

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

**Analyse nicht-kodierender RNAs in
Epstein-Barr Virus infizierten
NK/T-Zelllinien**

Dissertation

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

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2015

Vorgelegt von

Julia Stefanie Alles

geb. am 10.01.1986

in Völklingen

„There is no sadder sight in the world than to see
a beautiful theory killed by a brutal fact. “

Thomas Henry Huxley

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	I
Abkürzungen	I
1 Zusammenfassung	1
2 Summary	2
3 Einleitung	3
3.1 Das Epstein-Barr Virus	3
3.1.1 Die Epstein-Barr Virus Infektion	4
3.1.2 Epstein-Barr Virus assoziierte Tumorerkrankungen.....	5
3.1.2.1 Lymphome unter Immunsuppression.....	5
3.1.2.2 Burkitt Lymphome	6
3.1.2.3 Hodgkin Lymphome	6
3.1.2.4 Magenkarzinome	6
3.1.2.5 Nasopharynxkarzinome	7
3.1.3 NK/T-Zell Lymphome.....	7
3.2 Die EBV-kodierten RNAs EBER1 und EBER2.....	8
3.2.1 Struktur und Expression der EBER1/2-RNAs	8
3.2.2 Funktion der EBER1/2-RNAs	10
3.3 RNA-Interferenz	12
3.3.1 microRNAs.....	12
3.3.2 miRNAs und Krebsentstehung	14
3.3.3 EB-virale miRNAs	16
3.3.4 Argonaute-Proteine.....	17
3.4 Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit.....	19

4	Material	20
4.1	Geräte	20
4.2	Chemikalien, Membranen, Filter, Säulen	21
4.3	Puffer und Lösungen	23
4.4	Enzyme	33
4.5	Größen- und Molekulargewichtsstandards	33
4.5.1	DNA-Größenstandards	33
4.5.2	Protein-Molekulargewichtsmarker	35
4.6	Antikörper	36
4.6.1	Primäre Antikörper.....	36
4.6.2	Sekundäre Antikörper	36
4.7	Zelllinien	37
4.7.1	Adhärente Zelllinien.....	37
4.7.2	Zelllinien in Suspension	37
4.8	Bakterienstämme	38
4.9	Nähr- und Kulturmedien	39
4.9.1	Kulturmedien für Säugerzellen	39
4.9.1.1	Kulturmedium für adhärente Zelllinien.....	39
4.9.1.2	Kulturmedium für Suspensions-Zelllinien.....	39
4.9.2	Kulturmedium für Bakterien	39
4.10	Vektoren	40
4.10.1	pGEM-T	40
4.10.2	pMIR-RNLTK	40
4.10.3	pSG5.....	41
4.10.4	pVP5	42
4.10.5	MicroRNA-Expressionsplasmide	43
4.10.6	EBER1/2-Expressionsplasmid.....	43
4.10.7	Reporterplasmide	44
4.11	Oligonukleotide	44

4.11.1	Primer zum Klonieren von Fragmenten.....	44
4.11.2	Primer zur quantitativen PCR.....	45
4.11.3	Sonden für Northern Blots.....	46
4.12	Computersoftware.....	46
5	Methoden.....	48
5.1	Bakterielle Zellkultur.....	48
5.1.1	Aufzucht und Lagerung von Bakterien (Alles, 2011).....	48
5.1.2	Herstellung kompetenter Bakterien (CaCl ₂ /RbCl-Methode) (Alles, 2011).....	49
5.1.3	Transformation kompetenter Bakterien (Lederberg and Cohen, 1974) (Alles, 2011) ...	49
5.1.4	Blau-Weiß-Screening (Alles, 2011).....	50
5.2	Eukaryotische Zellkultur.....	51
5.2.1	Kultivierung adhärenter Zellkulturen (modifiziert nach Alles, 2011).....	51
5.2.2	Kultivierung von Zelllinien in Suspension (modifiziert nach Alles, 2011).....	51
5.2.3	Bestimmung der Zellzahl.....	52
5.2.4	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen (modifiziert nach Alles, 2011).....	53
5.3	DNA-Techniken.....	53
5.3.1	Isolation von Plasmid-DNA.....	53
5.3.1.1	Analytische Isolation von Plasmid-DNA (Boiling-Minipräp).....	53
5.3.1.2	Präparation von Plasmid-DNA mittels NucleoBond® (Alles, 2011).....	54
5.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA (Alles, 2011).....	55
5.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (Alles, 2011).....	55
5.3.4	Gerichtete Mutagenese.....	57
5.3.5	Agarose-Gelelektrophorese (Alles, 2011).....	59
5.3.6	NucleoSpin® DNA-Extraktion (Alles, 2011).....	60
5.3.7	DNA-Modifikation.....	61
5.3.7.1	Enzymatische Restriktion (modifiziert nach Alles, 2011).....	61
5.3.7.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA (Alles, 2011).....	62
5.3.8	Ligation von DNA-Fragmenten (Alles, 2011).....	62
5.3.8.1	Direkte Ligation von DNA-Fragmenten.....	62
5.3.8.2	Ligation von PCR-Produkten in pGEM®-T (Alles, 2011).....	63
5.4	RNA-Techniken.....	64
5.4.1	Extraktion von Gesamtzell-RNA (modifiziert nach Alles, 2011).....	64
5.4.2	Herstellung von Kern- und Zytoplasma-RNA-Extrakten.....	65
5.4.3	Northern Blot.....	65

5.4.3.1	UreaGel-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	66
5.4.3.2	RNA-Transfer auf eine Nylonmembran und Crosslink	67
5.4.3.3	Herstellung einer radioaktiv-markierten Sonde	67
5.4.3.4	Spezifischer Nachweis von RNA.....	69
5.4.3.5	Stripping der Nylonmembran	69
5.4.4	cDNA-Synthese	70
5.4.4.1	DNaseI-Verdau (Alles, 2011)	70
5.4.4.2	Reverse Transkription (modifiziert nach Alles 2011)	70
5.4.5	RNA-(Co-) Immunpräzipitation	71
5.5	Quantitative Real-Time PCR (Alles, 2011).....	72
5.5.1	Relative Quantifizierung (Alles, 2011)	73
5.6	Dual-Luciferase® Reporter Assay (Alles, 2011)	74
5.7	Proteintechniken.....	75
5.7.1	Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten	75
5.7.2	Herstellung von Kern- und Zytoplasma-Proteinextrakten.....	75
5.7.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten	76
5.7.4	Western Blot	76
5.7.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	76
5.7.4.2	Protein-Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran.....	78
5.7.4.3	Spezifischer Nachweis von Proteinen	78
5.7.5	ELISA.....	79
5.8	NK/T-Zell-Isolation (modifiziert nach Alles, 2011)	80
5.8.1	Isolation von PBMC	80
5.8.2	Depletion von nicht-NK/T-Zellen.....	81
5.8.3	Positive Selektion von NK/T-Zellen	82
5.9	Illumina Hochdurchsatz-Sequenzierung von cDNA-Banken	82
5.9.1	Herstellung der cDNA-Banken (modifiziert nach Alles, 2011).....	82
5.9.2	Illumina-Sequenzierung	83
5.9.3	Auswertung der Sequenzierdaten	84
6	Ergebnisse	85
6.1	Fragestellung	85
6.2	Illumina Hochdurchsatz-Sequenzierung von primären NK/T-Zellen und den Tumor-Zelllinien SNK6 und SNT16	86

6.2.1	Herstellung der cDNA-Banken aus primären Zellen und Zelllinien	86
6.2.2	Sequenzanalyse der cDNA-Banken	86
6.2.2.1	Expressionsanalyse humaner miRNAs	87
6.2.2.1.1	Relative miRNA-Expression in EBV-positiven NK/T-Zelllinien im Vergleich zu primären NK/T-Zellen	88
6.2.2.1.2	Vergleich der miRNA-Expression zwischen NK/T-Zellen, Thymus und Maus-NK-Zellen	89
6.2.2.1.3	Vergleich der miRNA-Expression zwischen NK/T-Zelllinien und NK/T-Zelllymphomen	90
6.2.2.2	Expressionsanalyse EBV-kodierter miRNAs	91
6.2.2.2.1	Verteilung der viralen miRNAs in den NK/T-Zelllinien SNK6 und SNT16	91
6.2.2.2.2	Vergleich der Expression EBV-kodierter miRNAs zwischen NK/T-Zelllinien und NK/T-Zelllymphomen	92
6.2.2.3	Expressionsanalyse viraler EBER-RNAs	93
6.3	Analyse der Expression deregulierter miRNAs zur Validierung der Sequenzierung durch quantitative RT-PCR	94
6.4	Identifizierung von Zielgenen deregulierter miRNAs	95
6.4.1	CUL5 als potenzielles Zielgen der miR-148a	96
6.4.1.1	Einfluss der miR-148a auf die CUL5-3'UTR	97
6.4.1.2	Einfluss der miR-148a auf die endogene Proteinmenge von CUL5	99
6.5	Analyse der EBER-RNAs	101
6.5.1	Darstellung der prozessierten EBER-RNAs in EBV-positiven Zelllinien	101
6.5.2	Subzelluläre Lokalisation der EBER1/2-RNAs	103
6.5.3	EBER-RNAs als Bestandteil des AGO1-Komplexes	105
6.5.3.1	Co-Immunpräzipitation von Ago1 und EBER1/2 aus HEK-293T-Zellen	105
6.5.3.2	Co-Immunpräzipitation von Ago1 und EBER1 aus Raji-Zellen	107
6.5.4	Additive Effekte zwischen miRNAs und EBER-RNAs	109
6.5.4.1	Additive Effekte der EBER-RNAs mit zellulären miRNAs	109
6.5.4.1.1	Additive Effekte der EBER-RNAs mit hsa-miR-142-3p in Bezug auf 3'UTRs	109
6.5.4.1.2	Additiver Effekt der EBER-RNAs mit hsa-miR-142-3p in Bezug auf die IL-1 α -Proteinmenge	112
6.5.4.2	Additive Effekte der EBER-RNAs mit viralen miRNAs	113
6.5.4.2.1	S1PR1 als Target für ebv-miR-BART16	113
6.5.4.2.2	Regulation der 3'UTR von S1PR1 durch ebv-miR-BART16 & EBERs	114
6.5.4.2.3	Additive Effekte der EBER-RNAs und ebv-miR-BART16 in Bezug auf die endogene S1PR1-Proteinmenge	115
6.5.4.2.4	Selektive Addition zwischen ebv-miR-BART16- und EBER1/2-Effekten	118
6.5.5	Subzelluläre Lokalisation des Lupus Antigen	119
7	Diskussion	121
7.1	Illumina Hochdurchsatz-Sequenzierung von NK/T-Zellen und den Zelllinien SNK6 und SNT16	121
7.1.1	Auswahl des Zellmaterials und Herstellung der cDNA-Banken	121
7.1.2	Sequenzanalyse der NK/T(L)-cDNA-Banken	122
7.1.2.1	Expression humaner miRNAs	122

7.1.2.2	Expressionsunterschiede der primären NK/T-Zellen im Vergleich zu Thymusgewebe und Maus-NK-Zellen	125
7.1.2.3	miRNA-Expressionsvergleich zwischen NK/T-Zelllinien und NKTL	126
7.1.2.4	Expressionsmuster EB-viraler miRNAs.....	127
7.2	Validierung der Illumina-Sequenzierung durch qRT-PCR.....	130
7.3	Identifizierung von Cullin 5 als Zielgen der deregulierten, zellulären hsa-miR148a-3p... ..	131
7.4	Analyse der EBER-Fragmente.....	132
7.4.1	Validierung der Illumina-Sequenzierung durch Northern Blots	133
7.4.2	Subzelluläre Lokalisation der EBER-Fragmente	134
7.4.3	EBER1/2 als Bestandteil des Ago-Komplexes	135
7.4.3.1	Die Interaktion von EBER1/2 und Ago1	136
7.4.3.2	Einfluss der EBER-RNAs auf die Regulation von bekannten und neuen miRNA-Zielgenen.	137
8	Literaturverzeichnis.....	142
9	Anhang	167
9.1	Anhang 1: Gesamtübersicht der Illumina-Hochdurchsatz-Sequenzierung.....	167
9.1.1	Sequenzdaten aller humanen miRNAs	167
9.1.2	Sequenzdaten der EB-viralen miRNAs	205
9.2	Anhang 2: Effekt von EBER1/2 und miR-148a auf die CUL5-3'UTR.....	207
9.3	Publikationen	208
9.4	Danksagung	209
9.5	Lebenslauf.....	210

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EB Viruspartikels (Epstein et al., 1965)	3
Abbildung 2: Ein Patient mit nasalem NK/T-Zelllymphom (Nikolaos et al., 2012)	7
Abbildung 3: Sekundärstrukturen der EBER1/2-RNAs (Iwakiri, 2014).....	9
Abbildung 4: Sekundärstrukturen der EBER1/2-RNAs und Orte der Interaktion mit La, PKR und L22 (Homepage Arbeitsgruppe Takada http://www.igm.hokudai.ac.jp/vir/work_e.html)	10
Abbildung 5: microRNA-Biogenese und potenzielle Auswirkungen auf Ziel-mRNAs (modifiziert nach) (van Rooij and Olson, 2012).....	13
Abbildung 6: Vergleich der miRNA-Funktionen von Tumorsuppressoren und OnkomiRs in unverändertem und transformiertem Gewebe (Esquela-Kerscher and Slack, 2006)	15
Abbildung 7: Schematische Lokalisation und Anordnung der EBV-miRNAs innerhalb des EBV- Genomes (Referenzstrang AJ507799) (Seto et al., 2010).....	16
Abbildung 8: 1kb Plus DNA-Leiter zur Größenbestimmung linearisierter, aufgetrennter DNA- Fragmente zwischen 100 bp und 12 kbp (Quelle: www.lifetechnologies.com).....	34
Abbildung 9: Die 2-log DNA-Leiter (New England Biolabs) enthält DNA-Fragmente zwischen 100 bp und 10 kbp (Quelle: www.neb.com)	34
Abbildung 10: A: ColorPlus™ Prestained Protein Ladder zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen zwischen 10 und 230 kDa, die vom Hersteller durch den Color Protein Standard, Broad Range (B) ersetzt wurde (Quelle www.neb.com).	35
Abbildung 11: Karte des pGEM®-T-Vektors zur Zwischenklonierung von PCR-Fragmenten mit Adenosin-Überhängen (Quelle: Promega).....	40
Abbildung 12: Vektorkarte des pMIR-REPORT™ (Ambion) zur Analyse von miRNA-Effekten auf 3'UTRs von Zielgen-mRNAs (Quelle: Lifetechnologies)	41
Abbildung 13: Vektorkarte des pSG5-Expressionsvektors (Quelle: Agilent Technologies)	42
Abbildung 14: Schematische Karte des Expressionsvektors pVP5 (erstellt mit "Snapgene Viewer") ..	42
Abbildung 15: Aufbau einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. A: Komplette Zählkammer, bestehend aus 16 Großquadraten. B: einzelnes Großquadrat (Quelle: BRAND)	52
Abbildung 16: ECL-Reaktion zur Detektion HRP-gekoppelter Antikörper im Western Blot (Quelle: Thermo Scientific).....	79
Abbildung 17: Schematischer Ablauf der Probenvorbereitung für die Illumina-Sequenzierung einer cDNA-Bank.....	83
Abbildung 18: Deregulierte miRNAs in NK/T-Zelllymphom-Zelllinien	88
Abbildung 19: Top zehn miRNAs in primären NK/T-Zellen vs. Maus-NK-Zellen vs. Thymusgewebe ..	89
Abbildung 20: Verteilung der EBV-miRNAs in NKTL-Zelllinien.....	91
Abbildung 21: Verteilung der EBV-miRNAs in Zelllinien und Vergleich zur miRNA-Expression im Tumor	92
Abbildung 22: Sequenzabdeckung der EBER1/2-RNAs.....	94
Abbildung 23: Validierung der Illumina-Sequenzdaten durch SYBR-Green qRT-PCR	95

Abbildung 24: MiRecords-Vorhersage über CUL5 als potenzielles Target für miR-148a.....	96
Abbildung 25: Schematische Darstellung der wildtypischen und mutierten CUL5-3'UTR.....	97
Abbildung 26: Regulation der CUL5-3'UTR durch hsa-miR-148a-3p.....	98
Abbildung 27: Einfluss der hsa-miR-148a auf die endogene CUL5-Proteinmenge in HEK-293T-Zellen.....	99
Abbildung 28: Analyse der endogenen Proteinexpression von Cullin 5 in NK/T-Zelllinien und primären NK/T-Zellen im Western Blot.....	100
Abbildung 29: Detektion der EBER1-Fragmente in EBV-positiven Zelllinien.....	102
Abbildung 30: Darstellung von EBER2 in B-Zelllinien.....	103
Abbildung 31: Subzelluläre Lokalisation der EBER1- und EBER2-RNAs.....	104
Abbildung 32: Qualitätskontrolle der Raji-Zellfraktionierung.....	105
Abbildung 33: Ago1 Co-Immunpräzipitation von EBER1/2 in HEK-293T-Zellen.....	106
Abbildung 34: Ago1 Co-Immunpräzipitation von EBER1 in Raji-Zellen.....	108
Abbildung 35: Einfluss der EBER1/2-RNAs auf die RAC1-3'UTR.....	110
Abbildung 36: Einfluss der EBER1/2-RNAs auf die IL-1 α -3'UTR.....	111
Abbildung 37: Reduktion der IL-1 α -Sekretion durch miR-142 und EBER1/2.....	112
Abbildung 38: Schematische Darstellung der wildtypischen und mutierten S1PR1-3'UTR.....	113
Abbildung 39: Regulation der S1PR1-3'UTR durch ebv-miR-BART16 und EBER1/2.....	114
Abbildung 40: Einfluss der ebv-miR-BART16 auf die endogene S1PR1-Proteinmenge in HEK-293T-Zellen.....	116
Abbildung 41: Reduzierte endogene Proteinexpression von S1PR1 in NKTL-Zelllinien im Vergleich zu primären NK/T-Zellen.....	117
Abbildung 42: Endogene S1PR1-Proteinmenge in Lymphoblastoid-Zelllinien, die EBER1/2 exprimieren oder nicht.....	117
Abbildung 43: Regulation der TOMM22-3'UTR durch ebv-miR-BART16.....	118
Abbildung 44: Detektion des Lupus Antigens in fraktionierten EBV-infizierten Zellen.....	119
Abbildung 45: Einfluss der EBER1/2-RNAs auf die CUL5 3'UTR.....	207

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Latenztypen verschiedener EBV-assoziiertes Erkrankungen und entsprechende Expressionsmuster	5
Tabelle 2: Protein-Bestandteile des "LMW"-Molekulargewichtsmarker für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen	35
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primäantikörper	36
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten miRNA-Expressionsplasmide	43
Tabelle 5: Übersicht der zur Klonierung verwendeten Oligonukleotidprimer. Restriktions-Schnittstellen sind kursiv dargestellt.	45
Tabelle 6: Übersicht der qRT-PCR-Primer	45
Tabelle 7: Übersicht der ssDNA-Templates für Northern Blot-Sonden	46
Tabelle 8: Komponenten eines 50µl PCR-Ansatzes	56
Tabelle 9: PCR-Standardprogramm	57
Tabelle 10: Komponenten eines 50µl Mutagenese-PCR-Ansatzes	58
Tabelle 11: PCR-Programm eines Mutagenese-Ansatzes	58
Tabelle 12: Einsatz verschiedener Agarosegel-Konzentrationen je nach aufzutrennenden DNA-Fragmentgrößen	59
Tabelle 13: Zusammensetzung eines Standard-Restriktionsansatzes	61
Tabelle 14: Komponenten und Volumina von Ligationsansätzen	63
Tabelle 15: Zusammenstellung eines Standard-Ligationsansatzes für pGEM®-T Ligationen	63
Tabelle 16: Zusammensetzung eines 12% Urea-Polyacrylamidgel für Northern Blots	66
Tabelle 17: Bestandteile der Hybridisierungsreaktion zur Herstellung einer Northern Blot-Sonde	67
Tabelle 18: Reaktionsagenzien, die dem Hybridisierungs-Mix hinzugefügt wurden	68
Tabelle 19: Reaktionsansatz für die <i>in vitro</i> Transkription zur Herstellung einer radioaktiv markierten Northern Blot-Sonde	68
Tabelle 20: Komponenten eines DNaseI-Verdau zur cDNA-Synthese	70
Tabelle 21: Zusammensetzung eines Reverse Transkriptionsansatzes	71
Tabelle 22: Reaktionsansatz einer quantitativen RT-PCR im Roche-System	73
Tabelle 23: Programm-Settings zur Amplifikation von miRNAs im Light Cycler	73
Tabelle 24: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamidgelen verschiedener Porengröße	77
Tabelle 25: Zelltypen, innerhalb der PBMC und ihre Dichte	81
Tabelle 26: Übersicht der generierten Sequenzen aus den drei cDNA-Banken	86
Tabelle 27: Anzahl der annotierten zellulären miRNAs in allen drei cDNA-Banken	87
Tabelle 28: Auflistung der zehn am stärksten exprimierten miRNAs in den Zelllinien SNK6, SNT16 und dem NK/T-Zell Lymphom aus der vorangegangenen Sequenzierung	90
Tabelle 29: Übersicht über die Gesamtzahl und Annotationen der EBER-Sequenzen in den EBV-positiven cDNA-Banken	93
Tabelle 30: Rohdaten der Illumina-Hochdurchsatzsequenzierung für humane miRNAs	167
Tabelle 31: Rohdaten der Illumina-Hochdurchsatzsequenzierung für EBV-miRNAs	205

Abkürzungen

3'-OH	freie Hydroxylgruppe am 3'-Ende
3'-Poly(A)	Poly-Adenylgruppe am 3'-Ende von mRNA
5'-Cap	Cap-Struktur am 5'-Ende von mRNA
a	anti
A	Ampère
Abb.	Abbildung
Ago	Argonaute Protein
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
Amp	Ampicillin
APOBEC3G	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAK	BCL2-antagonist/killer
BALF	BamHI-A fragment containing the fifth leftward open reading frame
BART	BamHI A rightward transcripts
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BHRF1	Bam HI fragment H rightward open reading frame 1
BIC	bicaudal
BIM (= BCL2L11)	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
BL	Burkitt Lymphom
bp	Basenpaare
BRUCE (= BIRC6)	baculoviral IAP repeat containing 6
BSA	Bovines Serumalbumin
BTRC	beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase
<i>C. elegans</i>	<i>Ceaeenorhabditis elegans</i>
CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
CCKBR	cholecystokinin B receptor
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20
CCR6	chemokine (C-C motif) receptor 6
CD21 (= CR2)	complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2

CD363 (= S1PR1)	sphingosine-1-phosphate receptor 1
CDK6	cyclin-dependent kinase 6
CDK8	cyclin-dependent kinase 8
cDNA	copyDNA
CIP	calf intestinal phosphatase
c-KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
cm	centimeter
CMV	Zytomegalie Virus
c-Myb	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog
c-MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
CO ₂	Kohlendioxid
CpG-Insel	Cytosin phosphat Guanin – Insel
CR2	complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2
CUL5	Cullin 5
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DICE1 (= INTS6)	integrator complex subunit 6
DLBCL	Diffus-großzellige B-Zell Lymphome
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
Drosha	double-stranded RNA-specific endoribonuclease
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EB	Epstein-Barr
EBER1/2	Epstein-Barr Virus encoded RNA 1/2

EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDC	Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDG1 (= S1PR1)	sphingosine-1-phosphate receptor 1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eiF2 α	eukaryotic translation Initiation Factor 2alpha
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EZH2	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
FAS	Fas cell surface death receptor
FKS	fötales Kälberserum
FLAG	Proteintag mit der Aminosäuresequenz DYKDDDDK
G418	Geneticin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O _{(bi)dest}	(bi)destilliertes Wasser
HA	Human influenza hemagglutinin
HBV	Hepatitis B-Virus
HEK	Human Embryonic Kidney
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HL	Hodgkin Lymphom
IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
IgG	Immunglobulin G
IL-10	Interleukin-10
IL-1 α	Interleukin-1 alpha
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
IL-9	Interleukin-9
IM	Infektiöse Mononukleose
IP	Immunpräzipitation

IPO7	Importin 7
IPTG	Isopropylthiogalactosid
IRF3	interferon regulatory factor 3
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
JAK2	Janus kinase 2
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K-RAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KSHV	Kaposi Sarkom assoziiertes Herpes Virus
l	Wellenlänge [nm]
L22	50S ribosomal protein L22
La	Lupus Antigen
LANA	latency-associated nuclear antigen
LARII	Luciferase assay reagent
LB	Luria's Broth
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LMP	Latenz-Membranprotein
μ	Mikro-
m	Milli-
M	molar
MACS	magnetic cell separation
MAP3K2	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2
MCS	Multiple Cloning Site
MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B
min	Minute(n)
miR	microRNA
miRNA	microRNA
MMP7	Matrix-Metalloproteinase 7
MPIPZ	Max-Planck Institut für Pflanzenzüchtung
mRNA	messenger RNA
mut	Mutante
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NaAc	Natriumacetat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs

NFκB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NKTL	NK/T-Zell Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	nanometer
NPC	Nasopharynx-Karzinom
nt	Nukleotid
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
ori	Ursprung der Plasmidreplikation (origin of replication)
p53	protein 53
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAZ	Piwi, Argonaut und Zwillie/Pinhead
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
P-Bodies	Processing Bodies
PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	phosphate buffered saline-Tween20
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
piRNA	piwi-interacting RNA
PIWI	P-element induced wimpy testis.
PKR	double stranded RNA-dependent protein kinase
pox	Peroxidase
pre-miR	precursor microRNA
pri-miR	primary microRNA
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTLD	Posttransplant lymphoproliferative Disorder
PUMA (= BBC3)	BCL2 binding component 3
PVC	Polyvinylchlorid
qRT-PCR	quantitative RealTime-PCR
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein)
Rb	Retinoblastom
RIG-I (= DDX58)	retinoic acid-inducible gene-1
RING	really interesting new gene
RISC	RNA induced silencing complex

RLU	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNAse	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S1PR1	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1
SB	Sample Buffer
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
siRNA	small interfering RNA,
SOB	Super Optimal Broth
SOCS	suppressor of cytokine signaling
Src	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
SV40	simian virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat- Ethylendiamintetraacetat
Taq	Thermus aquaticus
T-bet	T-cell-specific T-box transcription factor
TBS-T	Tris buffered saline-Tween20
TE	Tris- Ethylendiamintetraacetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TK	Tyrosinkinase
TOMM22	translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)
TRBP (= TARBP2)	TAR (HIV-1) RNA binding protein 2
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)

VAI/VAII	viral associated-I/-II
VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

1 Zusammenfassung

Das Epstein-Barr Virus (EBV) ist ein humanpathogenes, tumor-assoziiertes Herpesvirus, welches für 44 microRNAs (miRNAs) und zwei nicht-kodierende RNAs EBER1 und EBER2 kodiert. MiRNAs sind 23-25 nt kurze, ebenfalls nicht-kodierende RNAs, die die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene beeinflussen. Virale miRNAs und EBER1/2 tragen wesentlich zur Entstehung bzw. Progression von EBV-assoziierten Lymphomen oder soliden Tumoren bei. In einer vorangegangenen Arbeit war das miRNA-Profil von NK/T-Lymphomen im Vergleich zu Thymus etabliert worden. Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die vergleichende miRNA-Analyse der EBV-positiven NK/T-Zelllinien SNK6 und SNT16 im Vergleich zu primären CD56⁺CD3⁺ NK/T-Zellen, den vermuteten Vorläuferzellen der NK/T-Lymphome. Im Vergleich zu den primären NK/T-Lymphozyten wurden die miRNAs hsa-miR-155-5p, -20a-3p, -17-5p, und 21-5p stark hochreguliert, sowie die miRNAs hsa-miR-150-5p, -148a-3p, 26a/b-5p, -22-3p, -3607-3p, -140-3p, -101-3p, -186-5p, -let7g-5p, -30d-5p und -27a-3p reprimiert. Durch funktionelle Analysen konnten die Zielgene Cullin 5 (CUL5) für die im NKTL stark reprimierte, zelluläre miRNA hsa-miR-148a-3p und Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1 (S1PR1) für die virale miRNA ebv-miR-BART16 identifiziert werden. Die Illumina-Sequenzen der NKTL-Zelllinien lieferten weiterhin kürzere Fragmente, die Teilen der EBER1/2-RNAs zugeordnet werden konnten. Eine Validierung mittels Northern Blot verschiedener EBV-infizierter Zelllinien bestätigte die Existenz von 23, 52 und 70 nt kurzen Fragmenten, die vom 5'-Ende der EBER1-RNA stammten (EBER1₂₃, EBER1₅₂, EBER1₇₀). Durch Zellfraktionierungsexperimente wurde gezeigt, dass sowohl die Vollängen-EBER1/2-RNAs als auch deren kurze Fragmente vorrangig im Zytoplasma EBV-positiver Raji-Zellen lokalisiert sind. Auch das Lupus Antigen, welches bereits als Interaktionspartner für EBER1/2 bekannt ist, ist im Zytoplasma von Raji-Zellen, bzw. der Lymphoblastoid-Zelllinien LCL AM 29 (Wildtyp-EBV) und LCL AM 58 (EBER-Deletion) vorzufinden. In Zusammenarbeit mit Daniele Hasler (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gunter Meister, Regensburg) konnte die Bindung des EBER1₂₃-Fragments an La gezeigt werden. Schließlich wurde ein selektiver, additiver Einfluss der EBER1/2-RNAs während der posttranskriptionellen Regulation von miRNA-Zielgenen ermittelt. Dieser Effekt wurde für das neu identifizierte Zielgen S1PR1 der viralen ebv-miR-BART16, sowie den bereits bekannten Zielgenen IL-1 α und RAC1 für hsa-miR-142-3p, nicht aber für das neu identifizierte Zielgen CUL5 der zellulären hsa-miR-148a-3p und nicht für TOMM22, welches durch ebv-miR-BART16 reguliert wird, gezeigt.

