen, "Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs," *Nat. Rev. Genet.* **5**(5), 396 (2004).
- ¹⁵ S. Barth, *et al.*, "Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5," *Nucleic Acids Res.* **36**(2), 666 (2008).

-
- ¹⁶ S. Baskerville and D. P. Bartel, "Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes," *RNA*. **11**(3), 241 (2005).
- ¹⁷ I. Behm-Ansmant, *et al.*, "mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes," *Genes Dev.* **20**(14), 1885 (2006).
- ¹⁸ M. Beitzinger, *et al.*, "Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes," *RNA. Biol.* **4**(2), 76 (2007).
- ¹⁹ L. Belec, *et al.*, "High prevalence in Central Africa of blood donors who are potentially infectious for human herpesvirus 8," *Transfusion* **38**(8), 771 (1998).
- ²⁰ H. Ben-Bassat, *et al.*, "Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75)," *Int. J. Cancer* **19**(1), 27 (1977).
- ²¹ I. Bentwich, "Prediction and validation of microRNAs and their targets," *FEBS Lett.* **579**(26), 5904 (2005).
- ²² V. Beral, *et al.*, "Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection?," *Lancet* **335**(8682), 123 (1990).
- ²³ E. Bernstein, *et al.*, "Dicer is essential for mouse development," *Nat. Genet.* **35**(3), 215 (2003).
- ²⁴ J. Bertin, *et al.*, "Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**(4), 1172 (1997).
- ²⁵ S. N. Bhattacharyya, *et al.*, "Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells," *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **71**, 513 (2006).
- ²⁶ I. Bhatti, *et al.*, "Small RNA: a large contributor to carcinogenesis?," *J. Gastrointest. Surg.* **13**(7), 1379 (2009).
- ²⁷ C. Blenkiron, *et al.*, "MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype," *Genome Biol.* **8**(10), R214 (2007).
- ²⁸ W. Bocker, *et al.*, "Quantitative polymerase chain reaction as a reliable method to determine functional lentiviral titer after ex vivo gene transfer in human mesenchymal stem cells," *J Gene Med* **9**(7), 585 (2007).
- ²⁹ C. Boshoff, *et al.*, "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells," *Nat. Med.* **1**(12), 1274 (1995).
- ³⁰ J. Brennecke, *et al.*, "Principles of microRNA-target recognition," *PLoS. Biol.* **3**(3), e85 (2005).
- ³¹ J. J. Brooks, "Kaposi's sarcoma: a reversible hyperplasia," *Lancet* **2**(8519), 1309 (1986).

- ³² J. W. Brown, D. F. Marshall, and M. Echeverria, "Intronic noncoding RNAs and splicing," *Trends Plant Sci.* **13**(7), 335 (2008).
- ³³ G. L. Buchschacher, Jr. and F. Wong-Staal, "Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases," *Blood* **95**(8), 2499 (2000).
- ³⁴ A. H. Buck, *et al.*, "Discrete clusters of virus-encoded micrornas are associated with complementary strands of the genome and the 7.2-kilobase stable intron in murine cytomegalovirus," *J. Virol.* **81**(24), 13761 (2007).
- ³⁵ M. J. Bueno, Castro de, I, and M. Malumbres, "Control of cell proliferation pathways by microRNAs," *Cell Cycle* **7**(20), 3143 (2008).
- ³⁶ J. Burnside, *et al.*, "Marek's disease virus encodes MicroRNAs that map to meq and the latency-associated transcript," *J. Virol.* **80**(17), 8778 (2006).
- ³⁷ W. Cai, *et al.*, "The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 enhances virus replication during acute infection and reactivation from latency," *J. Virol.* **67**(12), 7501 (1993).
- ³⁸ X. Cai and B. R. Cullen, "Transcriptional origin of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNAs," *J Virol.* **80**(5), 2234 (2006).
- ³⁹ X. Cai, *et al.*, "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* **102**(15), 5570 (2005).
- ⁴⁰ X. Cai, *et al.*, "Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed," *PLoS. Pathog.* **2**(3), e23 (2006).
- ⁴¹ A. Carbone, *et al.*, "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences in AIDS-related and AIDS-unrelated lymphomatous effusions," *Br. J Haematol.* **94**(3), 533 (1996).
- ⁴² C. Carissimi, V. Fulci, and G. Macino, "MicroRNAs: novel regulators of immunity," *Autoimmun. Rev.* **8**(6), 520 (2009).
- ⁴³ C. Casper, "The aetiology and management of Castleman disease at 50 years: translating pathophysiology to patient care," *Br. J. Haematol.* **129**(1), 3 (2005).
- ⁴⁴ E. Cesarman, *et al.*, "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas," *N. Engl. J. Med.* **332**(18), 1186 (1995).
- ⁴⁵ E. Cesarman, *et al.*, "In vitro establishment and characterization of two acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences," *Blood* **86**(7), 2708 (1995).
- ⁴⁶ Y. Chang, *et al.*, "Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma," *Science* **266**(5192), 1865 (1994).
- ⁴⁷ M. Chen and J. Wang, "Initiator caspases in apoptosis signaling pathways," *Apoptosis.* **7**(4), 313 (2002).