2 Summary

Epstein-Barr virus (EBV) is a human, oncogenic herpesvirus that encodes 44 viral microRNAs (miRNAs) and two non-coding, non-polyadenylated RNAs EBER1 and EBER2. EBV-encoded miRNAs and the EBERs have been shown to play a critical role during transformation and progression of EBV-infected cells or lymphomas and solid tumors. In a previous study, miRNA profiles of EBV-associated NK/T-cell lymphomas and thymus were established. In this study, miRNA profiling of two NKTL cell lines SNK6/SNT16 vs. primary CD56⁺CD3⁺ NK/T-cells, the potential NKTL precursor cells, was done. For SNK6/SNT16 the miRNAs hsa-miR-155-5p, -20a-3p, -17-5p, and -21-5p were strongly up-regulated and hsa-miR-150-5p, -148a-3p, 26a/b-5p, -22-3p, -3607-3p, -140-3p, -101-3p, -186-5p, -let7g-5p, -30d-5p and -27a-3p were repressed compared to primary CD56⁺CD3⁺ NK/T-cells. Functional analyses revealed cullin-5 (CUL5) as a target for the strongly repressed human hsa-miR-148a-3p and sphingosine-1-phosphate-receptor-1 (S1PR1) as a target for the viral ebv-miR-BART16. MiRNA profiling of these two NKTL cell lines also revealed EBER1/2 to be processed to short fragments. Northern blot validation of various EBV-infected cell lines confirmed short 5'-EBER1-derived RNAs of 23, 52 and 70 nt length (EBER1₂₃, EBER1₅₂, EBER1₇₀), but there was no signal for a short 3'-EBER2-derived RNA. In cytoplasmic Raji-fractions EBER2 and EBER1 short RNAs were detectable. The EBERs were known to bind the Lupus Antigen and consistent with this La is also predominantly localized in the cytoplasm of EBV-infected Raji-cells and lymphoblastoid cell lines LCL AM 29 which is transformed by a recombinant wildtype EBV and LCL AM 58 which carries a deletion of the EBERs. In collaboration with Daniele Hasler (Prof. Dr. Gunter Meister lab, Regensburg) we could show that the small EBER1₂₃ is bound to La. Finally, a selective, additive influence of EBER1/2 on the posttranscriptional miRNA-driven regulation of gene expression was detected. The EBERs affect regulation of S1PR1, IL-1 α and RAC1 but not CUL5 and TOMM22 which are targets for ebv-miR-BART16, hsa-miR-142-3p and hsa-miR-148a-3p.

3 Einleitung

3.1 Das Epstein-Barr Virus

Der britische Chirurg Dennis Burkitt beschrieb Ende der 1950er Jahre ein Lymphom, welches wiederholt bei Kindern aus Malaria- und Gelbfiebergebieten in Zentral- und Ostafrika auftrat (Burkitt, 1958). Er stellte die Hypothese auf, dass ein infektiöses Agens ein ausschlaggebender Faktor in der Krebsentstehung darstellen könnte. Schließlich gelang es Mitte der 1960er Jahre dem britischen Virologen Anthony Epstein und seinen Mitarbeitern Yvonne Barr und Bert Achong herpesähnliche Viruspartikel in *in vitro* gezüchteten Zellen, die aus einem Burkitt Lymphom stammten, mittels Elektronenmikroskopie nachzuweisen (Epstein et al., 1964). Das Virus wurde nach seinen Entdeckern „Epstein-Barr Virus“ (= EBV) benannt. Ein Beweis, dass EBV *in vitro* B-Zellen transformieren kann, wurde vier Jahre später erbracht (Henle et al., 1967). Es existieren zwei EBV-Subtypen, welche in Afrika gleichermaßen vorkommen. EBV1, welches eine stärkere Transformationseffizienz *in vitro* aufweist, wird jedoch hauptsächlich in westlichen Industrieländern nachgewiesen (Rickinson et al., 1987; Zimmer et al., 1986). Die Unterschiede der beiden EBV-Typen liegen in den Aminosäuresequenzen ihrer nukleären Antigene, die verschiedene T-Zellantworten auslösen können (Sample et al., 1990).

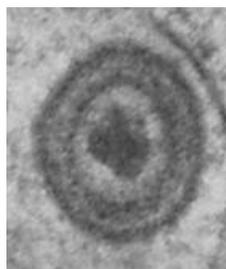


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EB Viruspartikels (Epstein et al., 1965)

EBV gehört zur Familie der *γ -Herpesviridae* und ist Mitglied der Gattung *Lymphocryptoviridae*. Lymphocryptoviren sind sehr wirtsspezifisch, da sie nur in Zellen von Primaten gefunden werden. EBV infiziert als einziges Virus dieser Gattung ausschließlich Menschen. Ihr lineares Genom besteht aus doppelsträngiger DNA mit einer Länge von 172 Basenpaaren. Die DNA ist von einem ikosaedrischen Nukleokapsid umschlossen, welches

aus 162 Kapsomeren besteht. Wie alle Herpesviren besitzen EBV-Partikel eine Lipidhülle, in der Glykoproteine eingelagert sind. Zwischen Membran und Kapsid befindet sich das Tegument, welches aus einer unstrukturierten Proteinmatrix besteht (Modrow, 2002).

3.1.1 Die Epstein-Barr Virus Infektion

Mehr als 90% der erwachsenen Weltbevölkerung sind EBV-seropositiv, denn nach der Primärinfektion persistiert das Virus lebenslang in B-Gedächtniszellen des Wirts (Thorley-Lawson, 2005). Eine Primärinfektion im Kindesalter verläuft meist asymptomatisch, wohingegen eine Infektion junger Erwachsener mit einer infektiösen Mononukleose (= IM) korreliert, die auch „Pfeiffer'sches Drüsenfieber“ genannt wird. IM wird durch eine unkontrollierte T-Zellantwort ausgelöst (Henle et al., 1968). Die Übertragung von EBV erfolgt meist über den Speichel infizierter Personen, weswegen IM vom Volksmund auch „Kissing Disease“ genannt wird. EBV infiziert zunächst Epithelzellen des Nasenrachenraumes, in denen die Virusreplikation abläuft. Nachfolgend werden in der Schleimhaut CD19⁺ Memory-B-Zellen infiziert und schließlich immortalisiert, um ein Leben lang zu persistieren (Babcock et al., 1998). Die Glykoproteine gp350/220 auf der Virusmembran sind in der Lage, an das B-zelluläre Oberflächenprotein CD21, bzw. CR2, zu binden (Nemerow et al., 1987; Tanner et al., 1987). Anschließend erfolgt die endozytotische Aufnahme des Viruspartikels, welcher zum Zellkern transportiert wird. Die EBV-DNA zirkularisiert im Zellkern anhand terminaler Repeatsequenzen zu einem Episom (Kintner and Sugden, 1979). Die darauf folgende EBV-spezifische Immunantwort ist in der Lage, den Großteil der lytisch infizierten Zellen zu vernichten. In den verbleibenden Gedächtnis-B-Zellen bildet sich die Latenz aus. Die virale Genexpression wird auf die Expression des EBV-nukleären Antigens 1 (= EBNA1) reduziert, welches für die Weitergabe des episomalen EBV-Genoms an Tochterzellen während Zellteilungen verantwortlich ist (Yates et al., 1985). Während der Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen können sie wieder zu Epithelzellen des Mundrachens migrieren, wo EBV, wie auch andere Herpesviren, reaktiviert und sich über den Speichel seines Wirts verbreiten kann. Auslöser einer EBV-Reaktivierung können demnach sowohl die Differenzierung der B-Zellen als auch akuter Stress sein (Laichalk and Thorley-Lawson, 2005).

Die Etablierung der EBV-Latenztypen geht mit charakteristischen Expressionsmustern einher, die in Tabelle 1 erläutert werden.

Tabelle 1: Latenztypen verschiedener EBV-assoziiierter Erkrankungen und entsprechende Expressionsmuster

Latenztyp	Expressionsmuster	Vorkommen
I	EBNA1 EBER1/2	BL, NKTL
II	EBNA1 EBER1/2 LMP (1, 2A, 2B)	NPC, HL, NKTL
III	EBNA (1, 2, 3A, 3B, 3C, LP) EBER1/2 LMP (1, 2A, 2B)	akute IM, PTLD, LCL, AIDS-assoziierte Lymphome

Alle EBV-Latenztypen zeichnen sich durch die Expression von EBNA1 und der EBER1- und EBER2-RNAs aus. In Zellen der Latenz von Typ II werden zusätzlich die latenten Membranproteine (= LMP) exprimiert. Werden jedoch alle EBNA-Proteine und somit alle Latenzgene exprimiert, so handelt es sich um den Latenztyp III.

3.1.2 Epstein-Barr Virus assoziierte Tumorerkrankungen

Weltweit sind ca. 1% aller Tumore mit dem Epstein-Barr Virus assoziiert und auch *in vitro* ist es möglich, B-Zellen durch EBV zu immortalisieren. Dennoch tragen mehr als 90% der erwachsenen Weltbevölkerung das Virus latent und ohne wahrnehmbare Symptome in sich. Ein erheblicher Risikofaktor bei der Tumorentstehung unter EBV-Einfluss ist möglicherweise Immunsuppression (Delecluse et al., 2007).

3.1.2.1 Lymphome unter Immunsuppression

Personen, die aufgrund eines transplantierten Organs oder einer HIV-Infektion unter Immunsuppression stehen, sind einem großen Risiko ausgesetzt, Lymphome zu entwickeln. Während dieser Phase werden zytotoxische T-Zellen in ihrer Immunantwort unterdrückt. In Folge dessen kann EBV unkontrolliert replizieren. Posttransplant-Erkrankungen („Post-Transplant-Lymphoproliferative Disease, PTLD) stellen B-Zelllymphome dar und kommen vermehrt während des ersten Jahres nach einer Organ- oder hämatopoetischen Stammzelltransplantation vor, wenn eine sehr starke Immunsuppression herrscht. PTLD zeigen eine Typ III Latenz, allerdings wird in der späten Phase nur in 60-80% der Fälle EBV nachgewiesen. Lymphoblastoide Zelllinien (= LCL) stellen ein *in vitro*-Korrelat zu PTLD dar.

AIDS-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen sind im Gegensatz zu PTLD äußerst heterogen, jedoch kommen Burkitt Lymphome der Latenz I verstärkt vor, die zu 30-40% EBV-Assoziation aufweisen (Carbone et al., 2009; Carbone et al., 2008; Morscio et al., 2013; Young and Rickinson, 2004).

3.1.2.2 Burkitt Lymphome

Unter den Burkitt Lymphomen (= BL) sind zwei Formen bekannt. Endemische BL sind mit 95% sehr stark mit EBV assoziiert, wohingegen sporadische Formen des BL lediglich 10-20% EBV-Assoziation aufweisen. Neben einer Latenz des Typs I sind diese Lymphome durch eine chromosomale Translokation des c-Myc-Gens in den Immunglobulin-Locus charakterisiert, wodurch eine konstitutive c-Myc Aktivierung gewährleistet wird (Bornkamm et al., 1987; Carbone et al., 2008; Young and Rickinson, 2004).

3.1.2.3 Hodgkin Lymphome

Hodgkin Lymphome (= HL) stellen eine seltene Lymphomart dar. Die charakteristischen, malignen und mehrkernigen Reed-Steinberg Zellen sind jedoch nur zu einem geringen Anteil im Infiltrat von Immunzellen vorhanden. Diese Typ II latenten Zellen tragen die EB-virale Erbinformation und können auch während einer Infektiösen Mononukleose nachgewiesen werden. Die Assoziation mit EBV liegt bei 40-80% (Kutok and Wang, 2006; Thompson and Kurzrock, 2004).

3.1.2.4 Magenkarzinome

Die nicht endemischen Magenkarzinome sind zu 10% mit EBV assoziiert. Maligne Zellen exprimieren Latenzgene des Typs II, allerdings findet man das LMP1-Protein nur selten, wohingegen die LMP1-mRNA deutlich exprimiert wird (Young and Rickinson, 2004).

3.1.2.5 Nasopharynxkarzinome

Nasopharynxkarzinome (= NPC) entstehen hauptsächlich im asiatischen Raum. Oft werden NPC mit Umweltfaktoren in Verbindung gebracht, wie z. B. Nitrosamine in Lebensmitteln (Poirier et al., 1987). NPC sind immer EBV positiv und exprimieren Latenzgene des Typs II, wobei LMP1 oder LMP2A gelegentlich nicht nachweisbar sind (Young and Rickinson, 2004).

3.1.3 NK/T-Zell Lymphome

Die seltenen NK/T-Zell Lymphome (= NKTL) sind, wie NPC und endemische BL, stets EBV-positiv. Diese äußerst aggressiven Tumore treten fast ausschließlich in Zentral- und Südamerika sowie in Asien auf, wo sie ca. 3-9% aller malignen Lymphome ausmachen. Männer zwischen 50 und 60 Jahren sind häufiger betroffen als Frauen (Oshimi, 2007). Meist ist der Mund-Rachenraum betroffen, aber es wurden auch extranodale Fälle von NKTL in der Haut, den Hoden, dem oberen Gastrointestinaltrakt und der Augenhöhle beobachtet (Grywalska et al., 2013). Die Patienten leiden an schmerzhaften Läsionen im Gaumen- oder Nasenrachenraum, was auf die Expression von Perforin oder Granzym B zurückzuführen ist (Abbildung 2).



Abbildung 2: Ein Patient mit nasalem NK/T-Zelllymphom (Nikolaos et al., 2012)

Eine 6x4cm große, oronasale Wunde, durch die Essensreste und Flüssigkeiten in die Nasenhöhle gelangen können.

Die starke Nekrotisierung ist ein Grund für den Mangel an Tumormaterial für Diagnostik und Forschung. Der zelluläre Ursprung dieser Tumore ist nach wie vor umstritten diskutiert. Viele

Forscher haben Hinweise darauf erarbeitet, dass NKTL aus natürlichen Killerzellen hervorgehen, wohingegen zytotoxische T-Zellen als Ursprung nicht ausgeschlossen werden können (Suzumiya et al., 1994). Es ist auch unklar, wie eine Infektion von NK- oder T-Zellen zu Stande kommen könnte. Vermutlich spielt hierbei der CD21-Oberflächenrezeptor eine Rolle, denn über ihn erfolgt normalerweise eine EBV-Infektion von B-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen diesen Rezeptor in geringem Maße exprimieren (Kanegane et al., 1996), jedoch kann eine Infektion von NK-Zellen mit EBV auch in Abwesenheit dieses Rezeptors stattfinden (Isobe et al., 2004). Auch auf T-Zellen konnte CD21 in geringen Mengen nachgewiesen werden (Tsoukas and Lambris, 1993). NKTL weisen ein Latenz I- oder –II-Expressionsmuster auf, abhängig von der Expression des LMP1-Gens (Chiang et al., 1996). Trotz der oftmals sehr geringen Menge an Tumorgewebe, war es möglich, Modulationen von Tumorsuppressor- und Onkogenen in geringem Maße zu untersuchen. So scheint das p53-Gen in NKTL häufig mutiert zu sein (Li et al., 2000). Auch FAS, Rb, p16INK, K-RAS, c-KIT, BAK und β -Catenin sind häufig von Mutationen betroffen. Eine Überexpression von MYC, NF κ B, Survivin und STAT3 wurde ebenfalls bereits nachgewiesen (Aozasa and Zaki, 2011; Kurniawan et al., 2006; Shen et al., 2002).

3.2 Die EBV-kodierten RNAs EBER1 und EBER2

3.2.1 Struktur und Expression der EBER1/2-RNAs

EBV kodiert, zusätzlich zu den bisher genannten Proteinen, für zwei nichtkodierende RNAs mit dem Namen EBER1 und EBER2 (= EBV encoded RNA). Diese sind 167 bzw. 172 Nukleotide lang und im EBV-Genom durch 161 Basen voneinander getrennt. Beide EBER-Gene beinhalten Transkriptions-Kontrollregionen für die RNA-Polymerase III (Rymo, 1979). Trotz einer Sequenzhomologie von nur 54% sind ihre Sekundärstrukturen auffällig ähnlich, was auf einen hohen Grad an Basenpaarungen mit mehreren kleinen „Loops“ zurück zu führen ist (Abbildung 3). Des Weiteren befindet sich an beiden 5'-Enden ein Triphosphat, wohingegen die 3'-Enden von vier Uridinresten gebildet werden. EBER1/2 sind nicht-polyadenylierte RNAs. Diese charakteristische Sekundärstruktur hat eine starke Ähnlichkeit mit den von Adenoviren des Typs 2 gebildeten VAI und VAII-RNAs und kann diese funktionell ersetzen (Rosa et al., 1981). Die EBER1/2-Sequenzen sind innerhalb vieler EBV-

Stämme hoch konserviert, denn es wurden für EBER1 keine und EBER2 nur zwei Veränderungen in der Nukleotidsequenz nachgewiesen (Katze et al., 1991).

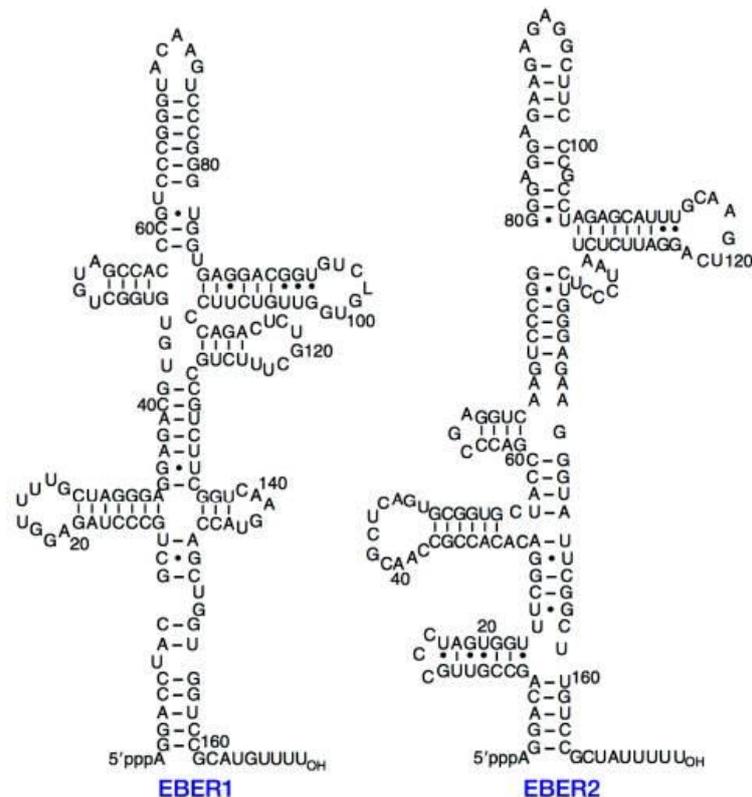


Abbildung 3: Sekundärstrukturen der EBER1/2-RNAs (Iwakiri, 2014)

Die Sekundärstrukturen der nichtkodierenden RNAs EBER1 und EBER2 weisen zahlreiche intramolekulare Basenpaarungen und Schleifenstrukturen auf. An den 5'-Enden beider EBER-RNAs befindet sich ein Triphosphatrest und an den 3'-Enden eine Poly-(U)-Sequenz.

Obwohl die Transkription der EBER1/2-RNAs durch die RNA-Polymerase III erfolgt, gibt es auch Hinweise auf eine mögliche Transkription durch RNA-Polymerase II (Howe and Shu, 1989; Yao et al., 1996). Es liegen in jeder EBV-infizierten Zelle 50-500 EBER1/2-Transkripte vor (Arrand and Rymo, 1982; Howe and Shu, 1988; Lerner et al., 1981). Obwohl die EBER1/2-Transkription in gleichen Mengen resultieren sollte, ist das ermittelte EBER1-Niveau stets zehnfach höher als das EBER2-Niveau, was vermutlich auf eine längere Halbwertszeit von EBER1 zurück zu führen ist (Clarke et al., 1992). Aufgrund dieser starken Expression gilt die EBER-*in situ*-Hybridisierung (= EBER-ISH) als Goldstandard in der Frage, ob ein biopsiertes Tumorgewebe EBV-infiziert ist (Chang et al., 1992). Ausnahmen sind Gewebe von oralen Haarleukoplattien, Sjögrens Syndrom, Speicheldrüsenlymphome und orale Papillome, obwohl eine aktive EBV-Replikation beobachtet werden konnte (Gilligan et al., 1990; Mizugaki et al., 1998; Wen et al., 1997; Wen et al., 1996). EBER1 und EBER2 werden durch *in situ*-Hybridisierungen hauptsächlich im Zellkern detektiert (Chang et al.,

1992; Howe and Steitz, 1986). Wählt man aber eine andere Methode zum RNA-Nachweis, so gibt es ebenso Studien, in denen EBER1/2 im Zytoplasma nachgewiesen werden konnte (Collandre et al., 1984; Rymo, 1979). Auch in Exosomen und im extrazellulären Raum konnten die beiden EBER1/2-RNAs detektiert werden (Ahmed et al., 2014; Iwakiri et al., 2009).

3.2.2 Funktion der EBER1/2-RNAs

Die hohe Strukturhomologie der beiden EBER-RNAs lässt vermuten, dass sie für EBV eine wichtige Rolle spielen. Hinweise über die Funktion der EBER-RNAs während der EBV-Virusinfektion und ihr Beitrag zur EBV-assoziierten Karzinogenese werden unter anderem durch ihre Protein-Interaktionspartner geliefert, von denen drei in Abbildung 4 gezeigt werden.

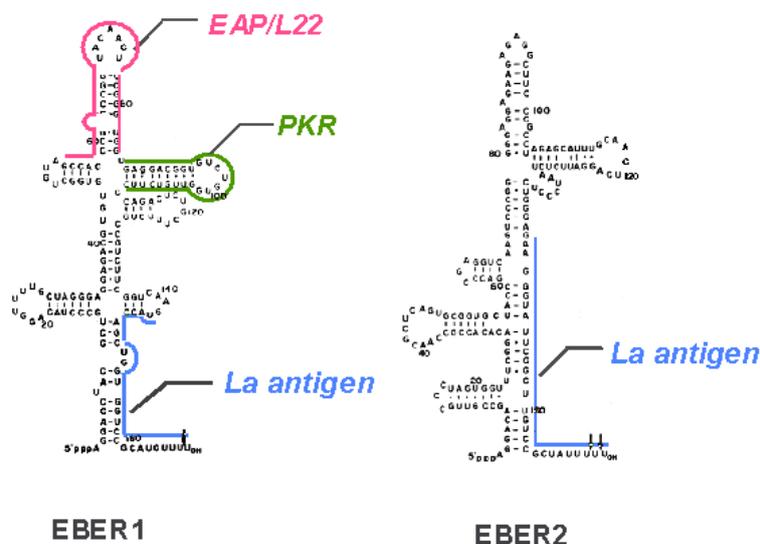


Abbildung 4: Sekundärstrukturen der EBER1/2-RNAs und Orte der Interaktion mit La, PKR und L22 (Homepage Arbeitsgruppe Takada http://www.igm.hokudai.ac.jp/vir/work_e.html)

EBER1 geht eine Bindung mit L22, PKR und dem La-Antigen ein. Letzteres wurde auch in Assoziation mit EBER2 vorgefunden.

Das unter normalen Bedingungen im Zellkern lokalisierte Lupus Antigen (= La) kann an Poly-U-Reste an 3'-Enden von RNA-Polymerase III-Transkripten binden (Teplova et al., 2006). Demnach wurden EBER1 und EBER2 in nukleären Ribonukleoproteinkomplexen (= RNP) mit La gefunden (Lerner et al., 1981). In diesem Komplex ist es EBER1/2 auch möglich, vom Kern ins Zytoplasma und via Exosomen in den extrazellulären Raum zu gelangen

(Bachmann et al., 1989; Iwakiri et al., 2009). Wie „EBER-assoziiertes Protein“, der ursprüngliche Name des ribosomalen L22-Proteins, schließen lässt, bindet es EBER1. L22 wurde in RNP-Komplexen gefunden, die ebenfalls La enthielten (Toczyski et al., 1994; Toczyski and Steitz, 1991, 1993). Eine Bindung von L22 an EBER1 kann an mehreren Loops erfolgen (Dobbelstein and Shenk, 1995; Fok et al., 2006b; Toczyski and Steitz, 1993). Es wird vermutet, dass L22 eine Rolle in der Transformation von Zellen spielt, da es als Target für chromosomale Translokation angesehen wird und auch in Verbindung mit der Telomerase steht (Le et al., 2000; Nucifora et al., 1993). Im Komplex mit L22 könnte EBER1 die Translation von Proteinen beeinflussen (Fok et al., 2006b). EBER1/2 können funktional die Rolle der bereits erwähnten Adenovirus-RNAs VAI und VAIL während der Adenovirusreplikation übernehmen (Bhat and Thimmappaya, 1983). Genau wie die VA-Transkripte binden die EBER1/2-RNAs an die dsRNA-abhängige Proteinkinase (= PKR) (Vuyisich et al., 2002). Diese Serin-/Threoninkinase ist durch die Typ I-Interferone α und β induzierbar und somit verantwortlich für Interferon-abhängige, antivirale Effekte (Meurs et al., 1990; Sharp et al., 1993). Durch die Bindung der EBER-RNAs an PKR kann diese nicht mehr aktiviert werden, wodurch die Phosphorylierung ihres Substrates eIF2 α (= Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2 alpha) verhindert wird, woraufhin eIF2 α als Transkriptionsfaktor nicht mehr inhibierend wirkt (Clarke et al., 1990; Sharp et al., 1993). Ein zytosolisches Protein, das durch Retinolsäure induziert werden kann (= RIG-I), erkennt virale dsRNA-Strukturen anhand ihrer 5'-Triphosphate und initiiert in Folge dessen Signalwege, die zur Produktion von Typ I-Interferonen, inflammatorischen Zytokinen und zur Aktivierung von NF κ B und IRF3 (= Interferonregulatorischer Faktor 3) führen (Hornung et al., 2006). Als RNA mit partiell sehr ausgeprägter, doppelsträngiger Sekundärstruktur erkennt RIG-I auch die EBER1/2-RNAs (Samanta et al., 2006). Durch die Interaktion der EBER1/2-RNAs mit PKR und RIG-I entgeht EBV den antiviralen Funktionen der Interferone, was zur Latenzstabilisierung beitragen kann. Die Assoziation der EBER1/2 mit RIG-I induziert darüber hinaus die Produktion von IL-10, welches als autokriner Wachstumsfaktor in Burkitt Lymphomen fungiert (Samanta et al., 2008). Neben IL-10 induzieren EBER-RNAs IL-9, welches als Wachstumsfaktor für T-Zellen gilt. Somit könnten EBER1/2 auch an der Entstehung EBV-assoziiierter T-Zell Lymphome beteiligt sein (Yang et al., 2004). Des Weiteren wurde bestätigt, dass EBER1/2 durch Induktion von IGF1 (= Insulin-like growth factor) ebenfalls die Proliferation von LCLs und epithelialen Zellen, die von NPC und Magenkarzinomen stammen, induziert (Gregorovic et al., 2011; Iwakiri et al., 2003; Iwakiri et al., 2005). Während die Transfektion der EBER-RNAs in EBV-negative BL-Zellen zu einem verstärkten Zellwachstum, Tumorbildung und verminderter Apoptose führt (Komano et al., 1999; Shimizu et al., 1994; Yamamoto et al., 2000), gibt es auch Studien, die berichten, dass EBER1 und EBER2 nicht für eine EBV-Infektion oder Transformation von B-Zellen benötigt

werden. EBER-deletierte Viren waren immer noch in der Lage, primäre B-Zellen zu transformieren, allerdings mit einer deutlich geringeren Effektivität (Swaminathan et al., 1991; Yajima et al., 2005).

3.3 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz beschreibt eine posttranskriptionelle Möglichkeit der Genregulation. Dieser Vorgang wurde 1990 erstmalig in Pflanzen beobachtet (Napoli et al., 1990). Kurz darauf wurde im Nematoden *Caenorhabditis elegans* beschrieben, dass *lin4* eine kurze RNA mit zur *lin4* mRNA komplementären Sequenzen kodiert, wodurch dessen Proteinexpression inhibiert und die Entwicklung dieses Fadenwurms beeinträchtigt wurde (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Der Nobelpreis für Medizin wurde Andrew Fire und Craig Mello 2006 für die Beobachtung verliehen, dass das Einbringen doppelsträngiger RNA in *C. elegans* die Expression von Genen verhindern kann (Fire et al., 1998). DsRNAs, die in solcher Weise fungieren, hatten eine Länge von 21-23 Nukleotiden (Hamilton and Baulcombe, 1999). Der Begriff „microRNA“ wurde erst 2001 etabliert und definiert ca. 22 nt lange, nicht-kodierende, endogene RNA-Moleküle, die zur sequenzspezifischen Regulation der Genexpression in der Lage sind (Ambros et al., 2003; Ruvkun, 2001).

3.3.1 microRNAs

Abgesehen von Pflanzen und Nematoden, wurden miRNAs in verschiedenen Organismen, wie z. B. Insekten und Vertebraten nachgewiesen (Bartel, 2004). Zur Zeit sind 24.521 miRNA-Loci in 206 Spezies, die zu 30.424 reifen miRNAs prozessiert werden können, veröffentlicht, darunter 2.603 humane miRNAs, die schätzungsweise durch 3% aller humanen Gene kodiert sind (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014; Sen et al., 2009). Einzelne kodierte miRNAs oder miRNA-Cluster-Gene können sich in Introns oder Exons kodierender oder nicht-kodierender Gene befinden, aber es gibt auch miRNAs, die über eigene Promotoren verfügen (Aravin et al., 2003; Lau et al., 2001; Rodriguez et al., 2004).

Die Biogenese von miRNAs ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt und beginnt klassisch im Zellkern mit der Transkription eines miRNA-Gens, die hauptsächlich durch die RNA-Polymerase II erfolgt (Lee et al., 2004). Laut einer Studie aus 2006 kann es in seltenen Fällen auch zu einer Transkription durch die RNA-Polymerase III kommen (Borchert et al.,

2006). Das dabei entstandene primäre Transkript (= pri-miRNA) weist eine charakteristische Haarnadelstruktur und Ähnlichkeiten zu mRNA auf und wird von einem Mikroprozessorkomplex gebunden, der aus der dsRNA-spezifischen RNase III „Drosha“ und dem Protein DGCR8 (= Di-George Syndrom critical region Gen 8) besteht (Cai et al., 2004; Han et al., 2004). Dieser Komplex entfernt die 5'-Cap- und 3'-Poly(A)-Strukturen, wodurch die ca. 60-100 Nukleotid lange Vorläufer-miRNA entsteht (= pre-miRNA). Pre-miRNAs besitzen charakteristische 3'-Überhänge, die einer Länge von zwei Nukleotiden entsprechen (Zeng and Cullen, 2003). In einem alternativen Prozess können pre-miRNAs direkt durch Spleißen aus Introns erzeugt werden. Diese Strukturen werden „MiRtrons“ genannt (Berezikov et al., 2007). Die Vorläufer-miRNA wird nun aktiv via Exportin 5 ins Zytoplasma transportiert, wo der nächste Mikroprozessorkomplex an sie bindet (Yi et al., 2003). Dieser Komplex besteht aus der RNase III Dicer und dem Protein TRBP (= immunodeficiency virus transactivating response RNA binding protein) und entfernt die Schleifenstruktur, wodurch ein ca. 22 nt langer miRNA-Doppelstrang mit 2 nt-Überhängen entsteht (Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001).

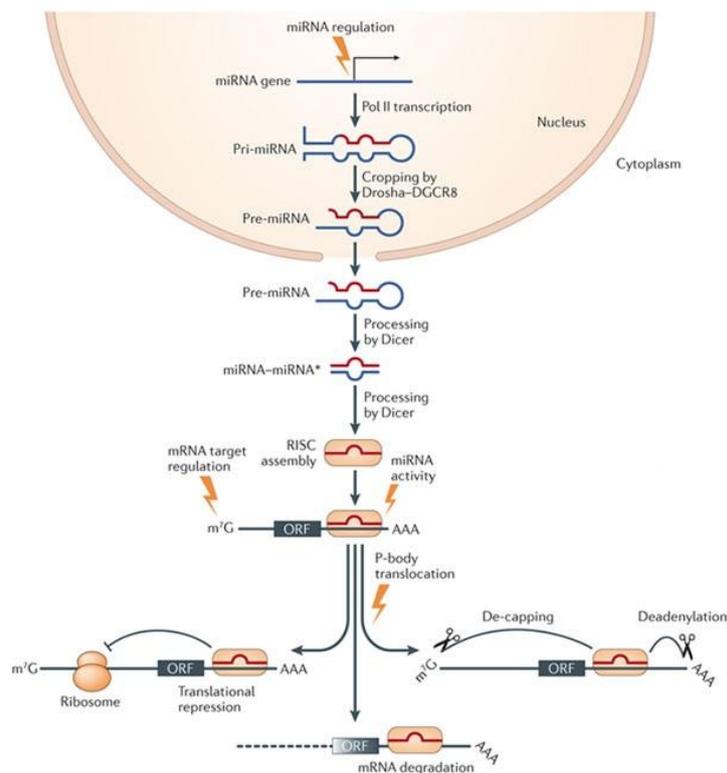


Abbildung 5: microRNA-Biogenese und potenzielle Auswirkungen auf Ziel-mRNAs (modifiziert nach) (van Rooij and Olson, 2012)

Nach Transkription eines miRNA-Gens durch die RNA-Polymerase II im Zellkern wird die pri-miRNA durch Drosha/DGCR8 zum miRNA-Vorläuferprozessiert. Anschließend erfolgt ein GTP-abhängiger, aktiver Export der pre-miRNA durch Exportin 5 in das Zytoplasma der Zelle, wo sie sich einer weiteren Prozessierung durch Dicer/TRBP unterzieht. Von dem entstehenden miRNA-Duplex wird ein Strang in den RISC eingebaut. Die miRNA bindet an Sequenzen einer Zielgen-mRNA, woraufhin schließlich, abhängig von der Komplementarität, die mRNA degradiert oder deadenyliert wird oder es kommt zur Repression der Translation.

Einer der beiden Stränge wird mittels „Argonauteprotein 2“ (= Ago2) in den RISC (= RNA-induced silencing complex) inkorporiert und hybridisiert an mehr oder weniger komplementäre Sequenzen, die sich meist innerhalb der 3' untranslatierten Region (= 3'UTR) von Zielgen-mRNAs (Targets) befinden (Schwarz et al., 2003). Üblicherweise wird die miRNA in den RISC eingebaut, welche am 5'-Ende die schwächere Basenpaarbindung aufweist (Khvorova et al., 2003). Je nachdem, ob die inkorporierte miRNA im Vorläufermolekül am 5'- oder 3'-Ende lokalisiert war, werden die Namen mit -5p bzw. -3p versehen. Bei seltener, absoluter Komplementarität zwischen miRNA und Zielgen-mRNA kommt es zur Degradation der Target-mRNA (Bartel, 2004). Gibt es allerdings Fehlpaarungen, so wird primär die Translation des Zielgens reprimiert (Engels and Hutvagner, 2006). Schließlich führt die Bindung von miRNAs zum Abbau der mRNA. Die Nukleotide 2-8 einer miRNA, die sog. „Seed-Sequenz“, spielt bei diesem Vorgang eine erhebliche Rolle (Lewis et al., 2005). Neben den klassischen Begebenheiten der miRNA-abhängigen, posttranskriptionellen Regulation der Genexpression, werden Fälle beobachtet, in denen miRNAs an Sequenzen innerhalb der 5'-untranslatierten Region von mRNAs binden (Moretti et al., 2010; Zhou and Rigoutsos, 2014). Auch von einer Induktion der Zielgen-Translation konnte berichtet werden (Vasudevan et al., 2007). Kontrovers diskutiert wird eine Theorie, die besagt, dass mRNAs, die bereits aufgrund von miRNA-Bindung nicht translatiert wurden, in sog. P-Bodies transportiert und gelagert werden, um zu einem späteren Zeitpunkt translatiert zu werden (Bhattacharyya et al., 2006; Liu et al., 2005). Aktuell gibt es Hinweise dahingehend, dass nur ein kleiner Teil an reifen miRNAs im RISC assoziiert vorliegt und diese miRNA-beladenen AGO-Komplexe wiederum in „leichte“ und „schwere“ Komplexe unterschieden werden können, abhängig davon, ob sie mRNA binden oder nicht (Flores et al., 2014; La Rocca et al., 2015).

3.3.2 miRNAs und Krebsentstehung

Der erste Anhaltspunkt, dass veränderte Mengen von miRNAs im Zusammenhang mit Tumorigenese stehen könnten, wurde 2002 geliefert (Calin et al., 2002). Anhand von miRNA-Profilen konnte gezeigt werden, dass miRNAs in Tumorgewebe oft abnormal exprimiert werden, wodurch Vorgänge wie Proliferation, Apoptose, Metastasierung und Invasion zum Vorteil des Tumors gelenkt werden können (Cosmopoulos et al., 2009; Hart et al., 2014; Imig et al., 2011; Jansson and Lund, 2012; Pena-Chilet et al., 2014). Darüber hinaus korreliert die genomische Lokalisation von miRNAs oft mit Tumor-assoziierten Regionen, die durch Translokationen, Amplifikationen oder fragilen chromosomalen Abschnitten charakterisiert sind (Ferdin et al., 2010). Erhöhte miRNA-Mengen können auch

durch konstitutiv aktive Promotoren, stärkere Effizienz in der Prozessierung oder erhöhte Stabilität der miRNA zu Stande kommen (Liu et al., 2013). Deregulierte miRNAs können als Tumorsuppressoren oder Onkogene fungieren (Abbildung 6). Während im Normalgewebe Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose durch angemessen exprimierte miRNAs strikt kontrolliert werden, kann eine Reduktion oder Deletion einer Tumorsuppressor-miRNA zu einer erhöhten Expression ihrer Onkoprotein-Targets führen. Das Resultat würde sich in erhöhter Proliferation, Invasivität oder Angiogenese und verminderte Apoptose oder un- bzw. dedifferenziertes Gewebe widerspiegeln, was letztendlich zur Bildung von Tumoren führt. Die Amplifikation oder Überexpression einer onkogenen miRNA (= OnkomiR) kann ebenfalls zur Tumorbildung führen. In diesem Fall würde eine Reduktion der Menge einer oder mehrerer mRNA(s) eine verminderte Expression von Target-Tumorsuppressorproteinen zur Folge haben.

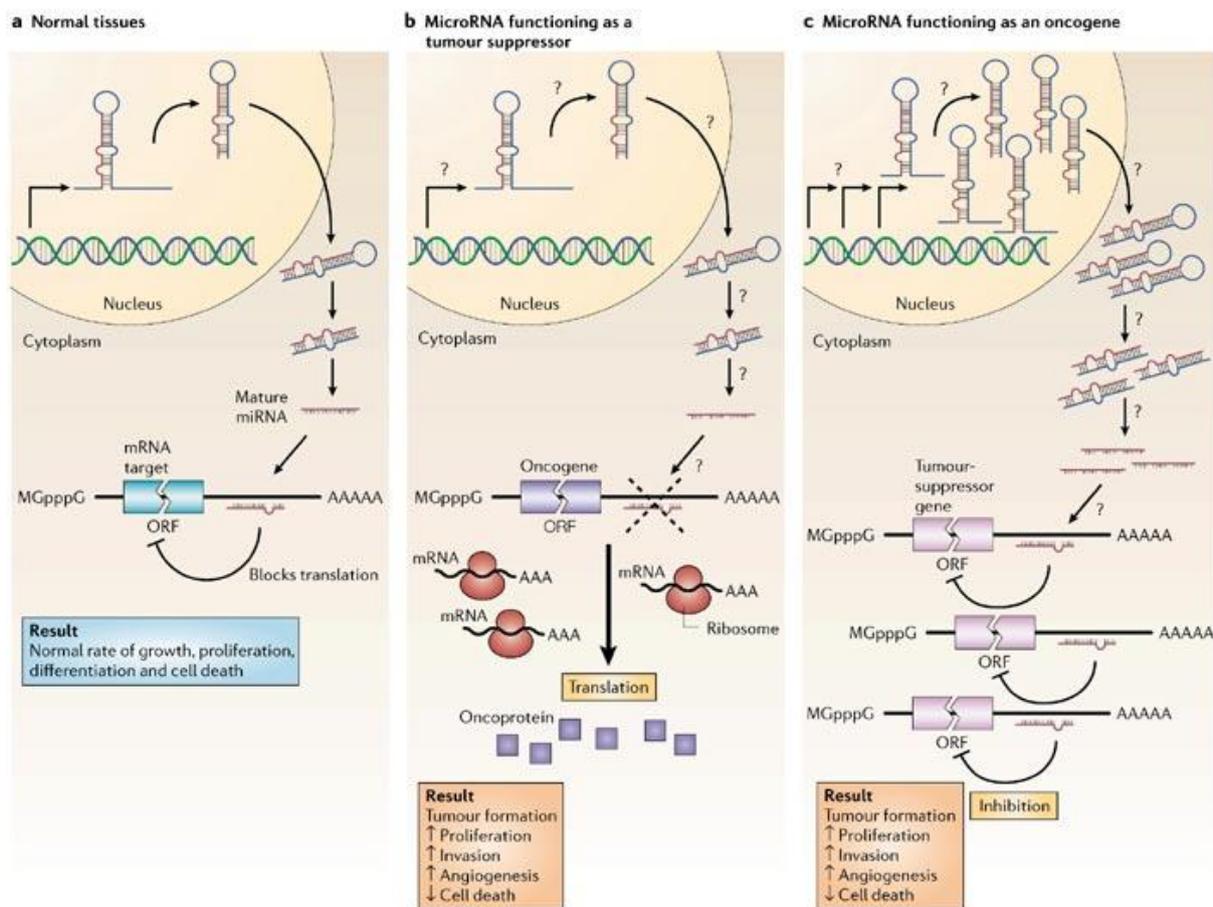


Abbildung 6: Vergleich der miRNA-Funktionen von Tumorsuppressoren und OnkomiRs in unverändertem und transformiertem Gewebe (Esquela-Kerscher and Slack, 2006)

A: Im Normalgewebe kontrollieren miRNAs die physiologischen Raten an Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose. B: Verminderte Mengen von Tumorsuppressor-miRNAs fördern die Karzinogenese aufgrund einer erhöhten Expression von Onkoproteinen. C: Verstärkte Expression von onkogenen miRNAs fördert durch reduzierte Mengen an Tumorsuppressorgen ebenfalls die Karzinogenese.

Bekannte Tumorsuppressoren sind z. B. miR-34 und miRNAs aus dem miR-15a/16- und dem let-7-Cluster. Sie sind in einer Vielzahl an Karzinomen reprimiert (Aqeilan et al., 2010; Garofalo and Croce, 2011; Peter, 2009). Zu den bekanntesten OnkomiRs gehören miR-21, miR-155 und miRNAs aus dem miR-17-92-Cluster, die in vielen Tumoren induziert vorliegen (Chen et al., 2014; Jazbutyte and Thum, 2010; Olive et al., 2010).

3.3.3 EB-virale miRNAs

MiRNAs werden auch von Viren kodiert. Besonders Herpesviren sind für die Expression eigener miRNAs bekannt, aber es wurden auch miRNAs in anderen DNA-Viren, wie z. B. Polyoma-, Baculo-, Asco-, Irido-, und Adenoviren entdeckt (Kincaid and Sullivan, 2012). Auch die Existenz retroviraler miRNAs wird aktuell diskutiert (Bernard et al., 2014; Harwig et al., 2014; Ouellet et al., 2013).

Das Epstein-Barr Virus kodiert für 25 miRNA-Gene, die 44 reife miRNAs generieren. Sie sind in drei Clustern angeordnet (Abbildung 7). BART-miRNAs werden als langes Vorläufermolekül transkribiert und anschließend aus Introns gespleißt (Edwards et al., 2008).

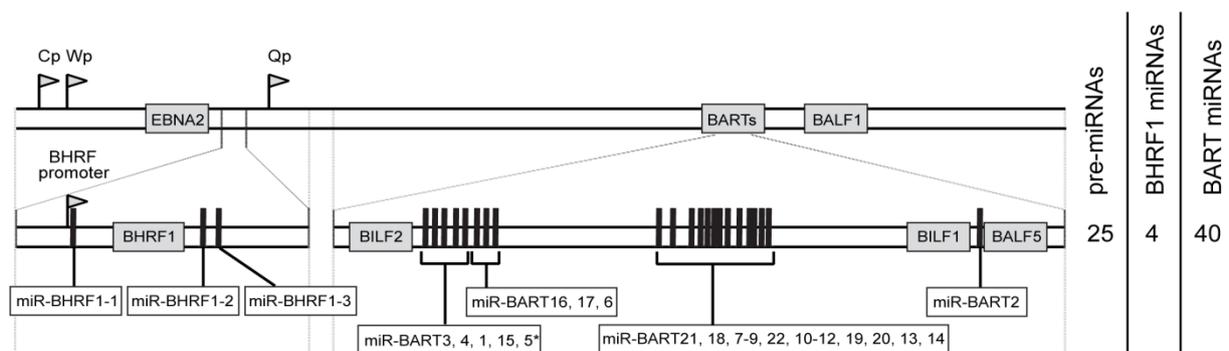


Abbildung 7: Schematische Lokalisation und Anordnung der EBV-miRNAs innerhalb des EBV-Genomes (Referenzstrang AJ507799) (Seto et al., 2010)

Die beiden EB-viralen miRNA-Familien sind in zwei Transkripten, die 25 pre-miRNAs (schwarze Balken) repräsentieren, organisiert und kodieren für vier reife BHRF1 und 40 reife BART miRNAs. Mit Ausnahme von BART2 verteilen sich die EBV-BART-miRNAs in zwei Cluster. Neben miRNAs sind weiterhin die genomischen Lokalisationen des Latenzgens EBNA2, des BCL-2-Homologs BALF1, der viralen Polymerase BALF5 und der BILF1/2-Gene als graue Boxen, sowie EBV-Promotoren als Fähnchen dargestellt.

Die Expression der BHRF1-miRNAs ist stark an den Latenztyp der Wirtszelle gekoppelt. Man findet sie nur in Zellen der Latenz III (Feederle et al., 2011). Auch die Expression der BART-miRNAs variiert abhängig von Latenztyp und zellulärem Kontext. So werden sie in hohen

Mengen von latent infizierten Epithelzellen, aber nur gering in B-Zellen exprimiert (Cai et al., 2006b).

Die Funktion EB-viraler miRNAs ist immer noch nicht vollständig geklärt, obwohl für einige bereits Targets bestätigt werden konnten. So reguliert EBV selbst die Expression seiner Proteine BALF5, LMP1 und LMP2A durch eigene miRNAs. Die Reduktion der viralen Polymerase BALF5 durch ebv-miR-BART2 (Barth et al., 2008) und BZLF1 und BRLF1 durch ebv-miR-BART20-5p verhilft EBV im latenten Zustand zu verbleiben (Jung et al., 2014). LMP1 wird durch ebv-miR-BART9 reprimiert, was zu einer gesteigerten Proliferation führt (Ramakrishnan et al., 2011). Eine Regulation von LMP2A durch ebv-miR-BART22 hat zur Folge, dass EBV-infizierte Zellen nicht mehr von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden, sodass keine Immunantwort in Gang gesetzt wird (Lung et al., 2009). Neben viralen Targets sind für einige EBV-miRNAs auch zelluläre Zielgene bekannt. So reguliert z. B. ebv-miR-BART6-3p PTEN und den IL-6-Rezeptor, wodurch das Zellwachstum von B-Zellen gesteigert wird, was in einer reduzierten NFκB-Signalkaskade resultiert (Ambrosio et al., 2014). EBV verhindert mittels Regulation der Proteine PUMA, CASP3 und TOMM22 durch viruskodierte miRNAs, dass die infizierte Wirtszelle in Apoptose übergeht (Choy et al., 2008; Dolken et al., 2010; Vereide et al., 2014).

3.3.4 Argonaute-Proteine

Argonaute (= Ago)-Proteine wurden ursprünglich im Zusammenhang mit der Entwicklung von Pflanzen und Keimbahn-Stammzellteilung in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben (Bohmert et al., 1998; Lin and Spradling, 1997; Moussian et al., 1998). Ihr Name leitet sich von den „Argonauten“ aus der griechischen Mythologie ab. Sie waren die Reisegefährten des Jason, der sich auf die Suche nach dem Goldenen Vlies begab. Ihr Schiff trug den Namen „Argo“. In Analogie dazu befördern Ago-Proteine die miRNAs zu ihren mRNA-Targets. Das menschliche Genom kodiert für vier Ago-Proteine, die alle in der Lage sind, kleine RNAs zu binden. Sie bestehen aus den folgenden vier Domänen: dem N-Terminus und je einer PAZ-, Mid- und PIWI-Domäne (Hutvagner and Simard, 2008). PAZ-Domänen existieren nur in Dicer- und Ago-Proteinen und binden sequenzspezifisch ssRNA an ihrem 3'-Ende, welches einen 2nt-Überhang besitzen sollte (Lingel et al., 2004; Ma et al., 2004). Die PIWI-Domäne weist eine Sekundärstruktur auf, die Ähnlichkeit mit der katalytischen Domäne der RNaseH-Enzymfamilie besitzt. Tatsächlich besitzt nur humanes Ago2 RNaseH-Aktivität, weshalb das Protein auch unter dem Namen „Slicer“ bekannt ist (Song et al., 2004). Durch die PIWI-Domäne ist es Ago-Proteinen möglich, an eine der RNase III-Domänen von Dicer zu binden (Tahbaz et al., 2004). Die Mid-Domäne ist in der

Lage, die 5'-Capstruktur von mRNAs zu blockieren, wodurch die Initiation der Translation reprimiert wird (Kiriakidou et al., 2007). Ago-Proteine sind darüber hinaus an dem Reifeprozess von miRNAs beteiligt, indem sie den inaktiven miRNA-Strang, der eine geringere 5'-Stabilität aufweist, eliminieren (Khvorova et al., 2003; Matranga et al., 2005; Schwarz et al., 2003; Shin, 2008). Im Folgenden werden die Funktionen der Argonaute-Proteine im Einzelnen aufgeführt.

Ago1 ist ein nicht-katalytisches Protein, d. h. es ist alleine nicht in der Lage, RNA zu schneiden. Dies ist auf eine alternative Aminosäuresequenz im aktiven Zentrum zurückzuführen. Hier befindet sich ein Arginin anstelle eines Histidins, welches im Ago2 die katalytische DEDH-Tetrad komplettiert (Faehnle et al., 2013). Ago1-abhängiges transkriptionelles Gensilencing ist im Zellkern dennoch durch die Assoziation von Ago1, im Komplex mit der RNA-Polymerase II und Dicer, an aktiv transkribierte Gene möglich (White et al., 2014). Folglich bindet Ago1 auch an Promoter- und Enhancersequenzen (Allo et al., 2014; Huang et al., 2013; Janowski et al., 2006). Eine Beladung mit miRNAs ist dennoch möglich, auch wenn bislang noch nicht geklärt wurde, wie die Verteilung der miRNAs auf verschiedene Argonaute-Proteine von Statten geht (Turchinovich and Burwinkel, 2012). Ein Hinweis auf die differenzielle Beladung wird in einer kürzlich veröffentlichten Studie geliefert, in der miRNAs, die an ihrem 3'-Ende ein Adenosin tragen, vorrangig auf Ago1 beladen werden, wohingegen miRNAs, mit einem 3'-terminalen Uridin präferenziell an Ago2 binden (Polikepahad and Corry, 2013). Neben miRNAs ist auch eine Bindung kleiner EBV-RNAs bekannt (Yamakawa et al., 2014). Darüber hinaus wird Ago1 eine Rolle während des alternativen Spleißens zugesprochen (Allo et al., 2014; Ameyar-Zazoua et al., 2012). Eine Überexpression von Ago1 in Neuroblastomzellen verlangsamt den Zellzyklus und lässt eine tumorsuppressive Eigenschaft für Ago1 vermuten (Parisi et al., 2011).

Im Gegensatz zu allen anderen humanen Argonaute-Proteinen besitzt Ago2 aufgrund seiner katalytischen Triade Slicer-Aktivität und ist in der Lage, Target-mRNAs an miRNA-Bindestellen zu zerschneiden (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004). Des Weiteren wurde für Ago2 eine Rolle in der DNA-Reparatur bestätigt (Gao et al., 2014). Für embryonale Entwicklung scheint Ago2 ebenfalls essenziell zu sein (Tam et al., 2008).

Über Ago3 und Ago4 ist bislang nur wenig bekannt. So kann Ago3 einen Zellzyklusarrest in embryonalen Stammzellen induzieren (Hu et al., 2012). Im Zusammenhang mit miRNAs kann Ago3 das Verhältnis zwischen dem miRNA-Guide- und -Passengerstrang in der Expression und Aktivität beeinflussen (Winter and Diederichs, 2013). Für Ago4 wurde publiziert, dass es in Mäusen den Eintritt in die Meiose reguliert (Modzelewski et al., 2012).

3.4 Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit

Das Epstein-Barr Virus spielt bei einer Vielzahl an Tumoren eine wichtige Rolle. Unter anderem ist sein onkogenes Potenzial auf die von ihm selbst kodierten miRNAs zurückzuführen. Auch die Fähigkeit, die Expression von Wirts-miRNAs zu variieren, wurde bereits vielerorts bestätigt. Neben miRNA-Profilen von EBV-assoziierten Burkitt Lymphomen, Nasopharynxkarzinomen und diffus großzelligen B-Zelllymphomen, wurde mittels Hochdurchsatzsequenzierung vor kurzem ein miRNA Profil von nasalen NK/T-Zell Lymphomen angefertigt. Die miRNA-Expressionen von zwei NKTL-Gewebeproben wurden mit den Profilen von Thymusgewebe und EBV-negativen T-Zelllymphomen verglichen. Es stellte sich heraus, dass sich weder Thymus noch EBV-negative T-Zelllymphome als korrespondierendes Kontrollgewebe eigneten (Motsch et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher eine erneute Hochdurchsatzsequenzierung durchgeführt und ausgewertet werden, in der primäre, aus Lymphozytenkonzentraten isolierte, nicht-transformierte, CD56⁺CD3⁺ NK/T-Zellen das Normalgewebe zu EBV-assoziierten NKTL darstellen. Aus Mangel an primärem NKTL-Tumormaterial wurde auf die zwei EBV-infizierten Zelllinien SNK6 und SNT16 zurückgegriffen, welche aus nasalen NK/T-Zelllymphomen etabliert wurden und den Phänotyp von NK- bzw. T-Zellen aufweisen. Für deregulierte zelluläre bzw. EB-virale miRNAs sollten Zielgene identifiziert werden, um den Beitrag dieser miRNAs zur Tumorentstehung zu charakterisieren. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich weiterhin auf die beiden EBV-kodierten, nicht-proteinogenen RNAs EBER1 und EBER2. Die Existenz kürzerer EBER1/2-Fragmente sollte bestätigt und ihre Funktion ermittelt werden.