- 48 P. Chomczynski and N. Sacchi, "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction," *Anal. Biochem.* **162**(1), 156 (1987).
- 49 E. Y. Choy, *et al.*, "An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival," *J. Exp. Med.* **205**(11), 2551 (2008).
- 50 C. J. Cockerell, "Histopathological features of Kaposi's sarcoma in HIV infected individuals," *Cancer Surv.* **10**, 73 (1991).
- 51 G. M. Cohen, "Caspases: the executioners of apoptosis," *Biochem. J.* **326 (Pt 1)**, 1 (1997).
- 52 S. Costinean, *et al.*, "Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**(18), 7024 (2006).
- 53 C. Cui, *et al.*, "Prediction and identification of herpes simplex virus 1-encoded microRNAs," *J. Virol.* **80**(11), 5499 (2006).
- 54 J. M. Cummins and V. E. Velculescu, "Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis," *Oncogene* **25**(46), 6220 (2006).
- 55 A. J. Davison, *et al.*, "The order Herpesvirales," *Arch. Virol.* **154**(1), 171 (2009).
- 56 H. J. Delecluse, *et al.*, "Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist," *J. Clin. Pathol.* **60**(12), 1358 (2007).
- 57 G. Dennis, Jr., *et al.*, "DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery," *Genome Biol.* **4**(5), 3 (2003).
- 58 D. Didiano and O. Hobert, "Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions," *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**(9), 849 (2006).
- 59 L. Dolken, *et al.*, "Mouse cytomegalovirus microRNAs dominate the cellular small RNA profile during lytic infection and show features of posttranscriptional regulation," *J. Virol.* **81**(24), 13771 (2007).
- 60 L. Dolken, S. Pfeffer, and U. H. Koszinowski, "Cytomegalovirus microRNAs," *Virus Genes* **38**(3), 355 (2009).
- 61 L. A. Dourmishev, *et al.*, "Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis," *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **67**(2), 175, table (2003).
- 62 T. Du and P. D. Zamore, "microPrimer: the biogenesis and function of microRNA," *Development* **132**(21), 4645 (2005).
- 63 T. Dull, *et al.*, "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system," *J. Virol.* **72**(11), 8463 (1998).
- 64 C. Dunn, *et al.*, "Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity," *J. Exp. Med.* **197**(11), 1427 (2003).

- ⁶⁵ N. Dupin, *et al.*, "Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**(8), 4546 (1999).
- ⁶⁶ C. J. Edgell, C. C. McDonald, and J. B. Graham, "Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **80**(12), 3734 (1983).
- ⁶⁷ I. Elcheva, *et al.*, "CRD-BP protects the coding region of betaTrCP1 mRNA from miR-183-mediated degradation," *Mol. Cell* **35**(2), 240 (2009).
- ⁶⁸ E. A. Engels, *et al.*, "Latent class analysis of human herpesvirus 8 assay performance and infection prevalence in sub-saharan Africa and Malta," *Int. J. Cancer* **88**(6), 1003 (2000).
- ⁶⁹ A. J. Enright, *et al.*, "MicroRNA targets in *Drosophila*," *Genome Biol.* **5**(1), R1 (2003).
- ⁷⁰ B. Ensoli and M. Sturzl, "Kaposi's sarcoma: a result of the interplay among inflammatory cytokines, angiogenic factors and viral agents," *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**(1), 63 (1998).
- ⁷¹ K. K. Farh, *et al.*, "The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution," *Science* **310**(5755), 1817 (2005).
- ⁷² H. J. Field, S. Biswas, and I. T. Mohammad, "Herpesvirus latency and therapy--from a veterinary perspective," *Antiviral Res.* **71**(2-3), 127 (2006).
- ⁷³ A. Fire, *et al.*, "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*," *Nature* **391**(6669), 806 (1998).
- ⁷⁴ J. Friberg, Jr., *et al.*, "p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death," *Nature* **402**(6764), 889 (1999).
- ⁷⁵ A. E. Friedman-Kien, *et al.*, "Disseminated Kaposi's sarcoma in homosexual men," *Ann. Intern. Med.* **96**(6 Pt 1), 693 (1982).
- ⁷⁶ L. Y. Fu, *et al.*, "Suitable reference genes for real-time PCR in human HBV-related hepatocellular carcinoma with different clinical prognoses," *BMC. Cancer* **9**, 49 (2009).
- ⁷⁷ C. Gabay, *et al.*, "Somatic mutations and intraclonal variations in the rearranged *Vkappa* genes of B-non-Hodgkin's lymphoma cell lines," *Eur. J. Haematol.* **63**(3), 180 (1999).
- ⁷⁸ G. Gaidano, *et al.*, "Association of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-positive primary effusion lymphoma with expression of the CD138/syndecan-1 antigen," *Blood* **90**(12), 4894 (1997).
- ⁷⁹ G. Gatto, *et al.*, "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 trans-activates miR-155 transcription through the NF-kappaB pathway," *Nucleic Acids Res.* **36**(20), 6608 (2008).
- ⁸⁰ A. Gessain and R. Duprez, "Spindle cells and their role in Kaposi's sarcoma," *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**(12), 2457 (2005).

- ⁸¹ D. Godden-Kent, *et al.*, "The cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stimulates cdk6 to phosphorylate the retinoblastoma protein and histone H1," *J. Virol.* **71**(6), 4193 (1997).
- ⁸² E. Gottwein, *et al.*, "A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155," *Nature* **450**(7172), 1096 (2007).
- ⁸³ F. Grey, *et al.*, "Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded microRNAs," *J. Virol.* **79**(18), 12095 (2005).
- ⁸⁴ F. Grey, *et al.*, "A human cytomegalovirus-encoded microRNA regulates expression of multiple viral genes involved in replication," *PLoS. Pathog.* **3**(11), e163 (2007).
- ⁸⁵ S. Griffiths-Jones, "The microRNA Registry," *Nucleic Acids Res.* **32**(Database issue), D109-D111 (2004).
- ⁸⁶ S. Griffiths-Jones, *et al.*, "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature," *Nucleic Acids Res.* **34**(Database issue), D140-D144 (2006).
- ⁸⁷ S. Griffiths-Jones, *et al.*, "miRBase: tools for microRNA genomics," *Nucleic Acids Res.* **36**(Database issue), D154-D158 (2008).
- ⁸⁸ A. Grimson, *et al.*, "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing," *Mol. Cell* **27**(1), 91 (2007).
- ⁸⁹ D. Grun, *et al.*, "microRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets," *PLoS. Comput. Biol.* **1**(1), e13 (2005).
- ⁹⁰ A. Grundhoff, C. S. Sullivan, and D. Ganem, "A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses," *RNA*. **12**(5), 733 (2006).
- ⁹¹ A. Gupta, *et al.*, "Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript," *Nature* **442**(7098), 82 (2006).
- ⁹² D. Haasch, *et al.*, "T cell activation induces a noncoding RNA transcript sensitive to inhibition by immunosuppressant drugs and encoded by the proto-oncogene, BIC," *Cell Immunol.* **217**(1-2), 78 (2002).
- ⁹³ W. P. Halford, *et al.*, "ICP0, ICP4, or VP16 expressed from adenovirus vectors induces reactivation of latent herpes simplex virus type 1 in primary cultures of latently infected trigeminal ganglion cells," *J. Virol.* **75**(13), 6143 (2001).
- ⁹⁴ P. A. Hall, *et al.*, "An immunohistological and genotypic study of the plasma cell form of Castleman's disease," *Histopathology* **14**(4), 333 (1989).
- ⁹⁵ A. J. Hamilton and D. C. Baulcombe, "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants," *Science* **286**(5441), 950 (1999).
- ⁹⁶ B. D. Harfe, *et al.*, "The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**(31), 10898 (2005).
- ⁹⁷ K. S. Harris, *et al.*, "Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**(7), 2208 (2006).