4 Material

4.1 Geräte

Belichter	810-UNV Image Eraser Light Box (Amersham Biosciences)
Dounce-Homogenisator	28S CC (B. Braun Melsungen AG)
Elektrophorese-Netzgeräte	Consort EV-231 (Consort bvba) Phero Stab. 300 (Biotec Fisher)
Heizschüttler	Thermomixer Compact (Eppendorf)
Hybridisierungsöfen	UM 400B Hyb (Bachhofer)
Luminometer	Lumat LB 9501 (Berthold Technologies)
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Victor X™ (Perkin Elmer)
PCR-Maschinen	Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research) LightCycler® 1.5 (Roche Diagnostics)
Phosphoimager	Phosphoimager™-Typhoon mit Exponierplatten und - kassetten (Molecular Dynamics, Amersham)
Photometer	NanoDrop™ 2000c (Peqlab) UltraSpec 3100pro (Amersham Biosciences)
Plattformschüttler taumelnd	POLYMAX 1040 (Heidolph)
Reagenzglasschüttler	REAX 2000 (Heidolph)
Semi-Dry Blotter	2117 Multiphor (LKB Bromma)
Tank-Blotkammer	2005 Transphor Electro Blotting Unit (LKB Bromma)

Überkopfschüttler	REAX 2 (Heidolph)
Ultraschallgerät	Sonifier 250 (Branson)
UV-Dokumentation	ChemiDoc™ XRS+ (Biorad)
Zentrifugen	Megafuge 1,0 R mit Kühlung (Heraeus) 202 MK Tischzentrifuge mit Kühlung (Sigma)

4.2 Chemikalien, Membranen, Filter, Säulen

Acrylamid	Roth
Agarose NCEO UltraQualität	Roth
Ammoniumpersulfat	Serva
Ampicillin	Bayer
Bactoagar	DIFCO
Bisacrylamd	Roth
Blockreagenz	Boehringer
Bromphenolblau	Serva
cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics
Denhardt's Solution 50x	Sigma
Diethylpyrocarbonat	Sigma
EDTA	Serva
Ethidiumbromid	Roth
Fötale Kälberserum	Sigma
Gamma UT ³² P (3000 Ci/mol)	Hartmann Analytics
Glycin	Serva

Hybond™-N-Membran	Amersham Biosciences
Hyperfilm ECL™	Amersham Biosciences
Isopropylthiogalactosid	Novagen
Luria Broth-Agar (GIBCO)	Becton Dickinson
Luria Broth Base (GIBCO)	Becton Dickinson
Magermilchpulver	Töpfer
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Serva
Natriumdodecylsulfat	Serva
NucleoBond®	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract™	Macherey-Nagel
Nukleotide (dNTP)	Peqlab
Nukleotide (NTP)	Invitrogen
PeqGOLD TriFast™	Peqlab
Penicillin/Streptavidin	GE Healthcare
PolyFect	Qiagen
Protran™ Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell (Whatman)
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	Tetenal Europe GmbH
Röntgen-Fixier-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
SequaGel UreaGel System	National Diagnostics
Tris-Base	Serva
Triton X-100	Serva
Trypsin/EDTA	GE Healthcare
Tween20	Serva
Zellulosefilter	Schleicher & Schuell (Whatman)

Chemikalien, die hier nicht aufgeführt wurden, stammten von den Firmen Merck, Roth und Sigma-Aldrich in analysereiner Form.

4.3 Puffer und Lösungen

Amidoschwarz-Färbelösung	Isopropanol	25,0% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
	Amidoschwarz	0,1% (w/v)
Blaumarker	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Glycerol	50% (v/v)
	EDTA	50 mM
Blockingpuffer	Magermilchpulver in PBS	5% (w/v)
Crosslinkreagenz	Methylimidazol	245 µl
	EDC-Hydrochlorid	0,75 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 24 ml
50x Denhardt's Lösung (Sigma)	Albumin fraction V	1%
	Ficoll 400	1%
	Polyvinylpyrrolidon K30	1%

dNTPs	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 10 mM
Dounce-Puffer A	HEPES 1M pH 7,9 KCl 1M MgCl ₂ 1M H ₂ O _{bidest.}	5 ml 5 ml 750 µl ad 500 ml
Zum Gebrauch:	10ml Puffer A + 50µl 1M DTT + 50µl 0,1M PEFA	
Dounce-Puffer B	HEPES 1M pH 7,9 NaCl 5M MgCl ₂ 1M EDTA 0,5M pH 8,5 Glycerol H ₂ O _{bidest.}	10 ml 42 ml 750 µl 200 µl 110 ml ad 500 ml
Zum Gebrauch:	10ml Puffer B + 50µl 1M DTT + 50µl 0,1M PEFA	
ECL-Lösung A	Luminol in DMSO	250 mM
ECL-Lösung B	p-Coumarsäure in DMSO	90 mM
ECL-Lösung C	Tris/HCl pH 8,5	1 M

ECL-Gebrauchslösung	Lösung A	2,5 ml
	Lösung B	1,113 ml
	Lösung C	25 ml
	H ₂ O _{bidest.}	ad 250 ml
ELISA-Reganzverdünner	BSA in PBS	1%
ELISA-Substratlösung	TMB	0,1 mg/ml
	Zitronensäure	24 mM
	Na ₂ HPO ₄	51 mM
	H ₂ O ₂	0,006%
ELISA-Stopplösung	H ₂ SO ₄	1 M
ELISA-Waschpuffer	Tween® 20 in PBS	0,05%
Entfärbelösung	Isopropanol	10% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
Ethidiumbromid-Färbelösung	Ethidiumbromid in H ₂ O	10 mg/ml

Hybridisierungspuffer	20xSSC	7,5 ml
	1 M Na ₂ HPO ₄	0,6 ml
	10%SDS	21,0 ml
	50x Denhardt´s Solution	0,6 ml
	Blockreagenz	wenige mg
IP-Lysepuffer	Tris/HCl pH 7,4	25 mM
	KCl	150 mM
	EDTA	2 mM
	IGEPAL	0,5%
Zum Gebrauch:	1 Tablette cComplete mini (Roche) Protease-Inhibitor-Cocktail in 10ml IP-Lysepuffer auflösen.	
IP-Waschpuffer:	Tris/HCl pH 7,4	50 mM
	KCl	400 mM
	MgCl ₂	1 mM
	IGEPAL	0,5 %
MgCl ₂	(2M) MgCl ₂ x 6H ₂ O	20,33 g (1M)
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	24,65 g (1M)
	H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
	Sterilfiltrieren	

5x MSE	1M MOPS	200 ml
	0,3M NAAc	16,7 ml
	0,5M EDTA	10 ml
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
PBS	NaCl	140 mM
	KCl	25 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
	CaCl ₂	1 mM
	Na-K-Phosphat	10 mM
PBS zur Zellkultur (ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺)	NaCl	8,0 g/l
	KCl	0,2 g/l
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,9 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
	pH 7,4	
10x PCR-Reaktionspuffer (Sigma)	KCl	500 mM
	Tris/HCl pH 8,3	100 mM
	Gelatine	1 mg/ml

Puffer N2	Tris	100 mM
(Macherey-Nagel)	Ethanol	15% (v/v)
	KCl	900 mM
	Triton X-100	0,15% (v/v)
	pH 6,3 mit H ₃ PO ₄	
Puffer N3	Tris	100 mM
(Macherey-Nagel)	Ethanol	15% (v/v)
	KCl	1,15 M
	pH 6,3 mit H ₃ PO ₄	
Puffer N5	Tris	100 mM
(Macherey-Nagel)	Ethanol	15% (v/v)
	KCl	1 M
	pH 8,5 mit H ₃ PO ₄	
RNA-Ladepuffer II	Formamid	750 µl
	5x MSE	150 µl
	Formaldehyd	240 µl
	50% Glycerol	200 µl
	Bromphenolblau	eine Prise
	Xylen-Cyanol FF	eine Prise
	H ₂ O _{bidest.}	160 µl

Puffer S1	Tris/HCl	50 mM
(Macherey-Nagel)	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
	pH 8,0	
Puffer S2	NaOH	200 mM
(Macherey-Nagel)	SDS	1% (w/v)
Puffer S3	Kaliumacetat	2,8 M
(Macherey-Nagel)	pH 5,1	
Sammelgelstock	Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
	SDS	0,4% (w/v)
2x Sample Buffer (SB)	Tris/HCL pH6,8	130 mM
	SDS	6% (w/v)
	3-Mercapto-1,2-propandiol	10% (v/v)
	Glycerol	10% (w/v)
SDS-Gel-Laufpuffer	Glycin	192 mM
(nach Towbin)	SDS	0,1% (w/v)
	Tris	25 mM

SOB-Medium	Trypton	20,0 g
	Hefe-Extrakt	5,0 g
	NaCl	0,6 g
	KCl	0,5 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
	autoklavieren	
	Zugabe von 20 mM MgCl ₂ direkt vor Gebrauch	
20x SSC	NaCl	3 M
	tri-Natriumcitrat-2-hydrat	0,3 M
STET-Puffer	Tris/HCL pH 8,0	10 mM
	EDTA pH 8,0	50 mM
	Triton X-100	0,5% (v/v)
	Saccharose	8% (w/v)
	Zugabe von 0,5 mg/ml Lysozym direkt vor Gebrauch	
Stripping-Puffer	Tris/HCL pH 8	0,05 M
	EDTA	0,2 M
	Natrium-Pyrophosphat	0,05% (v/v)
	Denhardt's-Lösung	0,1x

10x T4-Ligasepuffer	ATP	10 mM
(New England Biolabs)	MgCl ₂	50 mM
	DTT	10 mM
	Tris/HCl pH 7,5	660 mM
50x TAE-Puffer	Tris	2 M
	Natriumacetat	25 mM
	EDTA	0,5 M
	pH 7,8 mit Essigsäure	
TBE-Puffer	Tris	89 mM
	Borsäure	89 mM
	EDTA	2 mM
TE-Puffer	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM
	pH 7,6 mit Essigsäure	
Transferpuffer	Tris	25 mM
(nach Towbin)	Glycin	192 mM
	Methanol	20% (v/v)
	SDS	0,05% (w/v)

Transformationslösung 1	RbCl	0,10 M
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,05 M
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,01 M
	CH ₃ COOH (pH7)	0,03 M
	Glycerol	15,0% (v/v)
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
	sterilfiltrieren	
	pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure	
Transformationslösung 2	MOPS (pH 6,8)	0,500 M
	RbCl	0,010 M
	CaCl ₂ ·H ₂ O	0,075 M
	Glycerol	15% (v/v)
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
	Sterilfiltrieren	
Trenngelstock	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
	SDS	0,4% (w/v)
Trypanblau-Lösung	Trypanblau in PBS	1%
Waschpuffer 1 (Hochsalzpuffer)	SSC	5x
	SDS	1%

Waschpuffer 2	SSC	1x
(Niedrigsalzpuffer)	SDS	1%

4.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche
DNaseI (amplification grade)	Invitrogen
<i>Klenow</i> Fragment	Fermentas
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Sigma-Aldrich
<i>Phusion</i> ® High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
T7-RNA-Polymerase	New England Biolabs
<i>Taq</i> -Polymerase	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	GE Healthcare

4.5 Größen- und Molekulargewichtsstandards

4.5.1 DNA-Größenstandards

Linearen DNA-Fragmenten, die mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, konnte ihre Größe mit Hilfe der 1kb Plus DNA-Leiter (Life Technologies, ehemals Invitrogen) (Abbildung 8.) zugewiesen werden, welche Fragmentgrößen von 100 bis 12.000 Basenpaaren verbildlicht.

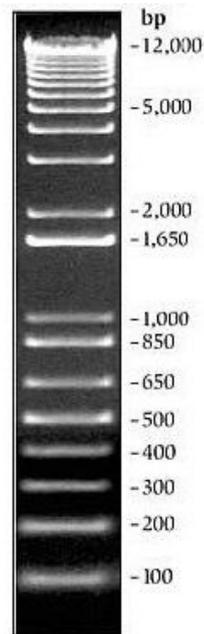


Abbildung 8: 1kb Plus DNA-Leiter zur Größenbestimmung linearisierter, aufgetrennter DNA-Fragmente zwischen 100 bp und 12 kbp (Quelle: www.lifetechnologies.com)

Im Laufe der Experimente für diese Arbeit ist das Labor auf eine günstigere Alternative umgestiegen. Die 2-log DNA-Leiter (New England Biolabs) umfasst Fragmentgrößen von 100 bis 10.000 Basenpaaren (Abbildung 9.).

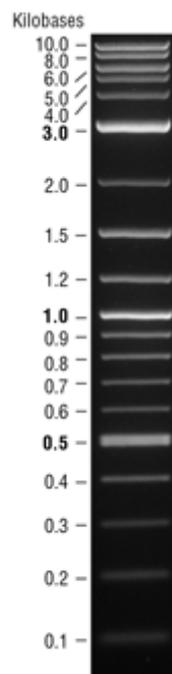


Abbildung 9: Die 2-log DNA-Leiter (New England Biolabs) enthält DNA-Fragmente zwischen 100 bp und 10 kbp (Quelle: www.neb.com)

4.5.2 Protein-Molekulargewichtsmarker

Das Molekulargewicht von Proteinen, die bei einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden, konnte mit Hilfe von zwei Größenstandards abgeschätzt werden. Der „Low Molecular Weight“-Marker enthält folgende Proteine (von Sigma-Aldrich bezogen):

Tabelle 2: Protein-Bestandteile des "LMW"-Molekulargewichtsmarker für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

Protein	Molekulargewicht [kDa]	Konzentration [mg/ml]
Phosphorylase b	94	0,5
Kälber-Serumalbumin	67	0,7
Ovalbumin	43	1,0
Carboanhydrase	30	0,5
Trypsin-inhibitor (aus Sojabohnen)	20,1	1,0
Lactalbumin	14,4	0,5

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen, welche größer als 94 kDa waren, wurde die „ColorPlus™ Prestained Protein Ladder“ verwendet (Abbildung 10A).

Im Zuge der Experimente für diese Arbeit wurde vom Hersteller eine neue Version auf den Markt gebracht (Abbildung 10B). Der „Color Protein Standard, Broad Range“ erlaubt eine Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen von 11 bis 245 kDa und ersetzte von nun an die „ColorPlus™ Prestained Protein Ladder“.

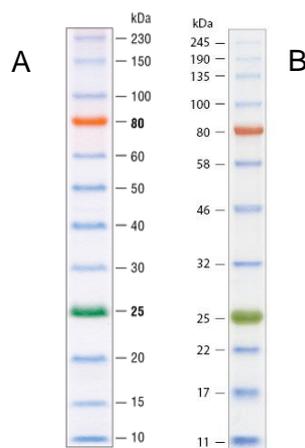


Abbildung 10: A: ColorPlus™ Prestained Protein Ladder zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen zwischen 10 und 230 kDa, die vom Hersteller durch den Color Protein Standard, Broad Range (B) ersetzt wurde (Quelle www.neb.com).

4.6 Antikörper

4.6.1 Primäre Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Primärantikörper, die gegen humane Proteine gerichtet sind, eingesetzt:

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primärantikörper

<u>Primär-antikörper</u>	<u>mono-/polyklonal</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Name/Klon</u>	<u>Organismus</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>in</u>
α -Ago1	monoklonal	Dr. Elisabeth Kremmer (München)	4B8	Ratte	5 μ g (IP) 1:3000 (WB)	TBS-T
α -EBNA2	monoklonal	Dr. Elisabeth Kremmer (München)	R3	Ratte	5 μ g (IP) 1:3000 (WB)	PBS
α -beta-Aktin	monoklonal	Sigma-Aldrich	AC-74	Maus	1:5000 (WB)	PBS
α -CUL5	polyklonal	Santa Cruz	H-300	Kaninchen	1:200 (WB)	TBS-T
α -GAPDH	monoklonal	Cell Signalling	14C10	Kaninchen	1:5000 (WB)	PBS
α -S1PR1	polyklonal	Santa Cruz	H-60	Kaninchen	1:200 (WB)	PBS-T
La Antiserum	/	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gunter Meister (Regensburg)	/	Kaninchen	1:1000 (WB)	PBS

4.6.2 Sekundäre Antikörper

Die verwendeten Sekundärantikörper waren mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. α -Kaninchen-pox, α -Maus-pox und α -Ratte-pox wurden in der Verdünnung 1:5000 eingesetzt.

4.7 Zelllinien

4.7.1 Adhärenzte Zelllinien

- 293T: Diese Zelllinie lässt sich auf die humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie „HEK-293“ zurückführen. Sie wurde durch Transformation mit dem humanen Adenovirus 5 immortalisiert (Graham et al., 1977) und exprimiert konstitutiv das große T-Antigen des SV40. Daher wird die Expression episomaler Plasmide, die einen SV40-Replikationsursprung beinhalten, in hohem Maße gewährleistet (Shein et al., 1962; Zur Hausen, 1967).
- HaCat: Die humane Keratinozyten-Zelllinie stammt aus histologisch normaler Haut, die sich *in vitro* spontan immortalisierte (Boukamp et al., 1988).

4.7.2 Zelllinien in Suspension

- BL-41: Eine EBV-negative B-Zelllinie, die aus Burkitt-Lymphom-Gewebe etabliert wurde (Lenoir et al., 1985).
- B95.8: Die *in vitro* EBV-immortalisierte, lymphoblastoide B-Zelllinie stammt aus einem Krallenaffen und wurde mit dem Typ I-Virus eines Patienten mit Infektiöser Mononukleose infiziert (Miller and Lipman, 1973).
- DG-75: Diese Zelllinie stammt aus einem Burkitt-Lymphom, ist aber EBV-negativ (Ben-Bassat et al., 1977).
- P3HR1: Eine Zelllinie, die aus einem EBV-Typ II positiven Burkitt-Lymphom etabliert wurde. Es handelt sich hierbei um eine Subzelllinie von „Jijoye“-Zellen, allerdings produzieren sie nicht-immortalisierende Viren, die im Bereich EBNA-LP/EBNA2 deletiert sind (Hinuma et al., 1967).
- Raji: Auch diese EBV-positive Zelllinie stammt aus einem EBV-Typ I Burkitt-Lymphom (Pulvertaft, 1965). Sie produzieren keinerlei Viruspartikel. Außerdem weisen die Zellen eine Deletion im EBNA3C-Lokus und eine Chromosomentranslokation auf (t(8;14)) (Epstein et al., 1966).

- SNT16: Eine EBV-Typ II-positive NK/T-Zelllinie mit dem Phänotyp von T-Zellen (Zhang et al., 2003). (Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Martin Rowe, Universität Birmingham).
- SNK6: Die EBV-positive NK/T-Zelllinie stammt aus einem primären nasalen NK/T-Zelllymphoma und weist einen NK-Zell-Phänotyp auf (Nagata et al., 2001).
- U2932: Eine EBV-negative DLB-Zelllinie aus Material eines Patienten mit Hodgkinlymphom-Rezidiv (Amini et al., 2002).
- U2932-cl3: Ein Subklon, welcher sich von der EBV-negativen Zelllinie „U2932“ ableitet. Diese wurden nachträglich mit einem EBV-GFP-Virus infiziert.
- LCL AM 29: Eine *in vitro* mit Wildtyp-EBV transformierte Lymphoblastoid-Zelllinie (Swaminathan et al., 1991).
- LCL AM 58: Eine *in vitro* mit rekombinantem EBV transformierte Lymphoblastoid-Zelllinie, die eine Deletion der EBER1/2-RNAs aufweist (Swaminathan et al., 1991). Beide LCL AM-Zelllinien wurden freundlicherweise von Sankar Swaminathan zur Verfügung gestellt.

4.8 Bakterienstämme

- E. coli*pMOSBlue: Ein *E. coli*-Stamm, welcher bei der Klonierung zur Vermehrung rekombinanter DNA eingesetzt wurde. Außerdem ist mit dem Bakterienstamm, der aus dem „pMOSBlueT-Vector-Kit“ (Amersham) stammt, ein Blau-Weiß-Screening möglich.

4.9 Nähr- und Kulturmedien

4.9.1 Kulturmedien für Säugerzellen

4.9.1.1 Kulturmedium für adhärente Zelllinien

Zur Stammhaltung der adhärenenten 293T-Zellen wurde „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (GE Healthcare) verwendet, welches zuvor mit 10% hitzeinaktiviertem, fötalen Kälberserum und einer Antibiotikum-Mixtur, bestehend aus 40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Monoral, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat, versetzt wurde.

4.9.1.2 Kulturmedium für Suspensions-Zelllinien

Zur Kultivierung der in Suspension gehaltenen Zelllinien BL-41, B95.8, DG-75, P3HR1, Raji, U2932, LCL AM 29 und LCL AM 58 wurde RPMI („Roswell Park Memorial Institute“) 1640 (Sigma-Aldrich) verwendet. Weiterhin wurde dem Medium zuvor 10% hitzeinaktiviertes, fötales Kälberserum, sowie Antibiotikum-Mixtur (vgl. 4.9.1.1) hinzugefügt.

Zur fortlaufenden Selektion der EBV-positiven U2932-cl3-Zellen wurde dem Medium bei jeder Passage 200 mg/ml G418 (Invitrogen) zugefügt.

Das RPMI-Medium der NK/T-Zelllinien SNK6 und SNT16 benötigte 5% humanes Plasma, 1% Natriumpyruvat, 1% L-Alanyl-Glutamin und 0.5% Penicillin/Streptomycin (GE Healthcare). Außerdem wurde bei jedem Passagieren frisch 10^6 U/ml rekombinantes IL-2 (Novartis) und Oxalessigsäure im Verhältnis 1:2000 zum Medium hinzugegeben.

4.9.2 Kulturmedium für Bakterien

*E. coli*pMOSBlue-Bakterien wurden in 2,5% (w/v) autoklaviertem Luria Broth Base-Medium (GIBCO) kultiviert. Der Ausstrich der Bakterien erfolgte auf LB-Agarplatten, welche aus 3,75% (w/v) Luria's Agar (GIBCO) 0,1% (v/v) Ampicillin (Ratiopharm) bestanden, womit die Selektion transformierter Bakterien gewährleistet wurde. Der autoklavierte Agar wurde mit Ampicillin versetzt, in Petrischalen gegossen und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

4.10 Vektoren

4.10.1 pGEM-T

Der pGEM®-T-Vektor (Promega) wurde zur Klonierung verwendet. Durch Verdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* entsteht ein linearisierter pGEM-5Zf(+). Zusätzlich wird je ein 3'-terminales Thymidin ligiert, welches einerseits die Rezirkularisierung des Vektors verhindern soll, andererseits aber das direkte Einfügen von PCR-Produkten gewährleistet, die über Adenosin-Überhänge verfügen. Die Multiple-Cloning-Site (MCS) des pGEM-T®-Vektors enthält zahlreiche Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme und wird von einem T7- und einem SP6-Promoter flankiert. Zur Blau-Weiß-Selektion wird einerseits das β -Lactamase-Gen, welches die Ampicillin-Resistenz vermittelt, andererseits auch das β -Galaktosidase-Gen benötigt. Da die MCS des Vektors innerhalb des β -Galaktosidasegens liegt, wird dieses durch Insertion eines PCR-Produktes zerstört, woraufhin kein funktionales Enzym gebildet werden kann, welches das Galaktosid X-Gal zu einem blauen Farbstoff modifiziert. Positive Klone bleiben somit weiß.

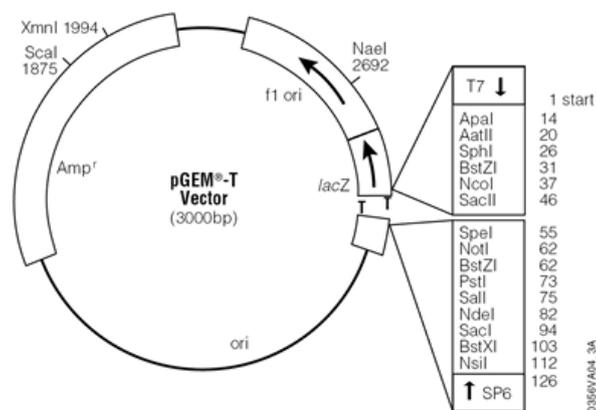


Abbildung 11: Karte des pGEM®-T-Vektors zur Zwischenklonierung von PCR-Fragmenten mit Adenosin-Überhängen (Quelle: Promega)

4.10.2 pMIR-RNLTK

Der eukaryotische Vektor pMIR-RNLTK wurde zur Analyse von miRNA-Effekten auf Zielgene herangezogen. Hierfür musste die 3' untranslatierte Region (3'UTR) der mRNA eines Zielgens hinter das Gen kloniert werden, welches die Glühwürmchen (Firefly)-Luciferase

kodiert. Ausgehend von dem Originalvektor pMIR-REPORT™ (Ambion) wurde der Vektor durch die Arbeitsgruppe Meister (Max-Planck-Institut, Martinsried) dahingehend modifiziert, dass zusätzlich das Gen für die Oktokorallen-Luciferase (Renilla) unter die Kontrolle des TK-Promoters eingefügt wurde. Diese Modifikation ermöglicht obendrein eine interne Normalisierung, welche unterschiedliche Transfektionseffizienzen in den Proben ausgleicht.

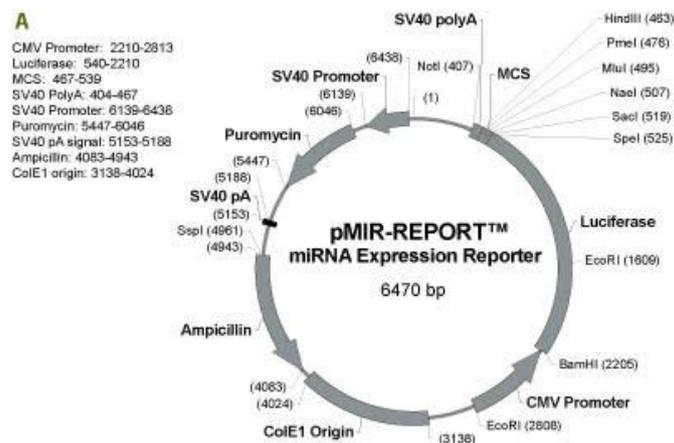


Abbildung 12: Vektorkarte des pMIR-REPORT™ (Ambion) zur Analyse von miRNA-Effekten auf 3'UTRs von Zielgen-mRNAs (Quelle: Lifetechnologies)

4.10.3 pSG5

Der eukaryotische Vektor pSG5 (Stratagene) ist ein high-copy Expressionsplasmid, das für *in vitro* und *in vivo* Expressionen geeignet ist. Zur Expression *in vivo* trägt der Vektor ein β -Globin-Intron, ein SV40-Polyadenylierungssignal, sowie einen SV40-Promoter. Außerdem erleichtert der T7-Promoter die Transkription *in vitro*. Darüber hinaus ist das Gen für Ampicillin-Resistenz und ein prokaryotischer Replikationsursprung (pUC ori) vorhanden, welcher die Selektion transformierter Bakterien und die autonome Replikation in Bakterien ermöglicht, sowie einen weiteren Replikationsursprung aus dem Phagen f1 (f1 ori), der die Synthese von einzelsträngiger DNA gewährleistet. Die Klonierung von DNA erfolgt über die Restriktionsstellen *EcoRI*, *BamHI* und *BglII*.