- ⁹⁸ J. He, *et al.*, "Seroprevalence of human herpesvirus 8 among Zambian women of childbearing age without Kaposi's sarcoma (KS) and mother-child pairs with KS," *J. Infect. Dis.* **178**(6), 1787 (1998).
- ⁹⁹ U. R. Hengge, *et al.*, "Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy," *Lancet Infect Dis* **2**(5), 281 (2002).
- ¹⁰⁰ J. Henry-Mowatt, *et al.*, "Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer," *Oncogene* **23**(16), 2850 (2004).
- ¹⁰¹ B. Herndier and D. Ganem, "The biology of Kaposi's sarcoma," *Cancer Treat. Res.* **104**, 89 (2001).
- ¹⁰² Y. K. Hong, *et al.*, "Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus," *Nat. Genet.* **36**(7), 683 (2004).
- ¹⁰³ S. C. Hsu, *et al.*, "The exocyst complex in polarized exocytosis," *Int. Rev. Cytol.* **233**, 243 (2004).
- ¹⁰⁴ da W. Huang, B. T. Sherman, and R. A. Lempicki, "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources," *Nat. Protoc.* **4**(1), 44 (2009).
- ¹⁰⁵ D. T. Humphreys, *et al.*, "MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**(47), 16961 (2005).
- ¹⁰⁶ M. Irmeler, *et al.*, "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP," *Nature* **388**(6638), 190 (1997).
- ¹⁰⁷ R. G. Jenner, *et al.*, "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent and lytic gene expression as revealed by DNA arrays," *J. Virol.* **75**(2), 891 (2001).
- ¹⁰⁸ M. Kaposi, "Idiopathic multiple pigmented sarcoma of the skin," *Arch. Dermatol. Syphil.* **4**, 265 (1872).
- ¹⁰⁹ F. V. Karginov, *et al.*, "A biochemical approach to identifying microRNA targets," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**(49), 19291 (2007).
- ¹¹⁰ J. D. Keene, J. M. Komisarow, and M. B. Friedersdorf, "RIP-Chip: the isolation and identification of mRNAs, microRNAs and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts," *Nat. Protoc.* **1**(1), 302 (2006).
- ¹¹¹ M. Kertesz, *et al.*, "The role of site accessibility in microRNA target recognition," *Nat. Genet.* **39**(10), 1278 (2007).
- ¹¹² M. Kiriakidou, *et al.*, "An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation," *Cell* **129**(6), 1141 (2007).
- ¹¹³ S. Kliche, *et al.*, "Signaling by human herpesvirus 8 kaposin A through direct membrane recruitment of cytohesin-1," *Mol. Cell* **7**(4), 833 (2001).

- ¹¹⁴ J. S. Knight, M. A. Cotter, and E. S. Robertson, "The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus transactivates the telomerase reverse transcriptase promoter," *J. Biol. Chem.* **276**(25), 22971 (2001).
- ¹¹⁵ K. V. Komanduri, *et al.*, "The natural history and molecular heterogeneity of HIV-associated primary malignant lymphomatous effusions," *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **13**(3), 215 (1996).
- ¹¹⁶ S. Koopal, *et al.*, "Viral oncogene-induced DNA damage response is activated in Kaposi sarcoma tumorigenesis," *PLoS. Pathog.* **3**(9), 1348 (2007).
- ¹¹⁷ G. Koopman, *et al.*, "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis," *Blood* **84**(5), 1415 (1994).
- ¹¹⁸ A. Krek, *et al.*, "Combinatorial microRNA target predictions," *Nat. Genet.* **37**(5), 495 (2005).
- ¹¹⁹ J. Krutzfeldt, *et al.*, "Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs," *Nucleic Acids Res.* **35**(9), 2885 (2007).
- ¹²⁰ J. Krutzfeldt, *et al.*, "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'," *Nature* **438**(7068), 685 (2005).
- ¹²¹ K. Kubota, *et al.*, "LRRC8 involved in B cell development belongs to a novel family of leucine-rich repeat proteins," *FEBS Lett.* **564**(1-2), 147 (2004).
- ¹²² M. Lagos-Quintana, *et al.*, "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs," *Science* **294**(5543), 853 (2001).
- ¹²³ E. C. Lai, *et al.*, "Computational identification of *Drosophila* microRNA genes," *Genome Biol.* **4**(7), R42 (2003).
- ¹²⁴ F. Lallemand, *et al.*, "Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real-time PCR assay," *J. Clin. Microbiol.* **38**(4), 1404 (2000).
- ¹²⁵ P. Landgraf, *et al.*, "A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing," *Cell* **129**(7), 1401 (2007).
- ¹²⁶ N. C. Lau, *et al.*, "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*," *Science* **294**(5543), 858 (2001).
- ¹²⁷ R. C. Lee and V. Ambros, "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*," *Science* **294**(5543), 862 (2001).
- ¹²⁸ R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros, "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*," *Cell* **75**(5), 843 (1993).
- ¹²⁹ Y. Lee, *et al.*, "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization," *EMBO J.* **21**(17), 4663 (2002).
- ¹³⁰ B. P. Lewis, C. B. Burge, and D. P. Bartel, "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets," *Cell* **120**(1), 15 (2005).

- ¹³¹ B. P. Lewis, *et al.*, "Prediction of mammalian microRNA targets," *Cell* **115**(7), 787 (2003).
- ¹³² P. F. Lewis and M. Emerman, "Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus," *J. Virol.* **68**(1), 510 (1994).
- ¹³³ M. Li, *et al.*, "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin," *J. Virol.* **71**(3), 1984 (1997).
- ¹³⁴ L. P. Lim, *et al.*, "Vertebrate microRNA genes," *Science* **299**(5612), 1540 (2003).
- ¹³⁵ L. P. Lim, *et al.*, "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs," *Nature* **433**(7027), 769 (2005).
- ¹³⁶ L. P. Lim, *et al.*, "The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*," *Genes Dev.* **17**(8), 991 (2003).
- ¹³⁷ J. Liu, *et al.*, "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies," *Nat. Cell Biol.* **7**(7), 719 (2005).
- ¹³⁸ Q. Liu, *et al.*, "miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes," *Nucleic Acids Res.* **36**(16), 5391 (2008).
- ¹³⁹ A. K. Lo, *et al.*, "Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**(41), 16164 (2007).
- ¹⁴⁰ J. Lu, *et al.*, "MicroRNA expression profiles classify human cancers," *Nature* **435**(7043), 834 (2005).
- ¹⁴¹ J. R. Lytle, T. A. Yario, and J. A. Steitz, "Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**(23), 9667 (2007).
- ¹⁴² V. Marshall, *et al.*, "Conservation of virally encoded microRNAs in Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in primary effusion lymphoma cell lines and in patients with Kaposi sarcoma or multicentric Castlemann disease," *J Infect. Dis.* **195**(5), 645 (2007).
- ¹⁴³ T. C. Mettenleiter, "Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle," *Vet. Microbiol.* **113**(3-4), 163 (2006).
- ¹⁴⁴ T. C. Mettenleiter, B. G. Klupp, and H. Granzow, "Herpesvirus assembly: a tale of two membranes," *Curr. Opin. Microbiol.* **9**(4), 423 (2006).
- ¹⁴⁵ J. M. Middeldorp, *et al.*, "Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders," *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **45**(1), 1 (2003).
- ¹⁴⁶ K. C. Miranda, *et al.*, "A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes," *Cell* **126**(6), 1203 (2006).
- ¹⁴⁷ B. M. Mitchell, *et al.*, "Herpes simplex virus-1 and varicella-zoster virus latency in ganglia," *J. Neurovirol.* **9**(2), 194 (2003).

- ¹⁴⁸ M. Modesti, *et al.*, "RAD51AP1 is a structure-specific DNA binding protein that stimulates joint molecule formation during RAD51-mediated homologous recombination," *Mol. Cell* **28**(3), 468 (2007).
- ¹⁴⁹ S. Modrow and D. Falke, "Replikation der Herpesviren," in *Molekulare Virologie*, (Spektrum Akademischer Verlag, 1997), pp.442-463.
- ¹⁵⁰ P. S. Moore and Y. Chang, "Molecular virology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus," *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **356**(1408), 499 (2001).
- ¹⁵¹ S. A. Muljo, *et al.*, "Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer," *J. Exp. Med.* **202**(2), 261 (2005).
- ¹⁵² S. Muralidhar, *et al.*, "Identification of kaposin (open reading frame K12) as a human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) transforming gene," *J. Virol.* **72**(6), 4980 (1998).
- ¹⁵³ E. Murphy, *et al.*, "Suppression of immediate-early viral gene expression by herpesvirus-coded microRNAs: Implications for latency," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (2008).
- ¹⁵⁴ D. Nachmani, *et al.*, "Diverse herpesvirus microRNAs target the stress-induced immune ligand MICB to escape recognition by natural killer cells," *Cell Host. Microbe* **5**(4), 376 (2009).
- ¹⁵⁵ R. G. Nador, *et al.*, "Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus," *Blood* **88**(2), 645 (1996).
- ¹⁵⁶ F. Neipel, J. C. Albrecht, and B. Fleckenstein, "Human herpesvirus 8--the first human Rhadinovirus," *J. Natl. Cancer Inst. Monogr* (23), 73 (1998).
- ¹⁵⁷ R. M. O'Connell, *et al.*, "MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**(5), 1604 (2007).
- ¹⁵⁸ J. R. O'Rourke, *et al.*, "Essential role for Dicer during skeletal muscle development," *Dev. Biol.* **311**(2), 359 (2007).
- ¹⁵⁹ U. A. Orom, F. C. Nielsen, and A. H. Lund, "MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation," *Mol. Cell* **30**(4), 460 (2008).
- ¹⁶⁰ M. B. Padua and P. J. Hansen, "Changes in expression of cell-cycle-related genes in PC-3 prostate cancer cells caused by ovine uterine serpin," *J. Cell Biochem.* **107**(6), 1182 (2009).
- ¹⁶¹ R. Parker and U. Sheth, "P bodies and the control of mRNA translation and degradation," *Mol. Cell* **25**(5), 635 (2007).
- ¹⁶² C. Parravicini, *et al.*, "Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease," *Am. J. Pathol.* **156**(3), 743 (2000).
- ¹⁶³ C. Parravicini, *et al.*, "Expression of a virus-derived cytokine, KSHV vIL-6, in HIV-seronegative Castleman's disease," *Am. J. Pathol.* **151**(6), 1517 (1997).