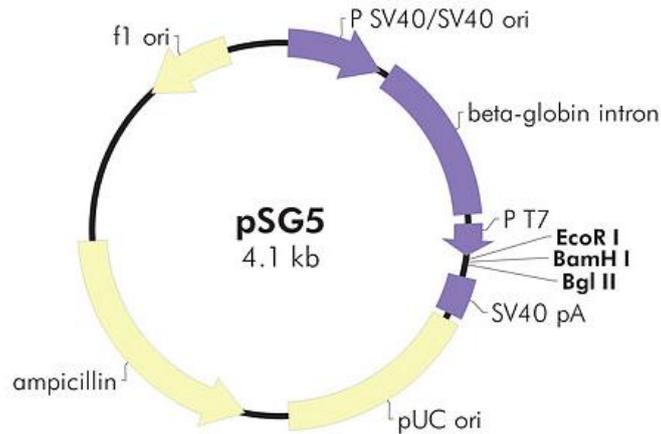


Abbildung 13: Vektorkarte des pSG5-Expressionsvektors (Quelle: Agilent Technologies)

4.10.4 pVP5

Der pVP5-Vektor basiert auf dem pIRESneo1-Expressionsvektor (Clontech), welcher zusätzlich eine Kozaksequenz und je ein nachstehendes FLAG- und HA-Tag, trägt. Die Tags wurden mittels *EcoRV* und *NheI* in die MCS einkloniert.

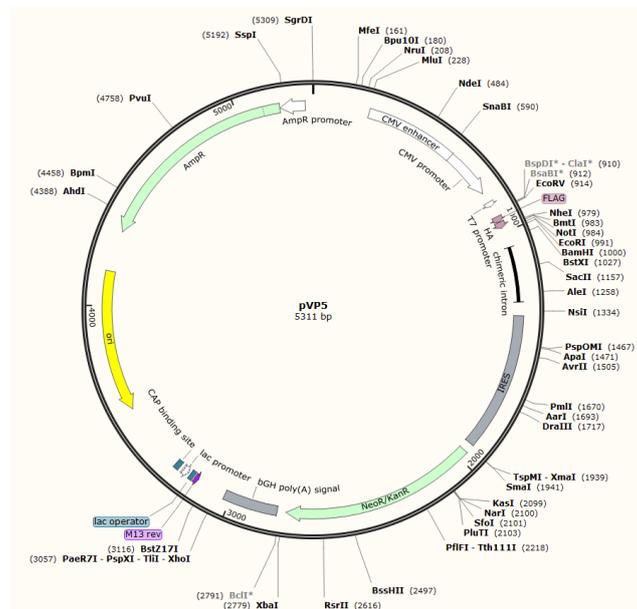


Abbildung 14: Schematische Karte des Expressionsvektors pVP5 (erstellt mit "Snappene Viewer")

Das Konstrukt pVP5-Ago1 wurde von Prof. Dr. Gunter Meister (Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt und kodiert für den offenen Leserahmen des humanen Argonaute 1-Proteins.

4.10.5 MicroRNA-Expressionsplasmide

In dieser Arbeit wurden sowohl humane als auch virale miRNA-Expressionsplasmide verwendet. Die humanen miRNA-Expressionsplasmide wurden aus genomischer, humaner DNA, die aus Blutproben isoliert wurde, EBV-miRNAs aus M-ABA-DNA amplifiziert. Die zu klonierenden Fragmente umfassten die Sequenz des jeweiligen miRNA-Vorläufers, allerdings mit mindestens 100 zusätzlichen Basenpaaren jeweils in 5'- und 3'-Richtung. Diese Erweiterung der eigentlichen miRNA-Sequenz gewährleistet die korrekte Prozessierung zur reifen miRNA. Alle verwendeten miRNA-Expressionsplasmide wurden von ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Grässer hergestellt und bereits, zum Teil mehrfach, in vorhergehenden Dissertationen sowie Publikationen verwendet:

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten miRNA-Expressionsplasmide

miRNA-Expressionsplasmid	Restriktions-Schnittstellen	Fragmentgröße
pSG5-miR-142	<i>EcoRI</i>	314 bp
	<i>BamHI</i>	
pSG5-miR-148a	<i>EcoRI</i>	493 bp
	<i>BamHI</i>	
pSG5-BART-16	<i>EcoRI</i>	177 bp
	<i>BamHI</i>	

4.10.6 EBER1/2-Expressionsplasmid

Neben miRNAs wurden auch Fragmente in den pSG5-Vektor kloniert, die für die EBER-Sequenzen kodieren. Es wurde ein 488bp großes Fragment aus Raji-Gesamt-DNA amplifiziert, welches für beide EBER-RNAs kodiert und mit Hilfe der Restriktions-Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* in die MCS des pSG5-Vektors kloniert. Somit können mit nur einem Vektor beide EBER-RNAs exprimiert werden. Die Klonierung des pSG5-EBER1/2-Konstrukts wurde von Linda Schlegel im Rahmen ihrer Diplomarbeit unter meiner Anleitung durchgeführt.

4.10.7 Reporterplasmide

Die pMIR-S1PR1-3'UTR, pMIR-S1PR1 mut Bart16-3'UTR, pMIR-TOMM22-3'UTR (Dolken et al., 2010) und pMIR-IL-1 α -3'UTR (Motsch et al., 2012) Reporterplasmide wurden von Dr. Natalie Motsch kloniert. Die Reportervektoren pMIR-CUL5-3'UTR und pMIR-CUL5 mut 148a-3'UTR wurden von Dr. Martin Hart kloniert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

pMIR-CUL5: Die Nukleotide -155 bis 799 der Cullin-5-3'UTR wurden über *SpeI* und *SacI* hinter das Gen der Firefly-Luciferase des pMIR-RNLTK Reportervektors kloniert. Die Amplifikation des 969bp langen Fragments erfolgte aus Testis-cDNA mit spezifischen Primern.

pMIR-CUL5 mut 148a: Durch gerichtete Mutagenese wurde die zur miR-148a komplementären Sequenz in der CUL5-3'UTR (Nukleotide 393 - 399) durch eine *Pml*-Restriktions-Schnittstelle ersetzt.

4.11 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden über die Firma Eurofins MWG Operon bezogen.

4.11.1 Primer zum Klonieren von Fragmenten

In Tabelle 5 sind alle Oligonukleotide aufgelistet, die zur Klonierung der verwendeten Effektor- und Reporterplasmide herangezogen wurden.

Tabelle 5: Übersicht der zur Klonierung verwendeten Oligonukleotidprimer. Restriktions-Schnittstellen sind kursiv dargestellt.

Primer	Sequenz
5'-miR-142- <i>EcoRI</i> 3'-miR-142- <i>BamHI</i>	5'- <i>Ggaattc</i> GGGATCTTAGGAAGCCACA-3' 5'-CG <i>ggatcc</i> ATGGAGGCCTTTCAGGCAT-3'
5'-miR-148a- <i>EcoRI</i> 3'-miR-148a- <i>BamHI</i>	5'-CG <i>gaattc</i> TGTTGGGCATTTGCTCCTGC-3' 5'-CGC <i>ggatcc</i> CAGTCAGGAGTCCACCAGGG-3'
5'-BART16- <i>EcoRI</i> 3'-BART16- <i>BamHI</i>	5'-CG <i>gaattc</i> AAGTGACGCAAGGTCTGTCAG-3' 5'- <i>Ggatcc</i> TGCCTGCGTCCTCTTAGGGTGC-3'
5'-CUL5- <i>SpeI</i> 3'-CUL5- <i>SacI</i>	5'-GG <i>actagt</i> GTAATGCTCAGCTGCAGAC-3' 5'-C <i>gagctc</i> CTGCAATCATAATGACCTACC-3'
5'-IL-1 α - <i>SpeI</i> 3'-IL-1 α - <i>SacI</i>	5'- <i>Gactagt</i> CTACTGGGTGTGCTTGGCA-3' 5'-C <i>gagctc</i> CATTATGGTCTGATCAC-3'
5'-S1PR1- <i>SpeI</i> 3'-S1PR1- <i>SacI</i>	5'- <i>Gactagt</i> CGCAGCAAATCGGACAATTC-3' 5'-C <i>gagctc</i> GCTGGACTGAAAAGTTTCTGGCG-3'
5'-TOMM22- <i>SpeI</i> 3'-TOMM22- <i>NaeI</i>	5'- <i>Gactagt</i> GCAGATACTTCTAGGACC-3' 5'-CG <i>gccggc</i> CACAGTGTCATTATAGAC-3'
5'-CUL5-mut- <i>PmlI</i> 3'-CUL5-mut- <i>PmlI</i>	5'-GATCTTCAGATATTCA <i>cacgtgca</i> AAAAATGCTGTTATC-3' 5'-GATAACAGCATTTTTTGC <i>cacgtgtg</i> AATATCTGAAGATC-3'
5'-S1PR1-mut- <i>Sspl-SalI</i> 3'-S1PR1-mut- <i>Sspl-SalI</i>	5'-GCATAAGGAAG <i>aatattgtcga</i> CAAATGATATTATGCC-3' 5'-GGCATAATATCATTT <i>gtcgacaatatt</i> CTTCCTTATGC-3'

4.11.2 Primer zur quantitativen PCR

Zur Amplifikation von spezifischen miRNA-Sequenzen aus cDNA in der quantitativen Real-Time PCR wurden Oligonukleotidprimer eingesetzt, die in Tabelle 6 aufgelistet sind.

Tabelle 6: Übersicht der qRT-PCR-Primer

Primer	Sequenz
qRT-miR-21-5p	5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3'
qRT-miR-148a-3p	5'-TCAGTGCACTACAGAACTTTGT-3'
qRT-150-5p	5'-TCTCCCAACCCTTGTACCAGTG-3'
qRT-miR-155-5p	5'-TTAATGCTAATCGTGATAGGGGTAA-3'
qRT-miR-142-3p	5'-TGTAGTGTTCCTACTTTATGGA-3'

4.11.3 Sonden für Northern Blots

Die Oligonukleotide, die zur Herstellung spezifischer Sonden für Northern Blots verwendet wurden, sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Übersicht der ssDNA-Templates für Northern Blot-Sonden

RNA-Sonde	Sequenz des Oligonukleotid-Templates
5'-EBER 1	5'-AGGACCTACGCTGCCCTAGAcctgtctc-3'
3'-EBER 2	5'-AGAAGGGTATTCCGGCTTGCCGCTGTTTcctgtctc-3'
miR-21-5p	5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGAcctgtctc-3'

4.12 Computersoftware

CorelDRAW X6	Erstellung von Abbildungen
ImageQuant v3.3	Rohfassung von Northern Blot Ergebnissen
Microsoft Excel 2010	einfache Tabellenkalkulationen (manuelle Formatierung der Sequenzierdaten, Auswertung der Dual-Luciferase-Assay-, Western Blot- Quantifizierungs- und qRT-PCR-Rohdaten)
Microsoft Word 2010	Textverarbeitung
NCBI	Nukleotid-Sequenzabgleich (National Center Of Biotechnology Information)
Quantity One (Biorad)	Quantifizierung von Western Blots und Abbildung von UV-belichteten Agarose-Gelen
SigmaPlot 10.0 (Systat Software)	Statistische Auswertungen
Snapgene Viewer	Kartierung von Vektorsequenzen
TargetScanHuman 6.2	Vorhersage von Zielgenen zellulärer miRNAs

TargetScanHuman Custom 5.2 Vorhersage von Zielgenen viraler miRNAs

WorkOut 2.5 (Perkin Elmer) Erstellung der ELISA-Rohdaten

5 Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden entsprechen größtenteils denen in meiner Diplomarbeit „Vergleich zweier Sequenzierungen von Epstein-Barr Virus assoziierten NK/T-Zell-Lymphomen zur Erstellung eines microRNA Profils“ beschriebenen Methoden. Beide Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Friedrich Grässer angefertigt und bauen thematisch aufeinander auf. Nach Absprache mit meinem Doktorvater Prof. Dr. Friedrich Grässer und dem Justitiariat des Uniklinikum des Saarlandes wurde beschlossen, die Methoden der Diplomarbeit, die in dieser Arbeit unverändert angewandt wurden, zu übernehmen und durch wissenschaftlich korrekte Zitate „(Alles, 2011)“ neben der Überschrift des jeweiligen Abschnitts zu kennzeichnen.

5.1 Bakterielle Zellkultur

5.1.1 Aufzucht und Lagerung von Bakterien (Alles, 2011)

Mittels Transformation kompetenter Bakterien mit dem gewünschten Plasmid, Ausplattieren auf einer LB-Agarplatte und anschließender Inkubation über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler wurden entsprechende Plasmide vervielfältigt. Am nächsten Tag wurden zur Untersuchung je 2ml LB-Medium mit einer der über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien beimpft und wiederum über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubieren lassen. Wurde eine große Menge von einem bestimmten Plasmid benötigt, so wurden 100ml LB-Medium mit einer Kolonie beimpft. Die kurzzeitige Lagerung der Bakterien auf LB-Agarplatten erfolgte abgedichtet mit Parafilm bei 4°C. Um Bakterien langfristig bei -70°C zu lagern, wurde 20% (v/v) DMSO zur Bakteriensuspension gegeben. Ein solcher DMSO-Bakterienstamm wurde alternativ ebenfalls zur Beimpfung einer 100ml LB-Kultur verwendet.

5.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien (CaCl₂/RbCl-Methode) (Alles, 2011)

Bakterien haben natürlicherweise Schutzmechanismen, aufgrund welcher keine fremde DNA langfristig aufgenommen werden kann. Solche fremde DNA kann zum Beispiel anhand ihrer spezifischen Methylierung vom Bakterium erkannt und beseitigt werden. Damit also Plasmide in Bakterien erfolgreich vermehrt werden können, muss diesen auf künstliche Weise Kompetenz verliehen werden, sodass die bakterienfremde DNA überhaupt in eine Zelle aufgenommen werden kann. Im Folgenden soll die Herstellung kompetenter Bakterien auf chemische Weise durch die Rubidium-Methode erläutert werden. Zuerst wurden 30ml SOB-Medium (pur) mit 300µl MgCl₂-Lösung versetzt. Diese Lösung wurde dann mit 50µl einer *Escherichia coli*-pMOS-Suspension, welche auf Eis aufgetaut wurde, beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am Morgen des zweiten Tages wurden 8ml der Vorkultur in 200ml SOB-Medium überführt. Diese Hauptkultur schüttelte so lange bei 37°C bis die OD bei 550nm 0,3 betrug. Anschließend ließ man die Bakterienkultur 15 Minuten auf Eis abkühlen. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 3000 rpm und 4°C wurden die Pellets in jeweils 16ml Transformationspuffer 1 resuspendiert, wiederum 15 Minuten auf Eis gekühlt und 10 Minuten bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Diese Bakterienpellets wurden in je 4ml Transformationspuffer 2 aufgenommen, in vorgekühlte 1,5ml Reaktionsgefäße zu je 150µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung der nun kompetenten pMOS-Bakterien fand bei -70°C statt.

5.1.3 Transformation kompetenter Bakterien (Lederberg and Cohen, 1974) (Alles, 2011)

Kompetente Bakterien können nicht selbstständig fremde Plasmide aufnehmen. Erst durch Elektroporation oder Hitzeschock wird dies ermöglicht. Machte man sich die Methode des Hitzeschocks zu nütze, so wurden 50µl einer auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli*-pMOS-Suspension, mit 1µg Plasmid-DNA oder 5µl einer 10µl Ligation vermischt und auf Eis für 20 Minuten inkubiert. Im Anschluss fand der 90 Sekunden andauernde Hitzeschock im 42°C warmen Wasserbad statt. Die Suspension wurde daraufhin kurz auf Eis abgekühlt und durch Zugabe von 100µl LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika wurde eine Vorkultur hergestellt, welche 30 Minuten bei 37°C inkubierte. Dieser Schritt sollte zu einer höheren Ausbeute führen, da die Bakterien die exponentielle Wachstumsphase früher erreichen. Die Vorkultur konnte nun entweder auf eine LB-Agarplatte ausplattiert oder zum Beimpfen einer Hauptkultur verwertet werden. Die LB-Agarplatten, bzw. Hauptkulturen wurden schließlich über Nacht bei 37°C inkubiert bzw. geschüttelt. Der Prozess, wie genau der Hitzeschock funktioniert, ist noch nicht eindeutig aufgeklärt. Man geht allerdings davon aus, dass die Zellwand der Bakterien aufgrund der

Temperatur des Wasserbades für kurze Zeit etwas permeabilisiert wird, sodass Plasmid-DNA aufgenommen werden kann. Die Selektion derer Bakterien, welche die gewünschte DNA in sich tragen, geht auf ein Ampicillin-Resistenzgen zurück. Dabei handelt es sich um ein Gen, welches für das Enzym β -Lactamase kodiert. Dieses Enzym ist in der Lage, Penicillin-Derivate, zu welchen auch Ampicillin gehört, zu spalten und somit unwirksam zu machen. Auf diese Weise überleben nur Bakterien, die das gewünschte Plasmid incl. Resistenzgen in sich tragen und solche, die es nicht beinhalten, werden durch die Wirkung des Antibiotikums abgetötet. Ampicillin wurde im LB-Agar bzw. LB-Medium zu 0,1% (w/v) eingesetzt.

5.1.4 Blau-Weiß-Screening (Alles, 2011)

Diese Methode diente zur Selektion von Bakterien, die ein bestimmtes Plasmid in sich tragen. Der Mechanismus beruht auf der Funktion des Enzyms β -Galaktosidase, mithilfe dessen X-Gal, ein künstliches Substrat, unter Zugabe von IPTG in einen blauen Farbstoff umgewandelt werden kann. Grundlage dieses Mechanismus ist das lac-Operon. IPTG fungiert hier als Induktor, indem durch Bindung an den Repressor des lac-Operons dieser nicht mehr reprimieren kann. Die Gene des lac-Operons können in Folge dessen transkribiert werden und das *lacZ*-Genprodukt (= β -Galaktosidase) kann seiner Funktion nachgehen. Wurde nun ein konstruiertes DNA-Stück (= Insert) erfolgreich in ein Plasmid kloniert, wurde das *lacZ*-Gen unterbrochen, da in ihm die MCS liegt. Folglich konnte in diesem Fall kein Enzym synthetisiert werden, welches X-Gal in einen blauen Farbstoff umwandelt. Demnach blieben die Bakterien, die das Plasmid samt gewünschtem Insert enthielten, weiß. Blaue Kolonien hatten nur ein Plasmid, welches nicht das gewünschte Insert beinhaltete, aufgenommen. Dieses System funktioniert allerdings nur, wenn die verwendeten Bakterien selbst nicht die β -Galaktosidase kodieren. Im Verlauf einer Transformation eines halben Ligationsansatzes musste dazu die LB-Agarplatte vor Ausstreichen der Vorkultur sowohl mit IPTG als auch mit X-Gal behandelt werden.

5.2 Eukaryotische Zellkultur

5.2.1 Kultivierung adhärenter Zellkulturen (modifiziert nach Alles, 2011)

In dieser Arbeit wurde mit 293T- und HaCaT-Monolayerzellen gearbeitet, welche mit allen Monolayern die Eigenschaft gemeinsam haben, dass sie auf einer Unterlage adhärent wachsen. Die verwendeten Zellen wurden in DMEM-Medium kultiviert, welchem die Zusätze 10% FKS und 0,1% 4er-Antibiotikum (40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Monoral, 10 µg/µl Neomycinsulfat, 50 µg/µl Streptomycinsulfat) hinzugefügt wurden. In 75cm²-Kulturflaschen wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und meist montags und freitags 1:10 passagiert. Dabei wurde zunächst das verbrauchte Medium steril abgenommen und verworfen. Nachdem der Zellrasen mit 1ml Trypsin/EDTA abgewaschen wurde, um das restliche Medium zu entfernen, erfolgte eine Inkubation von 10 Minuten im Brutschrank mit 1ml frischem Trypsin/EDTA. Hierbei lösten sich die Zellen vom Untergrund der Kulturflasche und vereinzeln sich. Nach dieser Inkubation wird die Trypsinierungs-Reaktion durch Zugabe von 9ml DMEM (Zusätze siehe oben) abgestoppt. 1ml dieser Zellsuspension wurde dann in eine neue Kulturflasche gegeben und mit 19ml DMEM-Medium auf ein Gesamtvolumen von 20ml aufgefüllt.

5.2.2 Kultivierung von Zelllinien in Suspension (modifiziert nach Alles, 2011)

Die ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien BL-41, B95.8, DG-75, P3HR1, Raji, SNK6 und SNT16, U2932 und U2932-cl3, LCL AM 29 und 58 wachsen in Suspension.

Die Zellen der Linien SNK6 und SNT16 wurden in RPMI 1640-Medium (Sigma-Aldrich) mit den Zusätzen 5% humanes, hitzeaktiviertes Plasma, 1% Natrium-Pyruvat, 1% L-Alanyl-Glutamin und 0,5% Penicillin/Streptomycin im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Passagieren dieser Zelllinien verlief montags und freitags in dem Maße, dass die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren zuerst vereinzelt wurden, dann 4ml dieser Zellsuspension in frische 75cm²-Kulturflaschen überführt und mit RPMI-Medium (Zusätze siehe oben) auf ein Gesamtvolumen von 20ml aufgefüllt wurde. Diesen Zellen wurde 1:2000 Oxalessigsäure und 10⁶ U/ml Interleukin-2 frisch dazugegeben.

Die Kultivierung der B-Zelllinien BL41, B95.8 DG-75, P3HR1, Raji, U2932 und U2932-cl3, bzw. der LCLs AM 29 und 58 erfolgte ebenfalls in RPMI 1640-Medium, dem 10% FKS und 0,1% des 4-er Antibiotikums hinzugefügt wurden. Gesplittet wurden diese Zellen ebenfalls in der Regel montags und freitags im Verhältnis 1:4. Zur fortlaufenden Selektion der EBV-

positiven U2932-cl3-Zellen wurde dem Medium bei jeder Passage 200 mg/ml G418 zugefügt.

5.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Carl Roth GmbH). Hierfür wurde ein Deckglas auf die Kammer gebracht bis die sog. „Newton'schen Ringe“ erkennbar wurden. Anschließend wurde die Kammer mit einer Zellsuspension gefüllt, die in der Regel 1:100 in PBS und 1:2 in Trypanblau-Lösung verdünnt war. Danach wurden drei Großquadrate, die aus jeweils 16 Mittelquadraten bestanden, unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei nur die Zellen gezählt wurden, die ein leuchtender Ring umgab. Blau gefärbte Zellen waren als tot zu betrachten, denn durch zerstörte Zellmembranen konnte Trypanblau in die Zellen eindringen. Nach bilden des Mittelwertes aus den drei Zählungen konnte unter Verwendung der Formel 1 die Zellzahl pro Milliliter ermittelt werden.

Formel 1: Berechnung der Zellzahl mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer

$$\text{gezählte Zellzahl} \times 312,5 \text{ (1000/Kammervolumen)} \times 200 \text{ (Verdünnungsfaktor)} = \text{Zellzahl / ml}$$

Hierbei betrug das Kammervolumen 3,2µl.

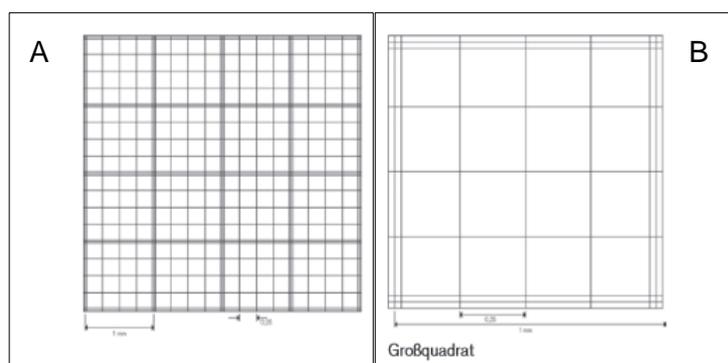


Abbildung 15: Aufbau einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. A: Komplette Zählkammer, bestehend aus 16 Großquadraten. B: einzelnes Großquadrat (Quelle: BRAND)

5.2.4 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen (modifiziert nach Alles, 2011)

Mithilfe des Nanofectin-Kits von GE Healthcare lassen sich Monolayerzellen sehr gut transfizieren. Das Reagenz wird währenddessen nicht durch die Anwesenheit von Serum gestört. Nanofectin besteht aus positiv geladenen Polymeren, die in ein poröses Nanopartikel gebettet sind, welche negativ geladene DNA binden können. Dieser DNA-Nanopartikel-Komplex kann von der Zelle endozytotisch aufgenommen werden. Die DNA ist im Komplex mit diesen Nanopartikeln vor Abbau durch Nukleasen geschützt. Für die Transfektion mussten Monolayer-Zellen nach Vorschrift in Zellkultur-Lochplatten ausgesät werden, 24h später mit der jeweiligen DNA transfiziert und schließlich 48h nach Transfektion geerntet werden.

Im Laufe der Experimente für diese Arbeit stieg das Labor auf eine günstigere Alternative um. Mithilfe des Transfektionsreagenz PolyFect der Firma QIAGEN ließen sich eukaryotische Zellen nach demselben Prinzip transient transfizieren.

5.3 DNA-Techniken

5.3.1 Isolation von Plasmid-DNA

5.3.1.1 Analytische Isolation von Plasmid-DNA (Boiling-Minipräp)

(modifiziert nach (Birnboim and Doly, 1979), (Alles, 2011))

Um eine kleine Menge Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken zu isolieren, reichte es aus, 2ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit einer Bakterienkolonie von einer LB_{Amp}-Agarplatte zu beimpfen und über Nacht bei 37°C schütteln zu lassen. Die Isolierung der Plasmide fand mittels „Boiling-Präparation“ statt, die auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht. Die Bakterienkulturen wurden nach Überführen in 1,5ml Reaktionsgefäße 10 Minuten bei 5000rpm und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden anschließend in 200µl einer Lösung, welche aus STET-Puffer und 1µl Lysozym (0,5 mg/ml) bestand, resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Bakterien lysiert. Im 98,5°C heißen Wasserbad ließ man dann die lysierten Bakterien 45 Sekunden kochen und kurz auf Eis abkühlen. Nach nochmaliger 15-minütiger Zentrifugation bei 14000rpm und 4°C konnte man das Pellet, bestehend aus Zelltrümmer, Proteinen und chromosomaler DNA mit einem sterilen Zahnstocher entfernen. Die Plasmid-DNA im Überstand

wurde durch Zugabe von 200µl Isopropanol und erneuter Zentrifugation für 30 Minuten bei 14000rpm und 4°C gefällt. Das DNA-Pellet ließ man kurz trocknen. Anschließend gab man 20µl S1-Puffer zum Pellet und während einer 10-minütigen Inkubation bei 37°C wurde RNA durch RNasen im S1-Puffer abgebaut. Im letzten Inkubationsschritt, welcher 5 Minuten bei 55°C stattfand, löste sich die Plasmid-DNA.

5.3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA mittels NucleoBond® (Alles, 2011)

Benötigte man Plasmid-DNA nicht nur zu analytischen Zwecken sondern in größeren Mengen, so gab es die Möglichkeit, eine Übernachtskultur an Bakterien, die das gewünschte Plasmid in sich trugen, über Anionen-Austauschersäulen der Firma Macherey-Nagel aufzureinigen. Mit diesen NucleoBond™-AX 100-Säulen können Plasmide aus einer Bakterienkultur von bis zu 100ml präpariert werden. Nach Zentrifugation der Kultur (15min, 6000rpm, 4°C) wurde das Bakterienpellet zunächst in 4ml S1-Puffer resuspendiert. Wurden 4ml S2-Puffer hinzugefügt, erfolgte die alkalische Lyse der Bakterienzellwand aufgrund des SDS, welches im Puffer vorhanden war. SDS denaturiert außerdem chromosomale, sowie Plasmid-DNA und Proteine. Die Plasmide konnten während eines Neutralisationsschrittes mithilfe von 4ml S3-Puffer, während einer Inkubation von 5min auf Eis, wieder rehybridisieren, wohingegen Chromosomen und Proteine denaturiert verblieben und präzipitierten. Nach erneuter Zentrifugation bei 6000rpm, 4°C für 25min wurde der flüssige Teil des Inhalts des Reaktionsgefäßes auf eine mit 2,5ml N2-Puffer äquilibrierte Anionen-Austauschersäule überführt. Die Bindung der sehr stark negativ geladenen Plasmid-DNA an die Säule wurde durch die Salzkonzentration und den pH-Wertes im Lysat noch einmal zusätzlich verstärkt. Da RNA ebenfalls negativ geladen ist und an die Säule binden kann, wurde diese mit 2 x 5ml N3-Puffer gewaschen. Die mit 5ml N5-Puffer eluierten Plasmide wurden mit 3,6ml Isopropanol gefällt (30min, 6000rpm, 4°C). Das gefällte DNA-Pellet wurde anschließend mit 2ml 70% Ethanol gewaschen (10min, 6000rpm) und nach einer kurzen Trocknungsphase je nach Größe des Pellets in 50-100µl TE-Puffer aufgenommen. Im 50°C Wasserbad wurde die Plasmid-DNA 1 Stunde lang gelöst, sodass im Anschluss die Konzentration sowie Reinheit der isolierten Plasmid-DNA photometrisch mittels Nanodrop bestimmt werden konnte.

5.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA (Alles, 2011)

(Sambrook et al., 1989) (Birnboim and Doly, 1979)

Der Mechanismus, der einer DNA-Messung mit einem Nanodrop2000c (PEQLAB) zugrunde liegt, ist derselbe wie bei einem Photometer. Dabei macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass Nukleinsäuren Licht der Wellenlänge 260nm absorbieren. Somit kann man mit Hilfe der resultierenden Absorption den Gehalt an Nukleinsäuren in einer Lösung bestimmen. In der Regel geht man nach dem Hyperchromizitätseffekt bei einer gemessenen OD (= optischen Dichte) von 1 bei 260nm von folgenden Konzentrationen aus:

- doppelsträngige DNA: 50 mg/ml
- einzelsträngige DNA und RNA: 40 mg/ml
- Oligonukleotide: 33 mg/ml

Proteine hingegen absorbieren Licht der Wellenlänge 280nm. Somit kann die Reinheit ebenfalls photometrisch bestimmt werden, indem der Quotient OD_{260}/OD_{280} berechnet wird. Dieser Wert sollte in etwa bei 1,8 – 2,0 liegen. Ist der Quotient niedriger, so ist die gemessene Probe mit Proteinen verunreinigt. Vermessen wurden jeweils 2µl Probe, als Referenz diente TE-Puffer.

5.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (Alles, 2011)

(Mullis et al., 1986)

Mithilfe einer Polymerase-Kettenreaktion können Teile von Nukleinsäuren, deren Länge und Sequenz genau bestimmt werden kann, synthetisiert werden. Die Schlüsselkomponente in diesem System bildet eine DNA-Polymerase, welche zu einem Template komplementäre DNA-Einzelstränge in Abhängigkeit einer freien 3'-OH-Gruppe bilden kann. Im ersten Schritt muss hierzu das doppelsträngige DNA-Template bei 95°C denaturiert werden, d. h. die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Strängen werden aufgebrochen, sodass die DNA-Stränge nun vereinzelt vorliegen. Wird das System abgekühlt, so können künstliche Oligonukleotide - sog. Primer – an die Einzelstränge des Templates hybridisieren, da sie teilweise zu einem dieser Elternstränge komplementär sind. Bei der Synthese der Primer (Eurofins MWG Operon) ist darauf zu achten, dass die jeweiligen Schmelztemperaturen in etwa ähnlich sind. Außerdem sollen sie nach Möglichkeit keine Multimere miteinander bilden. Die optimale Temperatur für diesen Annealingschritt ist zum einen abhängig vom prozentualen Anteil an Guanosin- und Cytosin-Nukleotiden, zum anderen aber auch von der Sequenzlänge. In der Regel

liegt die Temperatur zum Annealing der Primer zwischen 50 und 60°C. Im dritten Schritt der PCR erfolgt die zum Template komplementäre Elongation der Primer, ausgehend von ihren freien 3'-OH-Enden durch die Polymerase. DNTPs (= Desoxyribonukleosidtriphosphate), die Bausteine für die DNA-Stränge, sind dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Die Reaktionstemperatur in diesem Schritt beträgt 72°C, das Temperaturoptimum der eingesetzten *Taq*-Polymerase. Dieses Enzym stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und hat den Vorteil, dass es auch bei hohen Temperaturen, die zum Denaturieren der DNA-Doppelstränge nötig sind, stabil bleibt. Die von der *Taq*-Polymerase gebildeten Tochterstränge sind zu diesem Zeitpunkt noch von undefinierter Länge. Erst im zweiten Reaktionszyklus, nach der Denaturierung der neu generierten Eltern-Tochter-Duplexe, werden die Tochterstränge aus dem ersten Zyklus zur Matrize. Ein zweiter Primer hybridisiert an den neuen DNA-Einzelstrang und wird von der *Taq*-Polymerase aufgefüllt. Das Ergebnis dieses zweiten Zyklus ist ein DNA-Stück von gewünschter Länge und Sequenz, welches jeweils von den Primern begrenzt ist. Ab hier werden in den folgenden Zyklen nur noch Doppelstränge dieser Art amplifiziert und das auf fast exponentielle Weise. Tabelle 8 zeigt die Zusammensetzung eines typischen PCR-Reaktionsansatzes.

Tabelle 8: Komponenten eines 50µl PCR-Ansatzes

Komponente	eingesetztes Volumen	Endkonzentration
10x <i>Taq</i> -Puffer	5 µl	1x
dNTP	2 µl	je 100 mM
5'-Primer	1 µl	25 µM
3'-Primer	1 µl	25 µM
DNA-Template	1-5 µl	100-500 ng
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl	5 U
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl	

Zur Kontrolle auf Reinheit des Reaktionsansatzes wurde jeweils noch eine Probe ohne DNA-Template mitlaufen lassen. Die Reaktionen verliefen in einem Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research).

Tabelle 9: PCR-Standardprogramm

Reaktion	Temperatur	Dauer [min]	
Denaturierung	95°C	05:00	
Denaturierung	95°C	00:50	} 39x
Annealing	50-60°C	00:50	
Elongation	72°C	variabel	
finale Elongation	72°C	10:00	

Das in Tabelle 9 aufgeführte Standardprogramm wurde je nach Beschaffenheit der Primer in der Annealingtemperatur und auch je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments in der Elongationsdauer variiert. Die *Taq*-Polymerase schafft in der Regel eine Amplifikation von ca. 1kb pro Minute. Die finale Elongation dient dazu, dass noch einzelsträngig verbliebene DNA zu DNA-Doppelsträngen polymerisiert werden. Zum Nachweis, dass die PCR erfolgreich war, wurden jeweils 20µl des Ansatzes in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

5.3.4 Gerichtete Mutagenese

Der gerichtete Austausch von Sequenzen einer 3'UTR, an die miRNAs binden, mittels PCR wird zielgerichtete Mutagenese genannt (engl.: site directed mutagenesis). Für dieses Verfahren wurden spezifische Primer benötigt, die die jeweilige Sequenz abdeckten, die gewünschte Mutation trugen und zueinander komplementär waren. Als Template wurde das Plasmid eingesetzt, welches es zu mutieren galt. In dieser Art der PCR wurde eine Polymerase verwendet, die über die Eigenschaft des Proofreading verfügt, d. h. dieses Enzym ist in der Lage, falsch eingebaute Nukleotide zu erkennen, zu entfernen und durch korrekte Nukleotide zu ersetzen.

Tabelle 10: Komponenten eines 50µl Mutagenese-PCR-Ansatzes

Komponente	eingesetztes Volumen	Endkonzentration
5x Reaktionspuffer	10 µl	1x
dNTP	2 µl	je 100 mM
5'-Mutagenese-Primer	1 µl	25 µM
3'-MutagenesePrimer	1 µl	25 µM
DNA-Template	1-5 µl	100 ng
<i>Phusion</i> High-Fidelity-DNA-Polymerase	0,5 µl	1 U
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl	

Das verwendete PCR-Programm ist Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: PCR-Programm eines Mutagenese-Ansatzes

Reaktion	Temperatur	Dauer [min]
Denaturierung	95°C	02:00
Denaturierung	95°C	00:50
Annealing	Primer-abhängig	01:00
Elongation	72°C	Template-abhängig
finale Elongation	72°C	10:00

} 39x

Nach Aufreinigung der amplifizierten DNA wurde ein Restriktionsverdau mit dem methylierungsspezifischen Enzym *DpnI* durchgeführt. *DpnI* sorgte für den Abbau der methylierten bzw. hemimethylierten parentalen DNA, die in der PCR als Template diente. Da die neu synthetisierte DNA, die die Mutation enthielt, jedoch nicht methyliert wurde, blieb sie intakt. Der Restriktionsansatz konnte im Anschluss unmittelbar in *E. coli* pMOS-Bakterien transformiert werden, in denen die DNA wieder rezirkularisieren konnte. Die Bestimmung der positiven Klone erfolgte durch Restriktion ihrer Minipräp-DNA mit einem spezifischen Enzym, für welches die Erkennungssequenz anstelle der miRNA-Bindestelle in die Primer eingebaut wurde.

5.3.5 Agarose-Gelelektrophorese (Alles, 2011)

(Sambrook et al., 1989)

Mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente ihrer Sequenzlänge nach auftrennen. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass die negativ geladene DNA in einem elektrischen Feld zur Anode, also dem Pluspol, wandert. Das Agarosegel wirkt bei diesem Vorgang als Molekularsieb, in welchem kleinere Fragmente schneller durch die Poren gelangen können als größere. Die Größe der Poren lässt sich durch die Konzentration der Agarose variieren, sodass je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente ein entsprechend prozentiges Agarosegel zu verwenden ist. In dieser Arbeit wurde in der Regel mit 1%-igen Agarosegelen gearbeitet, womit sich DNA-Fragmente der Größenordnung 0,5 – 7 kb sehr gut auftrennen lassen. In Tabelle 12 sind die zu verwendenden Agaroseanteile im Gel, bezogen auf den DNA-Bereich, der aufgetrennt werden soll, gezeigt.

Tabelle 12: Einsatz verschiedener Agarosegel-Konzentrationen je nach aufzutrennenden DNA-Fragmentgrößen

Ausmaß der DNA-Auftrennung [kb]	Anteil Agarose im Gel [%]
1,0 - 30	0,5
0,8 - 12	0,7
0,5 - 7,0	1,0
0,4 - 6,0	1,2
0,2 - 3,0	1,5
0,1 - 2,0	2,0

Um ein 1%-iges Agarosegel herzustellen, wurden 4,5g Agarose in 450ml 1x TAE-Puffer zum Lösen mehrfach aufgeköcht und langsam wieder auf ca. 60°C abgekühlt, bevor 25µl Ethidiumbromid (10 mg/ml in H₂O) der Lösung hinzugefügt wurden. Die Vorrichtung in welche die Agarose-Ethidiumbromid-Lösung gegossen wurde, bestand aus einer 24,5 x 24,5cm großen Glasplatte, auf der ein Metallrahmen von 1cm Stärke befestigt wurde. Der Rahmen wurde zuvor mit 1%-iger Agaroselösung abgedichtet. In diesen Rahmen wurden drei Metallkämme ca. 2mm über der Glasplatte eingespannt, mit Hilfe derer sich später die Geltaschen mit ca. 30µl Fassungsvermögen bildeten. Nachdem das Gel in diese Vorrichtung gegossen wurde und völlig auspolymerisiert war, wurden Rahmen und Kämme entfernt, das Gel auf der Glasplatte bis zum Gebrauch in Folie verpackt und bei 4°C gelagert.

Um nun DNA gelelektrophoretisch aufzutrennen, schnitt man ein Stück Gel mit der entsprechenden Anzahl an Taschen zurecht und legte es in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer. Die DNA-Proben wurden zuvor mit Blaumarker versetzt, damit sie ordnungsgemäß

absinken konnten. Außerdem hat der Gebrauch des Blaumarkers den Vorteil, dass mit ihm die Lauffront im Gel sichtbar gemacht werden konnte. Das DNA-Blaumarker-Gemisch wurde in die Geltaschen überführt und ein elektrisches Feld (140V) für ca. eine Stunde an die Kammer angelegt. Die Größenbestimmung erfolgte anhand eines Größenstandards (Invitrogen, bzw. NEB, siehe Abbildungen 8 und 9), welcher zusätzlich zu den Proben in jedem Gel zu je 10µl mitgeführt wurde. Anschließend wurden die aufgetrennten Fragmente dokumentiert (Biorad, ChemiDoc™ XRS+). Aufgrund des Ethidiumbromids, welches in das Agarosegel mit eingearbeitet wurde, war es möglich, unter UV-Licht bei 254nm die jeweiligen DNA-Fragmente sichtbar zu machen. Ethidiumbromid ist eine Substanz, welche in DNA-Doppelstränge interkaliert. Regt man es mit UV-Licht an, so erscheinen die Fragmente als fluoreszierende Banden im Gel. Da allerdings dieses kurzwellige Licht äußerst energiereich ist, wird die DNA im Agarosegel dadurch sehr geschädigt. Daher wurden DNA-Fragmente, die während einer Klonierung noch weiterverarbeitet wurden, mit UV-Licht der weniger energiereichen Wellenlänge von 365nm sichtbar gemacht und anschließend mit einem Skalpell ausgeschnitten.

5.3.6 NucleoSpin® DNA-Extraktion (Alles, 2011)

Durch Verwenden des NucleoSpin-Kits der Firma Macherey-Nagel konnte DNA aus einem Agarosegel extrahiert werden. Die silicahaltigen Säulchen arbeiteten als Ionenaustauscher. Zur Extraktion wurde zuerst das DNA-enthaltende Agarose-Gelstück bei 50°C in NT-Puffer (200µl pro 100mg Gelstück) gelöst. Die Lösung konnte nun im nächsten Schritt an die Säule binden (1min, 11000rpm). Durch Waschen mit 700µl NT3-Puffer (1min, 11000rpm) wurden unspezifisch bindende Moleküle von der Säule entfernt. Die Elution erfolgte durch 20µl NE-Puffer, der zuerst 1min bei Raumtemperatur inkubieren musste (1min, 11000rpm). Die auf diese Weise eluierte DNA konnte nun zur weiteren Klonierung verwendet werden.

5.3.7 DNA-Modifikation

5.3.7.1 Enzymatische Restriktion (modifiziert nach Alles, 2011)

(Sambrook et al., 1989)

Restriktionsendonukleasen wurden von Bakterien zum Schutz vor fremder DNA entwickelt, indem sie spezifische DNA-Methylierungsmuster erkennen. Sie werden in der Naturwissenschaft in drei Klassen unterteilt, von denen allerdings nur die Enzyme der Klasse II zur Klonierung von Bedeutung sind. In der Regel erkennen solche Restriktionsenzyme meist palindrome DNA-Sequenzen, die aus vier, sechs oder acht Basenpaaren bestehen. Die „Schnitte“ durch solche Enzyme erfolgen entweder glatt durch den Doppelstrang, wodurch stumpfe Enden, sog. „blunt ends“, entstehen oder aber es wird versetzt geschnitten, woraufhin am 5'- oder 3'-Ende kurze Überhänge entstehen, die „sticky ends“ genannt werden. Eine Unit (U) ist per Definition die Menge an Enzym, welche in der Lage ist, unter optimalen Bedingungen 1 µg DNA innerhalb einer Stunde vollständig zu verdauen. Zur Analyse wurden jeweils 1 µg DNA und für präparative Zwecke meist 2 µg DNA eingesetzt. Je nach Restriktionsenzym wurden pro Ansatz zwischen 2 und 10 U/µg verwendet. Die optimalen Bedingungen wurden nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs) eingehalten. Ein Beispiel für eine Standardrestriktion ist im Folgenden aufgeführt.

Tabelle 13: Zusammensetzung eines Standard-Restriktionsansatzes

Komponente	Menge / Volumen
10x Restriktionspuffer	2 µl
DNA	variabel
Restriktionsendonuklease(n)	2U
H ₂ O _{bidest.}	ad 20 µl

Wurde ein Doppelverdau durchgeführt, d. h. wurden zwei verschiedene Restriktionsendonukleasen eingesetzt, so musste ein Restriktionspuffer angewandt werden, in welchem beide Enzyme eine angemessene Aktivität aufweisen. Nach Zusammenpipettieren von Restriktionsansätzen wurden diese kurz durchmischt und vorsichtig abzentrifugiert. Die Inkubation erfolgte meist bei 37°C. Zur Analyse und Aufreinigung der verdauten DNA erfolgte schließlich eine Agarose-Gelelektrophorese.

5.3.7.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA (Alles, 2011)

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

Nach Restriktion von Vektor-DNA ist es möglich, dass sich die geschnittenen Enden während einer darauf folgenden Ligation wieder zusammenfügen. Eine Rezirkularisierung kann geschehen, nachdem ein Vektor mit einer Restriktionsendonuklease linearisiert wurde oder aber es fügen sich nach einem Doppelverdau mehrere Vektoren zu einem Konkatermer zusammen. Um diese Vorgänge zu verhindern, wurde jedem Restriktionsansatz, in dem Vektor-DNA verdaut werden sollte, zusätzlich 1µl alkalische Phosphatase (engl.: CIP = calf intestinal phosphatase) hinzugefügt. Die CIP ist dafür verantwortlich, dass das freie 5'-Phosphat am Ende des Vektors entfernt wird. Nach einer Inkubation von mindestens 3h, wahlweise über Nacht, wurde der Ansatz im Agarosegel aufgetrennt, nach erfolgreicher Linearisierung des Vektors aus dem Gel reisoliert (NucleoSpin) und zur Ligation mit verdauten PCR-Produkten eingesetzt.

5.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten (Alles, 2011)

5.3.8.1 Direkte Ligation von DNA-Fragmenten

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

Eine Ligation bezeichnet die enzymatische Verknüpfung von DNA-Stücken. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Enzym T4-Ligase gearbeitet. Es stammt aus *E. coli*, die mit Bakteriophagen T4 infiziert wurden, und ist für die DNA-Reparatur zuständig. Der Vorgang der Ligation ist energieabhängig, d. h. die T4-Ligase katalysiert unter Verbrauch von ATP die Entstehung neuer Phosphodiesterbindungen in DNA-Doppelsträngen und zwar zwischen benachbarten 3'-OH- und 5'-Phosphaten. Vektor- und Insert-DNA sollten im Ligationsansatz etwa äquimolar vorliegen. Außerdem ist zu beachten, dass Vektor- und Insert-DNA im Falle einer Direktligation nur verwendet werden, nachdem sie verdaut und der Vektor zusätzlich dephosphoryliert wurde. Gängige Ligationsansätze werden im Folgenden aufgeführt.

Tabelle 14: Komponenten und Volumina von Ligationsansätzen

Komponente	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
Vektor-DNA	1µl	2µl	3µl	4µl
Insert-DNA	7µl	6µl	5µl	4µl
10x T4-Ligase-Reaktionspuffer	1µl	1µl	1µl	1µl
T4-Ligase	1µl	1µl	1µl	1µl

Zusätzlich wurde bei jeder Ligation ein Ansatz ohne Insert mitgeführt, welcher zur Kontrolle des Vektors auf Rezirkularisierung bzw. Konkaterisierung diente. Die Ansätze wurden über Nacht oder über ein Wochenende bei 4°C inkubiert, schließlich in kompetente pMOS-*E. coli* transformiert und auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen, welche über Nacht bei 37°C inkubierten.

5.3.8.2 Ligation von PCR-Produkten in pGEM®-T (Alles, 2011)

Mit Hilfe des pGEM®-T-Vektors ist es möglich, PCR-Fragmente ohne vorherige Restriktion durch Endonukleasen zu ligieren. Bei der TA-Klonierung nutzt man die Tatsache, dass in der PCR die *Taq*-Polymerase am 3'-Ende des Produktes Adenin-Überhänge erzeugt. Da der verwendete pGEM®-T-Vektor selbst 3'-Thymin-Überhänge aufweist, gelingt hier die Ligation ohne Modifikation des PCR-Produktes. Dieses Kit empfiehlt sich zur Zwischenklonierung, wenn die direkte Ligation in den Zielvektor z. B. aufgrund schlechter Restriktion, nicht erfolgreich war. Ein typischer Ansatz ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Zusammenstellung eines Standard-Ligationsansatzes für pGEM®-T Ligationen

Komponente	eingesetztes Volumen
pGEM®-T Vektor-DNA	1µl
aufgereinigtes PCR-Produkt	3µl
2x Ligasepuffer	5µl
T4-Ligase (1U/µl)	1µl

Nach Inkubation über Nacht bei 4°C erfolgte auch hier anschließend eine Transformation in *E.coli*/pMOS-Bakterien. Zur Blau-Weiß-Selektion (siehe Abschnitt 5.1.4) müssen die ampicillinhaltigen LB-Agarplatten jedoch vor Ausplattieren der Vorkultur mit IPTG und X-Gal

behandelt werden. In pGEM®-Vektoren liegt ihre MCS innerhalb des *lacZ*-Gens, was ein solches Screening ermöglicht.

5.4 RNA-Techniken

5.4.1 Extraktion von Gesamtzell-RNA (modifiziert nach Alles, 2011)

Zur Extraktion von RNA aus eukaryotischen Zellen wurde peqGOLD TriFast™ (PEQLAB) verwendet. Hierbei handelte es sich um eine Technik, mit welcher es möglich war, mit Hilfe von Guanidinisothiocyanat und Phenol nicht nur RNA, sondern zugleich auch DNA und Proteine zu isolieren. Unter Berücksichtigung des Herstellerprotokolls bildeten sich nach Hinzufügen von Chloroform und Zentrifugation (30min, 6000rpm) drei Phasen: eine farblose wässrige Phase oben, in der sich die RNA befand, eine rote Phenol-Chloroform-Phase unten und eine Interphase, in welcher DNA und Proteine angereichert wurden. Die RNA in der wässrigen Phase wurde mit Isopropanol gefällt (45min, 6000rpm) und in DEPC-H₂O bei 55°C gelöst. Auf das Waschen mit Ethanol, welches im Herstellerprotokoll aufgeführt ist, wurde verzichtet, da bei diesem Schritt die sehr kleinen microRNAs häufig ebenfalls gewaschen werden. Hatte man nur eine geringe Anzahl an Zellen zur Verfügung, aus denen RNA zu extrahieren war, so konnte die Prozedur auch im kleinen Maßstab in 1,5ml Reaktionsgefäßen durchgeführt werden. Der Vorteil bestand in diesem Fall darin, dass sich die Zentrifugationszeiten um ein Vielfaches minimieren ließen, indem man eine Tischzentrifuge verwendet, die in der Lage war, viel höhere Zentrifugationsgeschwindigkeiten zu leisten. Laut Herstellerprotokoll sollte für die Phasentrennung eine 5-minütige und für die RNA-Fällung eine 10-minütige Zentrifugation bei 12.000g ausreichen. Verwendete man allerdings größere Reaktionsgefäße, so musste auf eine Megafuge ausgewichen werden, die nur auf maximal 6.000rpm beschleunigen konnte. Um die Prozeduren möglichst aneinander anzupassen, wurden die Zentrifugationszeiten in der Megafuge dementsprechend verlängert.

5.4.2 Herstellung von Kern- und Zytoplasma-RNA-Extrakten

(modifiziert nach (Dignam et al., 1983))

Die Experimente mit Kern- und Zytoplasmaextrakten erfolgten mit RNA aus Raji-Zellen. Hierfür wurde die Zellsuspension in 50ml-Gefäßen 15min auf Eis abgekühlt, bei 10min 1200rpm pelletiert und mit eiskaltem PBS gewaschen. Das nach erneuter Zentrifugation resultierende Zellpellet wurde in 4-fachem Volumen Gebrauchspuffer A resuspendiert und 15min auf Eis inkubieren lassen. Aufgrund seiner hypotonen Eigenschaft, quellten die Zellen während der Inkubation in Gebrauchspuffer A an. Die Kontrolle der aufgequollenen Zellen erfolgte mittels Färbung von 10µl Zellsuspension mit 10µl Trypanblau-Lösung und Beobachtung unter dem Mikroskop. Sobald ca. 80% der Zellen ein deutlich größeres Volumen im Vergleich zu den Zellen, die nur in PBS aufgenommen wurden, eingenommen hatten, wurden die Zellen in einem Dounce-Homogenisator durch mehrfache Auf- und Abbewegungen des Pistills aufgeschlossen. Der Erfolg des Zellaufschlusses erfolgte wiederum durch Trypanblau-Färbung und Kontrolle unter dem Mikroskop. Anschließend wurde durch Zentrifugation (5min, 13.000rpm) die lösliche Zytoplasmafraktion von den Kernen und noch intakten Zellen separiert. Das kernhaltige Pellet wurde wiederum in Gebrauchspuffer A aufgenommen und erneut im Dounce-Homogenisator behandelt. Somit wurden die restlichen intakten Zellen aufgeschlossen und die Ausbeute an Zellkernen deutlich erhöht. Die kernhaltige Suspension wurde zwei Mal in 1ml Gebrauchspuffer A gewaschen (10sec, 13.000rpm) und das kernhaltige Pellet in 500µl PBS aufgenommen. Die zytoplasmahaltige Suspension wurde durch Zentrifugation für 15min bei 13.000rpm von Zelltrümmern und nichtlöslichen Bestandteilen befreit. Die Zytoplasmafraktion befand sich nun im Überstand. Von beiden Fraktionen wurde ein Teil zur Extraktion von Proteinen weiterverarbeitet und der Rest mit 1ml peqGOLD TriFast zur Extraktion von RNA nach Herstellerangaben verwendet. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der RNA am Nanodrop und die Quantifizierung der Proteinextrakte am Photometer.

5.4.3 Northern Blot

Der Nachweis spezifischer RNA-Moleküle erfolgte durch Northern Blots. Hierfür wurde RNA zunächst in einem ureahaltigen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurden die aufgetrennten RNA-Fragmente auf eine Nylonmembran transferiert und fixiert. Die Markierung eines spezifischen RNA-Moleküls erfolgte schließlich durch individuelle Sonden, die komplementär zur jeweiligen RNA-Sequenz sein sollten und meistens radioaktiv oder mit

nicht-radioaktiven Bestandteilen, wie z. B. Biotin, Digoxigenin oder einem Fluorophor markiert sind.

5.4.3.1 UreaGel-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die 12%-igen Polyacrylamidgele wurden mit dem SequaGel® Kit (National Diagnostics) hergestellt, welches aus den Komponenten Puffer, Verdünner und Konzentrat besteht. Neben Acrylamid und Bisacrylamid enthalten die drei Lösungen auch 7M Urea (= Harnstoff), das die RNA in ihrer Sekundärstruktur denaturiert. Tabelle 16 zeigt die Bestandteile der 12%-igen Polyacrylamidgele.

Tabelle 16: Zusammensetzung eines 12% Urea-Polyacrylamidgel für Northern Blots

Komponente	eingesetztes Volumen
SequaGel-Konzentrat	24ml
SequaGel-Verdünner	21ml
SequaGel-Puffer	5ml
APS 10%	400µl
TEMED	20µl

Zwei gesäuberte Glasplatten (24cm x 16,5cm), die durch Abstandhalter getrennt waren, wurden mit 1%-iger Agarose abgedichtet. Nachdem alle Komponenten für das Polyacrylamidgel zusammen pipettiert wurden, wurde die Mischung zwischen die Glasplatten gegossen, mit einem Kamm, der 16 Taschen hervorbringen sollte, versehen und auspolymerisieren lassen.

Je 20µg RNA wurden zur Vorbereitung mit 5-10µl RNA-Ladepuffer II versetzt und anschließend in die mit 1x TBE gespülten Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte für 3-4 Stunden bei 15 Watt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandert die RNA im Gel aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen in Richtung Anode. Die RNA wird währenddessen ihrer Größe nach aufgetrennt, da durch die Vernetzung des Gels größere Moleküle langsamer wandern können als kleinere. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde die Qualität der RNA sowie der Erfolg der Auftrennung durch Anfärben der RNA im Ethidiumbromidbad (10µl EtBr-Stammlösung (10mg/ml) in 100ml 1x TBE) bei einer Wellenlänge von 254nm (ChemiDoc™ XRS+, Biorad) dokumentiert.