- ¹⁶⁴ M. Pearce, S. Matsumura, and A. C. Wilson, "Transcripts encoding K12, v-FLIP, v-cyclin, and the microRNA cluster of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus originate from a common promoter," *J Virol.* **79**(22), 14457 (2005).
- ¹⁶⁵ S. Pfeffer, *et al.*, "Identification of microRNAs of the herpesvirus family," *Nat. Methods* **2**(4), 269 (2005).
- ¹⁶⁶ S. Pfeffer, *et al.*, "Identification of virus-encoded microRNAs," *Science* **304**(5671), 734 (2004).
- ¹⁶⁷ R. S. Pillai, C. G. Artus, and W. Filipowicz, "Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis," *RNA.* **10**(10), 1518 (2004).
- ¹⁶⁸ R. S. Pillai, *et al.*, "Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells," *Science* **309**(5740), 1573 (2005).
- ¹⁶⁹ T. Radaszkiewicz, M. L. Hansmann, and K. Lennert, "Monoclonality and polyclonality of plasma cells in Castleman's disease of the plasma cell variant," *Histopathology* **14**(1), 11 (1989).
- ¹⁷⁰ S. A. Radkov, P. Kellam, and C. Boshoff, "The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells," *Nat. Med.* **6**(10), 1121 (2000).
- ¹⁷¹ W. Rawlinson and G. Scott, "Cytomegalovirus. A common virus causing serious disease," *Aust. Fam. Physician* **32**(10), 789 (2003).
- ¹⁷² J. A. Regezi, *et al.*, "Oral Kaposi's sarcoma: a 10-year retrospective histopathologic study," *J. Oral Pathol. Med.* **22**(7), 292 (1993).
- ¹⁷³ M. Rehmsmeier, *et al.*, "Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes," *RNA.* **10**(10), 1507 (2004).
- ¹⁷⁴ B. J. Reinhart, *et al.*, "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*," *Nature* **403**(6772), 901 (2000).
- ¹⁷⁵ R. Renne, *et al.*, "Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture," *Nat. Med.* **2**(3), 342 (1996).
- ¹⁷⁶ R. Renne, *et al.*, "Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture," *Nat. Med.* **2**(3), 342 (1996).
- ¹⁷⁷ S. A. Rezaee, *et al.*, "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immune modulation: an overview," *J. Gen. Virol.* **87**(Pt 7), 1781 (2006).
- ¹⁷⁸ S. J. Riedl and G. S. Salvesen, "The apoptosome: signalling platform of cell death," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**(5), 405 (2007).
- ¹⁷⁹ H. Robins, Y. Li, and R. W. Padgett, "Incorporating structure to predict microRNA targets," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* **102**(11), 4006 (2005).
- ¹⁸⁰ A. Rodriguez, *et al.*, "Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function," *Science* **316**(5824), 608 (2007).