5.4.3.2 RNA-Transfer auf eine Nylonmembran und Crosslink

Der Transfer der aufgetrennten RNA auf eine Nylonmembran (HybondTM-N+, Amersham) erfolgte in einer Semi-Dry-Blotting-Kammer (StarLab). Hierfür wurden fünf Lagen Filterpapier auf die Anode gelegt und mit H₂O_{bidest.} angefeuchtet. Darauf legte man die ebenfalls bewässerte Nylonmembran, deren Größe auf die des Gels zurechtgeschnitten war. Obenauf wurde das Polyacrylamidgel gegeben, gefolgt von weiteren fünf Lagen Filterpapier, die ebenfalls mit H₂O_{bidest.} angefeuchtet wurden. Nach verschließen des Deckels der Apparatur, in welchem sich die Kathode befand, erfolgte der RNA-Transfer 30 Minuten lang bei 15 Volt. Da kleine RNA-Moleküle, wie z. B. miRNAs, nicht so fest an der Nylonmembran haften wie größere RNA-Moleküle, wurde die RNA chemisch auf der Membran fixiert (Pall and Hamilton, 2008). Hierfür wurde die Membran auf 3 Lagen Filterpapier, welche mit einem Crosslink-Reagenz getränkt waren, gelegt, luftdicht in Folie gepackt und für 1-2 Stunden bei 55°C inkubieren lassen.

5.4.3.3 Herstellung einer radioaktiv-markierten Sonde

Der Nachweis von spezifischen RNA-Molekülen erfolgte in dieser Arbeit durch radioaktiv markierte Sonden, welche mittels mirVanaTM miRNA Probe Construction-Kits (Ambion) angefertigt wurden. Die Synthese ging von einem einzelsträngigen DNA-Oligonukleotid aus, welches aus der kompletten oder nur einem Teil der nachzuweisenden Sequenz bestand. Zusätzlich waren am 3'-Ende weitere acht Nukleotide (5'-CCTGTCTC-3') angebracht, an die ein T7-Promoterprimer binden konnte. Im ersten Schritt der Synthese hybridisierte der T7-Promoterprimer an diese spezifische Sequenz, von dem aus das Klenow-Fragment - als Teil einer DNA-Polymerase - ein doppelsträngiges DNA-Molekül synthetisieren konnte.

Tabelle 17: Bestandteile der Hybridisierungsreaktion zur Herstellung einer Northern Blot-Sonde

Komponente	eingesetztes Volumen
T7-Promoter-Primer (100µM)	2µl
ssDNA Oligonukleotid-Template (100 µM)	2µl
Hybridisierungspuffer	6µl

Die Hybridisierungsreaktion (Tabelle 17) erfolgte fünf Minuten bei 70°C und weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur. Zu dem Hybridisierungsansatz wurden anschließend folgende Reagenzien hinzugefügt:

Tabelle 18: Reaktionsagenzien, die dem Hybridisierungs-Mix hinzugefügt wurden

Komponente	eingesetztes Volumen
10x Klenow-Reaktionspuffer	2µl
10x dNTP-Mix	2µl
Nuklease-freies H ₂ O	4µl
Klenow-Fragment	2µl

Die Klenow-Reaktion erfolgte 30 Minuten lang bei 37°C. Das resultierende dsDNA-Template konnte nun entweder sofort zu einer radioaktiv markierten Sonde weiterverarbeitet oder zum späteren Gebrauch bei -20°C gelagert werden.

Die Bestandteile der *in vitro* Transkription, mit Hilfe derer die Radioaktiv markierte Sonde hergestellt wurde, sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Reaktionsansatz für die *in vitro* Transkription zur Herstellung einer radioaktiv markierten Northern Blot-Sonde

Komponente	eingesetztes Volumen
dsDNA-Template	1µl
10x RNA-Polymerase-Puffer	2µl
10mM ATP	1µl
10mM CTP	1µl
10mM GTP	1µl
UT ³² P (radioaktiv)	5µl
T7-RNA-Polymerase	2µl
Nuklease-freies H ₂ O	ad 20µl

Die Komponenten für die *in vitro* Transkriptionsreaktion wurden aufgrund des radioaktiv markierten UTPs unter Beachtung besonderer Schutzmaßnahmen zusammen pipettiert und für 10 Minuten bei 37°C in einem Heizschüttler inkubiert. Durch die Zugabe von 1µl DNaseI zum Reaktionsansatz wurde die Template-DNA innerhalb von 10 Minuten bei 37°C verdaut. Die resultierende, radioaktiv markierte RNA-Sonde wurde unverzüglich eingesetzt.

5.4.3.4 Spezifischer Nachweis von RNA

Die Nylonmembran, auf der nun die RNA fixiert war, wurde zur Prähybridisierung in eine Glasröhre überführt und mit Hybridisierungspuffer auf einem Drehrad in einem Wärmeofen 30 Minuten bei 50°C rotieren lassen. Anschließend wurde die zuvor hergestellte, radioaktiv markierte RNA-Sonde in den Hybridisierungspuffer zur Membran pipettiert, welche nun über Nacht bei 50°C rotierend im Wärmeofen inkubierte. Am nächsten Tag wurde der Hybridisierungspuffer samt Sonde verworfen und die Membran zuerst zweimal 15 Minuten mit einem Hochsalzpuffer (5x SSC, 1% SDS) und anschließend zweimal 15 Minuten mit einem Niedrigsalzpuffer (1x SSC, 1% SDS) gewaschen. Die Membran wurde nun in Folie verpackt und meist über Nacht in einer Kassette auf einen Phospho-Imager-Screen exponiert. Die Dokumentation erfolgte mit einem PhosphoimagerTM-Typhoon Scanner (Molecular Dynamics).

5.4.3.5 Stripping der Nylonmembran

In dieser Arbeit wurden Northern Blots auch mehrfach mit verschiedenen Sonden hybridisiert. Hierfür wurde die Membran, nachdem sie gescannt wurde, wieder in eine Glasröhre gegeben und für ca. drei Stunden bei 70°C mit Stripping-Puffer im Wärmeofen rotieren lassen. Zur Kontrolle des „Strippens“ wurde die Membran erneut über Nacht auf einen Phospho-Imager-Screen exponiert und am nächsten Tag mit einem PhosphoimagerTM-Typhoon Scanner gescannt. Nach erfolgreichem Entfernen der ersten Sonde konnte eine erneute Prähybridisierung geschehen und eine weitere, radioaktiv markierte Sonde konnte in den Hybridisierungspuffer zur Membran gegeben werden.

Der Stripping-Puffer löst die Bindung der Sonden von der auf der Membran fixierten RNA wieder auf. Dieser Prozess funktioniert besonders gut bei kleinen RNAs, die im Northern Blot nachgewiesen wurden. Bei den größeren EBER-RNAs funktionierte das Strippen leider nur in geringem Maße, sodass bei einer zweiten Detektion immer noch Restsignale der ersten Sondenhybridisierung sichtbar waren.

5.4.4 cDNA-Synthese

Zur quantitativen Analyse von miRNAs mittels RT-PCR musste die entsprechende RNA zuvor in cDNA umgeschrieben werden.

5.4.4.1 DNaseI-Verdau (Alles, 2011)

Um zu verhindern, dass die RNA, welche zu cDNA-Synthese eingesetzt wurde, mit DNA verunreinigt war und somit das Ergebnis einer folgenden quantitativen PCR wohlmöglich verfälscht wurde, musste die RNA DNaseI (Invitrogen) verdaut werden.

Tabelle 20: Komponenten eines DNaseI-Verdaus zur cDNA-Synthese

Komponente	eingesetztes Volumen
RNA	1 µg
10x DNaseI Reaktionspuffer	1 µl
DNaseI (amplification grade)	1 µl
Nuklease-freies H ₂ O	ad 10 µl

Der Reaktionsansatz (Tabelle 20) wurde 15 min bei Raumtemperatur zur Inkubation stehen gelassen. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion wurden 2 µl 25mM EDTA hinzugefügt, gemischt und weitere 10 min bei 65°C inkubiert.

5.4.4.2 Reverse Transkription (modifiziert nach Alles 2011)

Das Umschreiben der DNaseI-verdauten RNA in cDNA erfolgte mit dem miScript II RT Kit der Firma QIAGEN. MiRNAs weisen im Allgemeinen, im Gegensatz zu mRNAs keine polyadenylierte Sequenz auf. Während der reversen Transkription wurde eine solche Sequenz enzymatisch durch die Poly(A)-Polymerase, welche im miScript RT-Mix des Kits enthalten war, angefügt. Die Reverse Transkriptase konvertierte anschließend alle RNA-Spezies, inklusive Precursor miRNA, reifer miRNA, andere kleine nichtkodierende RNAs und mRNA in cDNA mit Hilfe von Oligo-dT- und anderen Primern, welche im miScript RT-Puffer nebst Mg²⁺ und dNTPs gelöst waren. Die Oligo-dT-Primer wiesen an ihrem 5'-Ende eine universelle Mustersequenz auf, mit welcher die

Amplifikation in der RT-PCR ermöglicht wurde. Polyadenylierung und reverse Transkription liefen bei dieser Methode parallel zueinander in einem Reaktionsgefäß ab. Tabelle 21 zeigt einen typischen Reaktionsansatz zur reversen Transkription.

Tabelle 21: Zusammensetzung eines Reverse Transkriptionsansatzes

Komponente	eingesetztes Volumen
5x HiFlex-Puffer	4µl
10x Nucleics-Mix	2µl
Reverse Transcriptase-Mix	2µl
Template RNA	12µl (= ganzer DnaseI-Verdau)
Nuklease-freies H ₂ O	ad 20µl

Die Reaktion inkubierte 60 min bei 37°C und wurde durch 5 min bei 95°C abgestoppt.

Für den Einsatz der cDNA in der quantitativen RT-PCR musste diese 1:10 in Nuklease-freiem H₂O verdünnt werden. Die cDNA konnte nun entweder sofort in einer quantitativen Real-Time PCR eingesetzt werden oder bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden.

5.4.5 RNA-(Co-) Immunpräzipitation

Neben Protein-Protein-Wechselwirkungen lassen sich durch Immunpräzipitationen auch Protein-RNA-Interaktionen untersuchen. Durch Verwendung von Protein-G-Sepharose ist es möglich, Proteine oder Protein-RNA-Komplexe mittels spezifischer Antikörper aus nativen Gesamtzellextrakten zu isolieren. Dabei nutzt man die konstanten Fc-Regionen von IgG-Antikörpern, die eine hohe Affinität zu Protein-G-Sepharose besitzen, sodass Antikörper an die Sepharose gekoppelt werden können. Zunächst wurden 100µl Protein-G-Sepharose dreimal mit PBS gewaschen. Hierbei wurde durch Zentrifugation bei 2000rpm der 20%-ige Ethanol entfernt, in dem die Sepharose aufbewahrt wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Protein-G-Sepharose in 1ml PBS resuspendiert und mit 5µg gereinigtem AGO1-Antikörper, bzw. 5µg gereinigtem EBNA2-Antikörper zur Isotypkontrolle, rotierend über Nacht bei 4°C inkubiert. In dieser Zeit konnten die Antikörper an die Protein-G-Sepharose binden. Native Gesamtzellextrakte wurden aus 5x 10cm Zellkulturschalen (ca. 5×10^7) mit pSG5-EBER1/2 transfizierten HEK-293T-Zellen, bzw. 150ml (ca. 7×10^7) Raji-Zellen hergestellt. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei 10min 1200rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde wiederum in 1,5ml PBS aufgenommen. Für die Inputkontrolle wurden hiervon 100µl entnommen und mittels TriFast™ zu RNA-Extrakten weiterverarbeitet (vgl.

Abschnitt 5.4.1.). Die restliche Zellsuspension wurde wiederum pelletiert und in 1,5ml IP-Lysepuffer (incl. Proteaseinhibitoren) aufgenommen. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis folgte der Zellaufschluss mittels Ultraschall. Durch Zentrifugation (30min, 14.000rpm) wurden die nativen Proteine von Zelltrümmern getrennt. Für den Protein-Input wurden vom Überstand 50µl entnommen, mit 50µl 2x SB-Puffer versetzt, 5min gekocht und bis zur Verwendung im Western Blot bei -20°C gelagert. Der Antikörper-Sepharose-Mix wurde zunächst dreimal mit je 1ml IP-Lysepuffer gewaschen (2min, 2.000rpm). Der Rest des nativen Gesamtzellextraktes wurde für die Immunpräzipitation eingesetzt. Hierfür wurde der Extrakt auf die gewaschene, mit Antikörpern gekoppelte Protein-G-Sepharose gegeben und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. In dieser Zeit binden Proteinkomplexe an die gekoppelten, spezifischen Antikörper. Am dritten Tag wurde die Sepharose mit den gebundenen Proteinkomplexen bei 2.000rpm pelletiert und dreimal mit je 1ml Waschpuffer und einmal mit 1ml PBS gewaschen. Schließlich wurde die Sepharose mit dem Präzipitat in 100µl PBS aufgenommen. Für Western Blot-Kontrollen wurden hiervon 25µl entnommen, mit 25µl 2x SB-Puffer versetzt und 5min gekocht. Der Rest wurde in 1ml TriFast™ aufgenommen und zu RNA-Extrakten weiterverarbeitet (vgl. Abschnitt 5.4.1.). Die präzipitierte RNA wurde schließlich im Northern Blot analysiert. Die Kontrolle der Präzipitation erfolgte durch Western Blot.

5.5 Quantitative Real-Time PCR (Alles, 2011)

Die quantitative Real-Time PCR ist eine Methode, mit der Aussagen über die Expressionsmenge von miRNAs getroffen werden können. Mit dem LightCycler-Karussell-System™ und dem LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I-Kit der Firma Roche Diagnostics können miRNAs detektiert werden. Der Farbstoff SYBRGreen ist in der Lage, an doppelsträngige DNA zu binden und nur in diesem Zustand fluoresziert er. Diese Tatsache gestattet nach jedem Zyklus die Bestimmung der amplifizierten DNA-Menge in Echtzeit. In dieser PCR wurden 5'-Oligonukleotidprimer, welche für jede zu detektierende miRNA spezifisch waren und ein 3'-Primer der Firma QIAGEN eingesetzt, welche sich universell an die Poly(A)-Sequenz lagern, die während der reversen Transkription angefügt wurde. Nach dem letzten Zyklus wird das System kontinuierlich von 55°C auf 95°C erhitzt, wodurch die amplifizierte DNA in Einzelstränge denaturiert. Im denaturierten Zustand kann der Farbstoff nicht mehr binden, wodurch seine Fluoreszenzintensität schrittweise nachlässt. Mit Hilfe dieser Schmelzkurvenanalyse ist es möglich, unspezifische Produkte zu detektieren, da jedes Produkt seinen charakteristischen

Schmelzpunkt besitzt. Damit eine spätere Quantifizierung möglich ist, wurde bei jedem Lauf für jede zu testende cDNA eine Probe mitgeführt, in welcher die ribosomale 5.8s RNA amplifiziert wurde. Tabelle 22 zeigt ein Pipettierschema zum quantitativen Nachweis von miRNAs.

Tabelle 22: Reaktionsansatz einer quantitativen RT-PCR im Roche-System

Komponente	eingesetztes Volumen	Endkonzentration
H ₂ O (PCR grade)	9µl	
5x Master Mix	4µl	1x
5'-Primer (MWG Eurofins)	1µl	0,5µM
3'-Primer (QIAGEN)	1µl	0,5µM
cDNA (1:10)	5µl	

Der Master Mix enthält die FastStart *Taq* DNA-Polymerase, sowie Reaktionspuffer, MgCl₂, den SYBR Green I Farbstoff und dNTPs. Das Programm, welches zur Amplifikation von miRNAs verwendet wurde, ist in Tabelle 23 aufgelistet.

Tabelle 23: Programm-Settings zur Amplifikation von miRNAs im Light Cycler

Acquisitionsmodus	Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer	Slope
nein	1	Präinkubation	95°C	10 min	20°C/sec
nein nein einmal	65	Amplifikation: Denaturierung Annealing Elongation	95°C 68°C 72°C	10 sec 5 sec 6 sec	20°C/sec 20°C/sec 5°C/sec
kontinuierlich		Schmelzkurve	95°C 55°C 95°C	15 sec	20°C/sec 20°C/sec 0,1°C/sec
nein	1	Abkühlen	40°C	30 sec	20°C/sec

5.5.1 Relative Quantifizierung (Alles, 2011)

Die relative Quantifizierung von qRT-PCRs wurde mittels 5.8s rRNA bestimmt, indem die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode angewandt wurde. Zuvor musste aber die Effizienz der Primer bestimmt werden, weshalb eine vierstufige cDNA-Verdünnung vermessen wurde. Die Primereffizienz bildet sich aus dem reziproken Wert zur Steigerung der Regressionsgerade, welche aus den Ct-Werten der

Verdünnungsreihe entsteht. Die Effizienz ist in diesem Fall $E = 10^{-1/m}$. Die Formel zur Berechnung Expressionsänderung ist unten dargestellt.

Formel 2: Berechnung der Expressionsänderung einer miRNA mit Hilfe der $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Methode

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

5.6 Dual-Luciferase® Reporter Assay (Alles, 2011)

Mit Hilfe von Luciferase-Reporter-Analysen kann die Genexpression in einem zellulären System untersucht werden. In dieser Arbeit wurden diese Reporter-Analysen dazu verwendet, um Effekte von miRNAs auf 3'-UTRs von bestimmten mRNAs zu untersuchen. Durch Verwendung zweier Luciferasen (Firefly- und Renilla- Luciferase) wird ihr Substrat – Luciferin – unter Verbrauch von O_2 , Mg^{2+} und ATP in Licht umgewandelt. Im dualen Luciferase-Assay wird mit Hilfe der Renilla-Luciferase parallel die Transfektionseffizienz bestimmt, wodurch eine zusätzliche durchflusszytometrische GFP-Analyse zur Ermittlung der Transfektionseffizienz nicht mehr nötig ist. Die Renilla-Luciferase wird im hier Vektor pMIR-RNL-TK zusätzlich kodiert, ihre Expression ist allerdings unabhängig von der klonierten 3'-UTR.

Zu Beginn wurden 1×10^5 293T-Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit den jeweiligen Plasmiden co-transfiziert: je $0,8 \mu g$ Effektorplasmid mit $0,2 \mu g$ Reporterplasmid. 48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen nach Angaben des Herstellerprotokolls der Dual-Luciferase® Reporter Assays der Firma Promega. Die Zellysate wurden zur Messung 1:100 in 1xPLB verdünnt. Im Luminometer (Berthold Technologies) wurden zunächst jeweils $50 \mu l$ LARII mit $10 \mu l$ des Zellysats vermessen, indem für 10sec die Firefly-Lumineszenz detektiert wurde. Mit $50 \mu l$ Stop+Glo-Reagenz wurde die Firefly-Reaktion zum einen abgestoppt, aber auch zugleich die Renilla-Lumineszenz gemessen (10sec), denn im Stop+Glo befindet sich ihr Substrat. Normalisiert wurden die Werte der Firefly-Luciferase auf die Werte der Renilla-Luciferase, Werte der Leervektoren auf 100% und zu vergleichende Werte dazu in Bezug gesetzt. Mittels t-Test (SigmaPlot 10.0) wurde die Signifikanz der relativen Werte im Vergleich zu ihren Kontrollen ermittelt. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

5.7 Proteintechniken

5.7.1 Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten

Proteinextrakte aus Zelllinien wurden mittels 2x Sample Buffer hergestellt. Dieser enthält 3-Mercapto-1,2-propandiol, welches Disulfidbrücken reduziert, und SDS, welches ebenfalls für die Denaturierung der Sekundär- und Tertiärstrukturen von Proteinen verantwortlich ist, sodass sich ein Masse-Ladungs-Gleichgewicht einstellt. Somit ist das Laufverhalten der Proteine in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nur noch abhängig von ihrer Größe.

Zu Beginn wurden die Zellen von ihrem Kulturmedium befreit, indem es bei Monolayerzellen einfach abpipettiert wurde. Suspensionszellen mussten zuvor pelletiert (10 Minuten, 1200rpm, 4°C) werden. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, indem Monolayerzellen mit dem PBS vom Boden der Zellkulturschale vorsichtig abgespült wurden. Das Pellet der Suspensionszellen wurde zum Waschen in PBS resuspendiert. Nachdem die Zellen z. T. zum wiederholten Male pelletiert wurden, wurde das Pellet auf Eis je nach Volumen 1:2 in 2x Sample Buffer aufgenommen. Im nächsten Schritt erfolgte der Zellaufschluss mittels einer 3x5 Sekunden dauernden Ultraschallbehandlung. Im 98,5°C kochenden Wasserbad wurden die Proteine 10 Minuten lang final denaturiert. Im letzten Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 13.000rpm, 4°C) wurden die Proteine von Zelltrümmern und nicht löslichen Zellbestandteilen befreit und der resultierende Überstand als Proteinextrakt in neue Gefäße überführt.

5.7.2 Herstellung von Kern- und Zytoplasma-Proteinextrakten

Die in Abschnitt 5.4.2. hergestellten Zytoplasma- und Kern-Fractionen wurden nicht nur zu RNA, sondern auch zu Proteinextrakten weiterverarbeitet. Hierzu wurden jeweils 70µl der jeweiligen Fraktion mit 30µl 2x Sample Buffer vermischt und 10min im Wasserbad bei 98,5°C gekocht. Die Kern- und Zytoplasmaextrakte der Zelllinien LCL AM 29, LCL AM 58 und Raji für die La-Western Blots wurden ebenfalls analog 5.4.2 hergestellt. Nach der Zellfraktionierung wurden die Kern- und Zytoplasmaextrakte 1:2 mit 2x Sample Buffer versetzt und 10min im Wasserbad bei 98,5°C gekocht. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte im Photometer.

5.7.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

Die Konzentration der Proteine wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 280nm bestimmt. Hierzu musste eine 1:100-Verdünnung der Proteinextrakte in 0,1N NaOH-Lösung vermessen werden. Das Volumen an Proteinextrakt, welches in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt werden sollte, wurde mit folgender Formel berechnet.

Formel 3: Berechnung der Proteinkonzentration in 2x SB-Extrakten

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

Das Ergebnis dieser Rechnung entspricht dem Volumen an Proteinextrakt, in welchem sich 30µg Protein befinden. Bis zur Elektrophorese wurden die Extrakte bei -20°C gelagert.

5.7.4 Western Blot

Ein Western Blot diente zur Auftrennung und spezifischem Nachweis von Proteinen. Zunächst wurden Proteinextrakte in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen.

5.7.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970; Sambrook et al., 1989)

Mit einer denaturierenden SDS-PAGE (= Polyacrylamidgelelektrophorese) lassen sich Proteine in einem Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht auftrennen. Im Laufpuffer, 2x Sample Buffer und im Polyacrylamidgel befindet sich unter anderem das negativ geladene Detergenz SDS, welches sich an die hydrophoben Regionen der Proteine anlagern kann. Hierbei bindet jedes SDS-Anion zwei Aminosäurereste, woraufhin das Protein sehr stark zu seiner Masse proportional negativ geladen wird, egal welche Eigenladung das Protein zuvor aufwies. Im elektrischen Feld wandern somit alle Proteine zur Anode.

Polyacrylamidgele entstehen durch Polymerisation von Acrylamid, welches durch N,N'-Methylbisacrylamid quervernetzt wird. Diese Reaktion beginnt durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und wird durch N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. In einem Gel mit geeigneter Porengröße ist die Laufstrecke der Proteine proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Dabei ist die Porengröße abhängig vom eingesetzten Verhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid. Diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophoresen gewährleisten eine bessere Auftrennung der Proteine, indem zwei Gelsysteme mit unterschiedlicher Porengröße verwendet wurden. Das großporige obere Sammelgel sorgt für eine einheitliche Lauffront, bevor die Proteine im feinporigen unteren Trenngel aufgetrennt werden.

Zur Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels (vgl. Tabelle 24) wurden zunächst zwei saubere Glasplatten (14,5 x 16,5cm), die durch Abstandhalter voneinander getrennt waren, mit 1%-iger Agarose abgedichtet. Anschließend wurde die Trenngellösung zwischen die Glasplatten gegossen und mit H₂O_{bidest.} überschichtet, damit während der Polymerisation eine gerade Oberkante entstehen konnte. Anschließend wurde das Wasser verworfen und die Sammelgellösung auf das bereits polymerisierte Trenngel gegossen. Damit die Entstehung von Probenaschen gewährleistet werden konnte, wurde in die noch flüssige Sammelgellösung ein Kamm eingesetzt.

Tabelle 24: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamidgelen verschiedener Porengröße

Komponente	Trenngel (8,75%)	Trenngel (10%)	Trenngel (12,5%)	Sammelgel
Trenn-, Sammelgelstock	4,0ml	4,0ml	4,0ml	1,25ml
Acrylamid (30%)	4,65ml	5,3ml	6,7ml	750µl
Bisacrylamid (2%)	1,86ml	2,12ml	2,68ml	300µl
H ₂ O _{bidest.}	5,49ml	4,58ml	2,62ml	2,7ml
APS (10%)	140µl	140µl	140µl	50µl
TEMED	14µl	14µl	14µl	20µl

Nach Polymerisation des Sammelgels wurden der Kamm und der untere horizontale Abstandhalter entfernt und das Gel zwischen den Glasplatten in eine Elektrophoresekammer gespannt. Nach Füllung der oberen und unteren Kammer mit SDS-Laufpuffer wurde je 30µg Proteinextrakt aufgetragen und die elektrophoretische Auftrennung bei 25mA für das Sammelgel gestartet. Sobald die Protein-Lauffront im Trenngel angekommen war, wurde die Stromstärke auf 35mA erhöht. Die Elektrophorese lief ca. 2 Stunden.

In jeder SDS-PAGE wurde des Weiteren ein Protein-Molekulargewichtsmarker mitgeführt, um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können.

5.7.4.2 Protein-Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran

Das Blotting der zuvor im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geschieht bei niedriger Ionenstärke über die Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Nitrozellulose. Die funktionelle Aktivität und Immunreaktivität der Proteine bleibt hierbei erhalten, wodurch der Gebrauch von spezifischen Antikörpern zum Proteinnachweis gestattet ist. Antikörper können entweder radioaktiv, durch Chemilumineszenz oder Fluoreszenz nachgewiesen werden. Der Aufbau eines Western Blots erfolgte in einer mit Towbin-Transferpuffer gefüllten Wanne unter Ausschluss von Luftblasen innerhalb eines PVC-Gitters in folgender Reihenfolge: ein Schwammtuch, zwei Filterpapiere, SDS-Polyacrylamidgel, Protran™-Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell), zwei Filterpapiere, ein Schwammtuch. Der Proteintransfer wurde in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer (LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit) für 90 Minuten bei 350mA durchgeführt.

5.7.4.3 Spezifischer Nachweis von Proteinen

Nachdem die Proteine auf die Nitrozellulosemembran geblottet wurden, wurden sie in einem PonceauS-Bad unspezifisch angefärbt. Unspezifisches PonceauS konnte mit Leitungswasser von der Membran abgespült werden, woraufhin die Proteinbanden in den einzelnen Spuren erkennbar wurden. Die Markerspuren wurden entfernt und sofern es sich nicht um einen Prestained-Marker handelte, wurde dieser in einer Amidoschwarz-Lösung ca. 15 Minuten lang gefärbt und anschließend mit Entfärbemittel behandelt, sodass die spezifischen Markerbanden permanent sichtbar waren. Der Rest der Membran wurde mit einem Skalpell zugeschnitten und 30-60 Minuten lang in Milch (5% in PBS, bzw. siehe Tabelle 3) geblockt. Dieser Schritt gewährleistet das Absättigen unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Im Anschluss wurde die Membran mit der entsprechenden Antikörperverdünnung (siehe Tabelle 3) luftblasenfrei in Folie geschweißt und über Nacht bei 4°C taumelnd inkubieren lassen. Am nächsten Tag wurden überschüssige, unspezifisch gebundene Primärantikörper durch dreimaliges Waschen für 15 Minuten mit PBS, bzw. TBS+/- Tween20, entfernt. Zur Signalverstärkung folgte eine Inkubation mit entsprechenden Sekundärantikörpern, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Die Inkubation der Sekundärantikörper erfolgte stets in der Verdünnung 1:5000 in PBS-Milch 1 Stunde lang ebenfalls taumelnd bei 4°C. Anschließend wurde erneut drei Mal 15 Minuten mit PBS gewaschen. Die markierten Proteine konnten nun durch eine enzymkatalysierte ECL-

Lichtreaktion (Enhanced Chemilumineszenz) detektiert werden, indem die Membran 1 Minute lang in 10ml einer ECL-Lösung inkubiert, welche zuvor mit 5µl H₂O₂ versetzt wurde.