- ¹⁸¹ S. Rudel, *et al.*, "A multifunctional human Argonaute2-specific monoclonal antibody," *RNA*. **14**(6), 1244 (2008).
- ¹⁸² J. J. Russo, *et al.*, "Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8)," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**(25), 14862 (1996).
- ¹⁸³ J. W. Said, *et al.*, "Ultrastructural characterization of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in Kaposi's sarcoma lesions: electron microscopy permits distinction from cytomegalovirus (CMV)," *J. Pathol.* **182**(3), 273 (1997).
- ¹⁸⁴ M. A. Samols, *et al.*, "Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus," *J Virol.* **79**(14), 9301 (2005).
- ¹⁸⁵ M. A. Samols, *et al.*, "Identification of cellular genes targeted by KSHV-encoded microRNAs," *PLoS. Pathog.* **3**(5), e65 (2007).
- ¹⁸⁶ G. Sarek, *et al.*, "Reactivation of the p53 pathway as a treatment modality for KSHV-induced lymphomas," *J. Clin. Invest* **117**(4), 1019 (2007).
- ¹⁸⁷ T. F. Schulz, "Epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8," *Adv. Cancer Res.* **76**, 121 (1999).
- ¹⁸⁸ T. F. Schulz, "The pleiotropic effects of Kaposi's sarcoma herpesvirus," *J Pathol.* **208**(2), 187 (2006).
- ¹⁸⁹ D. S. Schwarz, *et al.*, "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex," *Cell* **115**(2), 199 (2003).
- ¹⁹⁰ D. Seckin, *et al.*, "Absence of Epstein-Barr virus DNA sequences in iatrogenic Kaposi's sarcomas of renal transplant recipients," *Transplant. Proc.* **32**(3), 554 (2000).
- ¹⁹¹ E. Segal-Bendirdjian and A. Jacquemin-Sablon, "Cisplatin resistance in a murine leukemia cell line is associated with a defective apoptotic process," *Exp. Cell Res.* **218**(1), 201 (1995).
- ¹⁹² M. Selbach, *et al.*, "Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs," *Nature* **455**(7209), 58 (2008).
- ¹⁹³ L. F. Sempere, *et al.*, "Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation," *Genome Biol.* **5**(3), R13 (2004).
- ¹⁹⁴ F. A. Shepherd, *et al.*, "Treatment of Kaposi's sarcoma after solid organ transplantation," *J. Clin. Oncol.* **15**(6), 2371 (1997).
- ¹⁹⁵ U. Sheth and R. Parker, "Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies," *Science* **300**(5620), 805 (2003).
- ¹⁹⁶ R. Shi and V. L. Chiang, "Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR," *Biotechniques* **39**(4), 519 (2005).
- ¹⁹⁷ R. L. Skalsky, *et al.*, "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155," *J Virol.* **81**(23), 12836 (2007).

- ¹⁹⁸ J. Soulier, *et al.*, "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease," *Blood* **86**(4), 1276 (1995).
- ¹⁹⁹ N. Stern-Ginossar, *et al.*, "Host immune system gene targeting by a viral miRNA," *Science* **317**(5836), 376 (2007).
- ²⁰⁰ N. Stern-Ginossar, *et al.*, "Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D," *Nat. Immunol.* **9**(9), 1065 (2008).
- ²⁰¹ J. G. Stevens, *et al.*, "RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons," *Science* **235**(4792), 1056 (1987).
- ²⁰² C. S. Sullivan, "High conservation of Kaposi sarcoma--associated herpesvirus microRNAs implies important function," *J. Infect. Dis.* **195**(5), 618 (2007).
- ²⁰³ C. Swanton, *et al.*, "Herpes viral cyclin/Cdk6 complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins," *Nature* **390**(6656), 184 (1997).
- ²⁰⁴ Y. Tay, *et al.*, "MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation," *Nature* **455**(7216), 1124 (2008).
- ²⁰⁵ T. H. Thai, *et al.*, "Regulation of the germinal center response by microRNA-155," *Science* **316**(5824), 604 (2007).
- ²⁰⁶ A. Thorburn, "Death receptor-induced cell killing," *Cell Signal.* **16**(2), 139 (2004).
- ²⁰⁷ J. L. Umbach, *et al.*, "MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs," *Nature* **454**(7205), 780 (2008).
- ²⁰⁸ A. Unal, *et al.*, "The protease and the assembly protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8)," *J. Virol.* **71**(9), 7030 (1997).
- ²⁰⁹ Berg A. van den, *et al.*, "High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma," *Genes Chromosomes. Cancer* **37**(1), 20 (2003).
- ²¹⁰ H. W. Wang, *et al.*, "Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma," *Nat. Genet.* **36**(7), 687 (2004).
- ²¹¹ T. Watanabe, *et al.*, "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen prolongs the life span of primary human umbilical vein endothelial cells," *J. Virol.* **77**(11), 6188 (2003).
- ²¹² L. Weinmann, *et al.*, "Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs," *Cell* **136**(3), 496 (2009).
- ²¹³ W. Weninger, *et al.*, "Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 and podoplanin suggests a lymphatic endothelial cell origin of Kaposi's sarcoma tumor cells," *Lab Invest* **79**(2), 243 (1999).
- ²¹⁴ B. Wightman, I. Ha, and G. Ruvkun, "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*," *Cell* **75**(5), 855 (1993).

- ²¹⁵ L. Wu, *et al.*, "Three-dimensional structure of the human herpesvirus 8 capsid," *J. Virol.* **74**(20), 9646 (2000).
- ²¹⁶ T. Xia, *et al.*, "EBV microRNAs in primary lymphomas and targeting of CXCL-11 by ebv-mir-BHRF1-3," *Cancer Res.* **68**(5), 1436 (2008).
- ²¹⁷ Y. Yao, *et al.*, "Marek's disease virus type 2 (MDV-2)-encoded microRNAs show no sequence conservation with those encoded by MDV-1," *J. Virol.* **81**(13), 7164 (2007).
- ²¹⁸ L. S. Young and A. B. Rickinson, "Epstein-Barr virus: 40 years on," *Nat. Rev. Cancer* **4**(10), 757 (2004).
- ²¹⁹ P. D. Zamore and B. Haley, "Ribo-gnome: the big world of small RNAs," *Science* **309**(5740), 1519 (2005).
- ²²⁰ X. Zhou, *et al.*, "Abundant conserved microRNA target sites in the 5'-untranslated region and coding sequence," *Genetica* (2009).
- ²²¹ Z. H. Zhou, *et al.*, "Protein subunit structures in the herpes simplex virus A-capsid determined from 400 kV spot-scan electron cryomicroscopy," *J. Mol. Biol.* **242**(4), 456 (1994).
- ²²² F. X. Zhu, *et al.*, "Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus," *J. Virol.* **79**(2), 800 (2005).
- ²²³ J. Y. Zhu, *et al.*, "Identification of novel Epstein-Barr virus microRNA genes from nasopharyngeal carcinomas," *J. Virol.* **83**(7), 3333 (2009).
- ²²⁴ J. M. Ziegelbauer, C. S. Sullivan, and D. Ganem, "Tandem array-based expression screens identify host mRNA targets of virus-encoded microRNAs," *Nat. Genet.* **41**(1), 130 (2009).
- ²²⁵ M. Zuker, "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction," *Nucleic Acids Res* **31**(13), 3406 (2003).

9 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Geburtsdatum: 25. 02. 1977
 Geburtsort: Starnberg
 Familienstand: ledig

QUALIFIKATION:

3/2005 – 11/2009 Doktorarbeit am Max von Pettenkofer Institut, LMU München
 10/2004 – 1/2005 Freier Mitarbeiter bei der Fa. Sloning Biotechnology GmbH in Puchheim.
 07/2004 Verleihung des akademischen Grades des Diplom-Biologen
 07/2003 - 07/2004 Diplomarbeit am botanischen Institut, LMU München
 Thema: "Flavon-Synthase II aus Glycine max L. Klonierung der cDNA und Nachweis der Enzymreaktion mit rekombinanten Protein"
 Betreuer: Prof. Dr. J. Ebel
 04/2003 - 06/2003 Abschlussprüfungen in dem Hauptfach Genetik und den Nebenfächern Humangenetik, Biochemie und Physiologische Botanik an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians Universität, München
 09/1998 - 03/2003 Biologiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

WEHRDIENST:

09/1997 - 06/1998 GStFmLBtl8 in Mittenwald und Murnau

SCHULAUSBILDUNG:

1988 - 06/1997 Gymnasium Penzberg, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
 1987 – 1988 Hauptschule Tutzing
 1983 – 1987 Grundschule Bernried

Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Haas für die Überlassung dieses Themas, für die zahlreichen Anregungen und Ideen zu meiner Arbeit, seine Gesprächsbereitschaft und die Kritische Durchsicht dieses Manuskriptes.

Bei Frau Dr. Bettina Kempkes bedanke ich mich für das stetige Interesse an meiner Arbeit, die Diskussionsbereitschaft, die kritische Durchsicht des Manuskriptes, und das Vertreten dieser Arbeit vor der Fakultät für Biologie der LMU.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Lars Dölken und seinen Mitarbeitern für die sehr gute Zusammenarbeit bei etlichen Experimenten und beim Erstellen der Publikationen, sowie für die Durchsicht des Manuskriptes. Des Weiteren danke ich Dr. Sébastien Pfeffer und Prof. Päivi Ojala und ihren Mitarbeitern für die gute Zusammenarbeit bei etlichen Experimenten.

Ein besonderer Dank gilt auch insbesondere Dietlind Rose für die Unterstützung, sowie allen Kollegen im Labor, in der Arbeitsgruppe und am Max von Pettenkofer Institut für die gute Arbeitsatmosphäre und die tolle Zeit, auch außerhalb des Labors.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, danke ich ganz besonders für die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit.

Das ganz große Dankeschön für alles geht natürlich an Sandra, die mich den ganzen Weg als „Mitleidende“ begleitet hat.

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist.

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, den 25. 2. 2010

(Georg Malterer)