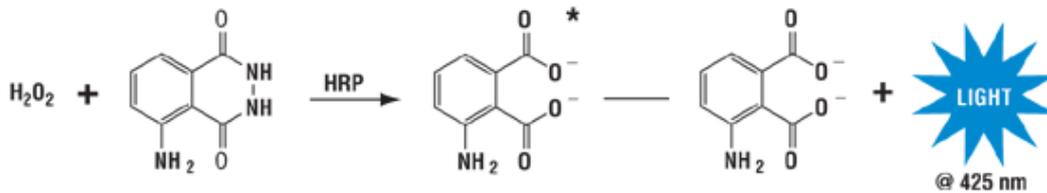


Abbildung 16: ECL-Reaktion zur Detektion HRP-gekoppelter Antikörper im Western Blot (Quelle: Thermo Scientific)

Luminol, welches im ECL-Reagenz vorhanden ist, wird durch die Zugabe von H₂O₂ unter Peroxidaseaktivität oxidiert (Abbildung 16). Es entsteht 3-Aminophtalat, welches sich in einem angeregten Zustand befindet. Dieses zerfällt zu einem Molekül mit geringerem Energielevel, indem es Lichtphotonen der Wellenlänge 425nm freisetzt. Diese Lichtemission konnte durch Auflegen eines blaulicht-sensitiven Röntgenfilms (Hyperfilm ECL™, Amersham) dokumentiert werden. Schließlich wurde der Film entwickelt, fixiert und getrocknet. Die Quantifizierung der Schwärzung der einzelnen Banden erfolgte durch die Software Quantity One (Biorad).

5.7.5 ELISA

Der ELISA (= Enzyme Linked Immunosorbent Assay) eignet sich besonders für den Nachweis sezernierter Proteine. Diese Methode macht sich die Eigenschaft von Antikörpern zu Nutze, Antigene spezifisch zu binden und beruht auf einer Farbreaktion. Bei einem sog. „Sandwich-ELISA“ ist der Boden einer Mikrotiterplatte mit einem spezifischen, gegen das nachzuweisende Antigen gerichteten, Antikörper beschichtet. Antigene in einer Probe, die bereits an die beschichteten Antikörper gebunden waren, werden dann wiederum von einem weiteren spezifischen Antikörper gebunden, an welchen ein Enzym gekoppelt wurde, welches nach Zugabe eines Substrats eine Farbreaktion katalysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Human IL-1α/ILF1 Duo Kit (R&D Systems) verwendet, um IL-1α in Zellkulturüberständen transfizierter HaCaT-Zellen nachzuweisen. Hierzu wurden die Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und 24 Stunden später transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die HaCaT-Zellkulturüberstände zunächst zentrifugiert (15min,

2.000rpm, 4°C), um Zelltrümmer zu entfernen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Nach Angaben des Herstellers wurden jeweils 100µl Überstand zur Messung eingesetzt. Darüber hinaus wurde bei jeder Messung zur Erstellung einer Eichgerade eine Verdünnungsreihe eines IL-1α-Standards von 1000 – 3,9pg/ml mitgeführt. Die Messung wurde in einem Multiplate Reader Victor X™ (Perkin Elmer) bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Wellenlängenkorrektur bei 550nm durchgeführt. Mit der Software WorkOut 2.5 erfolgte die Auswertung des ELISA.

5.8 NK/T-Zell-Isolation (modifiziert nach Alles, 2011)

5.8.1 Isolation von PBMC

Der Begriff PBMC umfasst alle mononuklearen Zellen des peripheren Blutes, wie z. B. Lymphozyten, zu denen B- und T- Lymphozyten und NK-Zellen gehören, und Monozyten wie Dendritische Zellen. Die Isolation solcher PBMCs kann entweder aus frischem heparinisierten Vollblut oder aus sog. Buffy Coats erfolgen. Buffy Coat bezeichnet ein Konzentrat aus Lymphozyten, welches mittels Zentrifugation von Vollblut entsteht. Durch vorsichtiges Überschichten des Ficoll-haltigen Lymphozyten Separationsmedium (= LSM 1077, PAA Laboratories) mit dem in PBS verdünnten Vollblut, bzw. Buffy Coat und nachfolgender Dichtegradienten-Zentrifugation (25 min, 1800 rpm, ohne Bremse) erhielt man im Reaktionsgefäß folgende Schichten: ein Zellsediment bestehend aus Erythrozyten, Granulozyten und Zelltrümmern, darüber die Ficoll-Schicht, eine oberste Schicht, welche ein Gemisch aus Plasma, PBS und Thrombozyten war und ein weißer Leukozytenring (=Interphase). Ficoll ist ein neutrales, hydrophiles Polymer aus Saccharose (ca. 400 kDa), in welchem die Zellpopulationen in einem Bereich stabilisiert wurden, der ihrer eigenen Dichte entsprach. Die Dichte der verschiedenen Zelltypen innerhalb PBMCs ist in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25: Zelltypen, innerhalb der PBMC und ihre Dichte

Zelltyp	Dichte [g/ml]
Thrombozyten	1,05
Mono- und Lymphozyten	1,07
Granulozyten	1,08
Erythrozyten	1,10

Der weiße Leukozytenring wurde anschließend vorsichtig mit einer sterilen Pipette in ein neues Gefäß überführt, wobei zu beachten war, dass so wenig Ficoll wie möglich mitgenommen wurde, da dieses Polymer äußerst zytotoxische Eigenschaften aufweist. Danach wurden die PBMC in PBS gewaschen (6min, 1600rpm) und das Zellpellet in sterilem H₂O resuspendiert, wodurch ungewollte Erythrozyten zum Platzen gebracht wurden. Nach erneuter Zentrifugation in PBS (10min, 900rpm) wurden die PBMC in 25ml sterilem H₂O aufgenommen und ihre Zellzahl in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt (siehe Abschnitt 5.2.3.).

5.8.2 Depletion von nicht-NK/T-Zellen

Die Isolation von NK/T-Zellen aus PBMC erfolgte mit dem CD56⁺CD3⁺ NKT Cell Isolation Kit, human (MACS Miltenyi Biotec). Im ersten Schritt werden alle Zellen außer den NK-Zellen und Monozyten indirekt magnetisch durch Biotin-konjugierte Antikörper und Anti-Biotin Mikrobeads markiert und depletiert.

Zunächst wurden die in 400µl MACS-Puffer (PBS pH 7,2, 0,5% BSA, 2mM EDTA) aufgenommenen PBMC 10min im Kühlschrank mit dem CD56⁺CD3⁺ NKT-Zell Biotin-Antikörper Cocktail inkubiert (100µl Biotin-Antikörper Cocktail pro 10⁸ PBMCs). Im Anschluss wurden die Zellen in 10ml MACS-Puffer gewaschen und pelletiert (10min, 300g, 4°C). Nachdem das Zellpellet wiederum in MACS-Puffer aufgenommen wurde, wurden die Anti-Biotin MicroBeads hinzugefügt. Nach einer erneuten Inkubation von 15 Minuten im Kühlschrank wurden die Zellen nochmals in MACS-Puffer gewaschen (10min, 300g, 4°C) und das Pellet in neuem Puffer aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde im Anschluss auf eine MACS[®]-Säule überführt, welche sich im starken magnetischen Feld eines MACS-Separators befand. Die magnetisch markierten Zellen wurden in der Säule zurückgehalten, wohingegen nichtmarkierte NK/T-Zellen durch die Säule hindurch flossen. Die im magnetischen Feld zurückgehaltenen Zellen wurden drei Mal mit MACS-Puffer gewaschen und der komplette Durchfluss aus der Säule aufgefangen, um die Ausbeute zu maximieren.

5.8.3 Positive Selektion von NK/T-Zellen

Die im Säulendurchfluss der Depletion angereicherten NK/T-Zellen wurden im zweiten Schritt durch magnetische CD56⁺-Beads aufgereinigt.

Der zuvor gesammelte Säulendurchfluss wurde nun erneut pelletiert (10min, 300g, 4°C) und in frischem MACS-Puffer resuspendiert. Zur Zellsuspension wurden nun die CD56⁺ MicroBeads hinzu gegeben und 15 Minuten im Kühlschrank inkubieren lassen. Nachdem die Zellen erneut drei Mal gewaschen und die Zellen in frischem MACS-Puffer aufgenommen wurden, gab man die Suspension auf eine neue Säule, die sich ebenfalls in einem starken magnetischen Feld befand. Erneut wurden die markierten Zellen in der Säule zurückgehalten, während nicht-markierte Zellen die Säule passieren konnten. Entfernte man nach dreimaligem Waschen mit MACS-Puffer zum Schluss die Säule aus dem magnetischen Feld, so konnten die CD56⁺-Zellen als positiv selektierte Zellfraktion eluiert werden. Um eine Aktivierung der CD56⁺-Zellen durch die Antikörper zu verhindern, wurde darauf geachtet, dass möglichst schnell und bei 4°C gearbeitet wurde. Zudem wurde so auch das Risiko minimiert, dass sich die Antikörper von der Zelloberfläche ablösen und dass Zellen unspezifisch markiert werden.

5.9 Illumina Hochdurchsatz-Sequenzierung von cDNA-Banken

Die Herstellung der cDNA-Banken und die nachfolgende Hochdurchsatz-Sequenzierung erfolgte am Max Planck Genomzentrum Köln. Im Folgenden werden die Methoden kurz erläutert.

5.9.1 Herstellung der cDNA-Banken (modifiziert nach Alles, 2011)

Aus den Zelllinien SNK6 und SNT16 sowie den primären NK/T-Zellen wurde zunächst die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und die kleine RNA-Fraktion (19-29 Nukleotide) aus dem Gel eluiert. Die eluierte RNA wurde anschließend an ihrem 5'- und 3'-Ende mit Adaptoren ligiert. In den 3'-Adaptoren waren zusätzlich noch sog. Barcodes enthalten. Hierbei handelte es sich um eine Sequenz bestehend aus vier Basen. Die Verwendung solcher Barcodes ermöglichte die Sequenzierung mehrerer Proben gleichzeitig, indem die Sequenzen anschließend den Barcodes nach sortiert und somit

den verschiedenen Proben zugeordnet werden konnten. Der RNA-Adapter, der mit dem 5'-Ende der miRNAs ligiert werden sollte, ist an seinem 5'-Ende modifiziert. Er trägt hier eine Hydroxygruppe statt einem Phosphat. Danach erfolgte die reverse Transkription der modifizierten RNA zur cDNA. Eine Skizze der Abläufe zur Erstellung einer cDNA-Bank zur Illumina-Sequenzierung ist in Abbildung 17 aufgeführt.

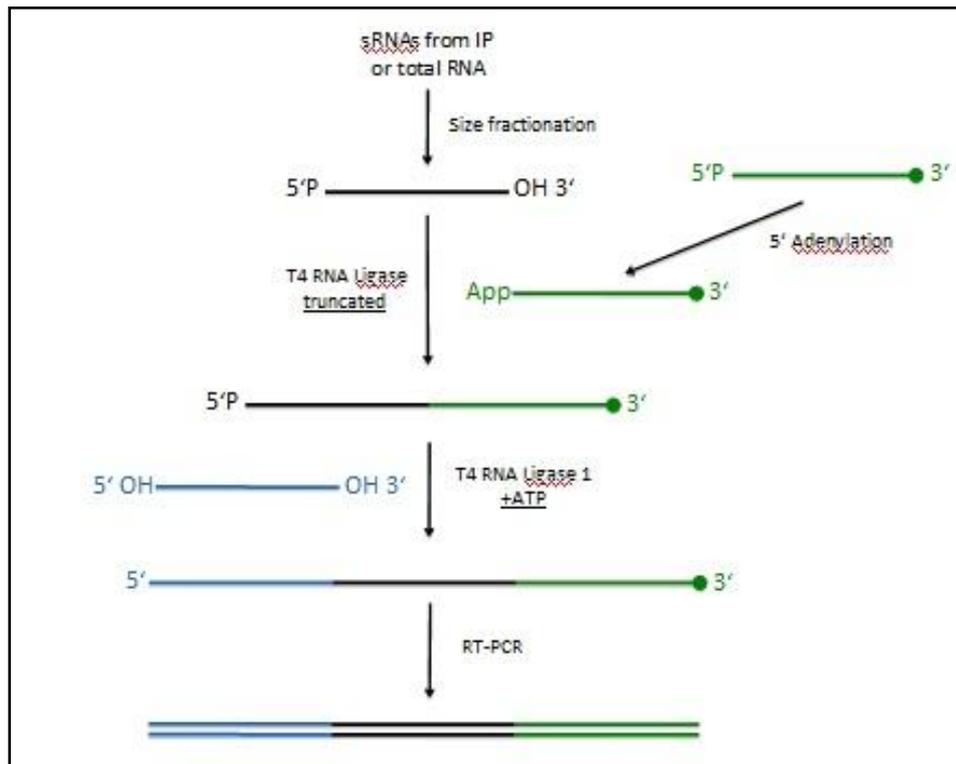


Abbildung 17: Schematischer Ablauf der Probenvorbereitung für die Illumina-Sequenzierung einer cDNA-Bank

Zu sequenzierende RNA wurde zunächst im Gel anhand ihrer Größe fraktioniert. Die Fraktion der kleinen RNAs wurde anschließend extrahiert und mit 5'- und 3-Adaptoren ligiert. Die durch reverse Transkription entstandene cDNA konnte schließlich sequenziert werden.

5.9.2 Illumina-Sequenzierung

Die Hochdurchsatz-Sequenzierung wurde mit gleichen Mengen cDNA im Illumina HiSeq 2500-System durchgeführt.

5.9.3 Auswertung der Sequenzierdaten

Die primäre Auswertung der Sequenzdaten erfolgte durch Herrn Norbert Eichner (Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin, Lehrstuhl für Biochemie I) in der AG Prof. Dr. Gunter Meister mit einer dort entwickelten Software. Diese Software machte es möglich, die Sequenzen anhand verschiedener Barcodes in den Adaptern zu sortieren. Außerdem wurden während des Sortierens die Adaptersequenzen entfernt, woraufhin ein Abgleich der miRNA-Sequenzen mit miRBase (<http://www.mirbase.org>) möglich war. Die gelieferten Daten enthielten bereits alle Informationen über die Anzahl der miRNA-Reads in jeder cDNA-Bank sowie die relativen Expressionen und die Expressionsänderungen der miRNAs in den Zelllinien verglichen mit der Expression in den primären NK/T-Zellen. Zusätzlich wurden die Sequenzrohdaten der cDNA-Banken der Zelllinien noch mit den Sequenzen der EBER-RNAs abgeglichen. Die weitere Auswertung und Erstellung von Balkendiagrammen wurde mit Excel 2010 (Microsoft) durchgeführt.

6 Ergebnisse

6.1 Fragestellung

Das Epstein-Barr Virus ist neben lebenslangen latenten Infektionen vor allem für seine onkogenen Eigenschaften bekannt. Abgesehen von viruskodierten onkogenen Proteinen wird auch EBV-kodierten miRNAs tumorförderndes Potenzial zugesprochen. Darüber hinaus wurde ein EBV-viraler Einfluss auf Expressionsmuster zellulärer miRNAs ermittelt. Einige EBV-assoziierte Karzinome, darunter DLBCL, NPC und Magenkarzinome, wurden bereits hinsichtlich ihrer miRNA-Profile analysiert (Azevedo de Andrade et al., 2014; Cosmopoulos et al., 2009; Imig et al., 2011; Marquitz et al., 2014). In einer vorangegangenen Arbeit wurde außerdem der Einfluss eines durch EBV-Infektion veränderten miRNomes auf die Tumorigenese von NK/T-Zelllymphomen untersucht (Motsch et al., 2012). Durch das Erstellen von miRNA-Expressionsprofilen primärer NK/T-Lymphome, die aus Patienten isoliert wurden, und Thymus, konnten differenziell exprimierte miRNAs bestimmt werden. Die Wahl von Thymus als Kontrollgewebe wurde vor Beginn der vorliegenden Arbeit kontrovers diskutiert. Daher sollte nun die Verwendung von primären, aus Blut gesunder Personen, mittels magnetischer Beads isolierter, CD56⁺CD3⁺ NK/T-Zellen als korrespondierendes Kontrollgewebe untersucht werden. Weiterhin sollten die Zelllinien SNK6 und SNT16, die aus primären NK/T-Lymphomen etabliert wurden, verwendet werden, da die Aggressivität und Seltenheit dieser Lymphome, besonders in Europa, die Möglichkeit, die Entstehung und Progression der Tumore zu erforschen, sehr stark limitiert. Aus den kleinen RNA-Fractionen primärer, aus Blut isolierter, NK/T-Zellen und der Lymphom-Zelllinien SNK6 und SNT16 sollten cDNA-Banken hergestellt werden, die mittels Illumina-Technologie sequenziert werden sollten. Mit Hilfe dieser Daten sollten deregulierte zelluläre miRNAs identifiziert werden und die Funktion dieser miRNAs während der NK/T-Zelllymphom-Tumorigenese sollte durch die Bestimmung von miRNA-Zielgenen analysiert werden.

Da sich der EB-virale Einfluss zur Tumorentstehung bzw. -progression nicht ausschließlich auf miRNAs bezieht, wurde in die vorliegende Arbeit des Weiteren die Analyse der nicht-proteinogenen, viralen RNAs EBER1 und EBER2 miteinbezogen. Die Anwesenheit bisher unbekannter, kurzer EBER1/2-Fragmente in EBV-infizierten Zellen sollte bestätigt werden. Einflüsse von EBER1 und EBER2 während der miRNA-abhängigen Regulation von Targets sollten schließlich weitere Hinweise auf die Funktion und Rolle des Epstein-Barr Virus bei der Etablierung seiner latenten Infektion und Entstehung von Tumoren liefern.

6.2 Illumina Hochdurchsatz-Sequenzierung von primären NK/T-Zellen und den Tumor-Zelllinien SNK6 und SNT16

6.2.1 Herstellung der cDNA-Banken aus primären Zellen und Zelllinien

Primäre CD56⁺CD3⁺ NK/T-Zellen wurden durch MACS-Methodik aus peripherem Blut isoliert. Aus diesen und den nasalen NK/T-Zelllymphom-Linien SNK6 und SNT16 wurde Gesamt-RNA extrahiert. Die Weiterverarbeitung der RNA aus den CD56⁺CD3⁺ primären Zellen sowie der RNA aus den EBV-positiven NK/T-Lymphom Zelllinien zu cDNA wurde im Max Planck Genomzentrum Köln unter der Leitung von Dr. Richard Reinhardt durchgeführt.

6.2.2 Sequenzanalyse der cDNA-Banken

Die Analyse der generierten Sequenzen erfolgte an der Universität Regensburg unter der Leitung von Prof. Dr. Gunter Meister durch Herrn Norbert Eichner. Aus den drei cDNA-Banken ließen sich insgesamt 30.692.622 Sequenzen (sog. „Reads“) generieren. Davon brachte die EBV-negative NK/T-cDNA-Bank 10.931.741 Reads hervor. Die Sequenzierung der beiden EBV-positiven cDNA-Banken aus SNK6- und SNT16-Zellen erzeugten 7.987.353 bzw. 11.773.528 Gesamtreads.

Tabelle 26: Übersicht der generierten Sequenzen aus den drei cDNA-Banken

	NK/T	SNK6	SNT16	
Gesamtzahl Sequenzen	8.099.023	5.882.361	8.503.105	
Valide Sequenzen	5.393.355	2.327.119	5.674.444	
annotierte Sequenzen	985.373	931.114	1.201.213	hsa-miRs
	54	160.749	549.095	ebv-miRs
	0	2.527	17.796	EBER

Nachdem bioinformatisch die 3'-Adaptersequenzen entfernt, mehrfach vorliegende Sequenzen und Sequenzen, die der Mindestlänge von 18 Basenpaaren entsprachen, zusammengefasst wurden, wurden die verbleibenden Sequenzen mit der miRBase-Datenbank Version 20 (www.mirbase.org) abgeglichen. Dabei wurden keine Mismatches erlaubt (Tabelle 26).

Es ergaben sich nun 5.393.355 valide Sequenzen aus den primären NK/T-Zellen und 2.327.119 bzw. 5.674.444 valide Sequenzen aus den Zelllinien SNK6 bzw. SNT16. Von den validen Sequenzen konnten für die NK/T-cDNA-Bank 985.373 (18,27%) Reads humanen miRNAs zugewiesen werden. In den Zelllinien SNK6 bzw. SNT16 entsprachen 931.114 (40,01%) bzw. 1.201.213 (21,17%) humanen und 160.749 (6,91%) bzw. 549.095 (9,68%) viralen miRNAs. An Sequenzen, die den EBV-kodierten EBER-RNAs zugewiesen werden konnten, wurden in den Zelllinien SNK6 bzw. SNT16 2.527 (0,11% aller validen Sequenzen und 1,55% der EBV-Reads) bzw. 17.796 (0,31% aller validen Sequenzen und 3,14% der EBV-Reads) ermittelt.

6.2.2.1 Expressionsanalyse humaner miRNAs

Die Sequenzierung erbrachte nicht nur eine heterogene Anzahl an Rohsequenzen sondern ebenfalls eine unterschiedliche Anzahl an annotierten miRNAs (Tabelle 27).

Tabelle 27: Anzahl der annotierten zellulären miRNAs in allen drei cDNA-Banken

	NK/T	SNK6	SNT16
Annotierte hsa-miRNAs	706	512	636

Aus der cDNA-Bank der primären NK/T-Zellen konnte die größte Anzahl zellulärer miRNAs mit insgesamt 706 miRNAs annotiert werden. In den cDNA-Banken der EBV-positiven Linien SNK6 und SNT16 wurden lediglich 512 bzw. 636 verschiedene humane miRNAs annotiert.

Im Folgenden werden die relativen miRNA-Expressionen, d. h. die Reads einer einzelnen miRNA im Verhältnis zu den validen Gesamtreads innerhalb einer sequenzierten cDNA-Bank, miteinander verglichen. Weiterhin wurden zum Vergleich von primären Zellen zu Zelllinien bzw. Tumorgewebe eine relative Expression von mindestens 0,1% sowie eine mindestens zweifache Expressionsänderung vorausgesetzt. Die Illustration erfolgte mittels Balkendiagrammen, in denen die Änderungen der jeweiligen miRNA-Expression als

Logarithmus zur Basis 2 dargestellt wurde. Diese Methode hat den optischen Vorteil, dass hochregulierte miRNAs oberhalb und herunterregulierte unterhalb der x-Achse dargestellt werden können.

6.2.2.1.1 Relative miRNA-Expression in EBV-positiven NK/T-Zelllinien im Vergleich zu primären NK/T-Zellen

Nachdem die Kriterien auf die Datenliste angewendet wurden, erwiesen sich 26 zelluläre miRNAs als stark dereguliert (Abbildung 18). MiR-155-5p wies die stärkste Hochregulation unter den deregulierten zellulären miRNAs auf. Ebenso waren miR-20a-5p, -17-5p, -92a-3p, -21-5p und -let-7d-5p in beiden EBV-positiven Zelllinien deutlich induziert. Die miRNAs miR-181b-5p und miR-7-5p zeigten eine Hochregulation, jedoch nur für die Zelllinie SNK6.

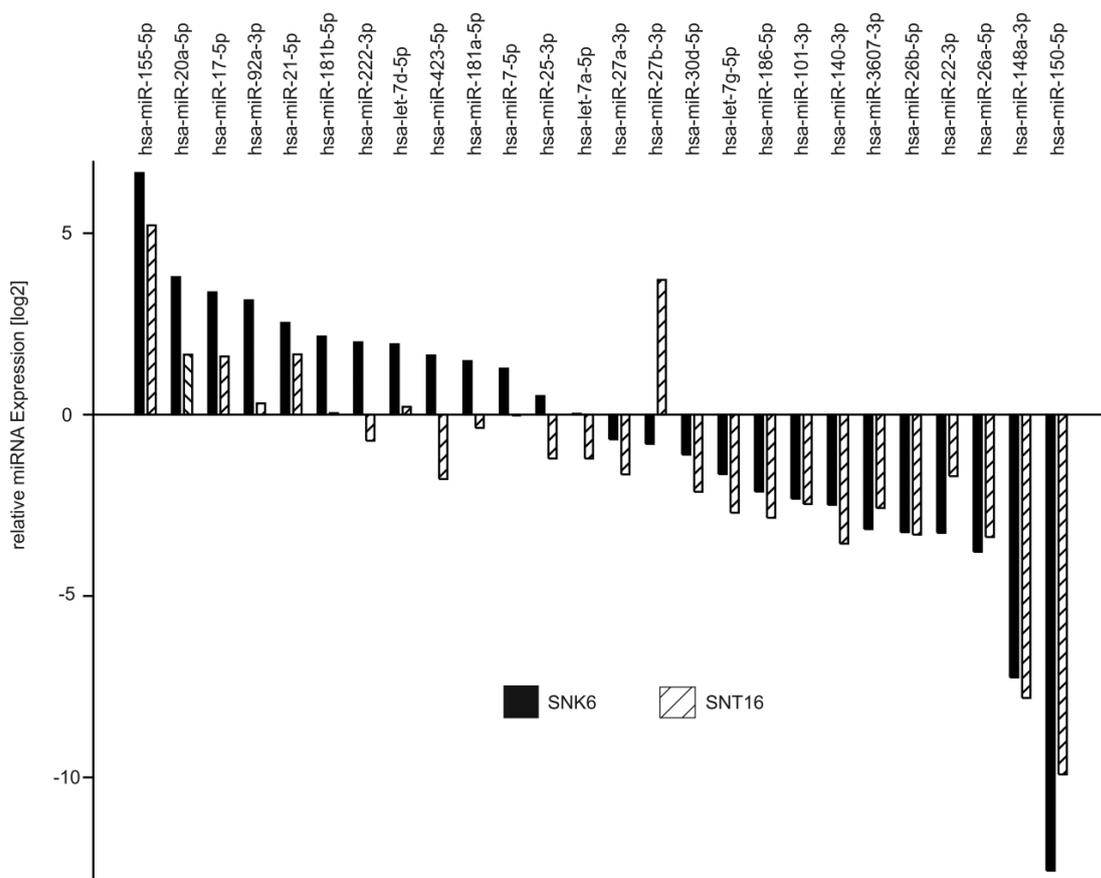


Abbildung 18: Deregulierte miRNAs in NK/T-Zelllymphom-Zelllinien

Dargestellt sind die relativen Expressionsänderungen von 26 deregulierten humanen miRNAs, welche in den EBV-positiven NK/T-Zelllinien mindestens zweifach im Vergleich zu primären CD56⁺CD3⁺-PBMC verändert waren. Schwarze Balken repräsentieren Änderungen der miRNA in der Zelllinie SNK6, schraffierte Balken stellen Expressionsänderungen einer miRNA in der Zelllinie SNT16 dar.

Die stärkste Herunterregulierung hingegen zeigte miR-150-5p. Zugleich erwies sich eine negative Deregulierung für die miRNAs miR-148a-3p, -26a-5p, -22-3p, -26b-5p, -3607-3p, -140-3p, -101-3p, -186-5p, -let-7g-5p, -30d-5p und miR-27a-3p. let-7a-5p war jedoch nur in der Zelllinie SNT16 reprimiert. Die miRNAs miR-222-3p, -423-5p, -181a-5p, -25-3p und -27b-3p wiesen in den beiden NK/T-Zelllymphom-Linien eine unterschiedliche Deregulation auf.

6.2.2.1.2 Vergleich der miRNA-Expression zwischen NK/T-Zellen, Thymus und Maus-NK-Zellen

Ein Vergleich der am stärksten exprimierten zellulären miRNAs der in den beiden Sequenzierungen bisher verwendeten Normalgewebe ist in Abbildung 19 aufgeführt. Zusätzlich wurden noch Daten einer weiteren Publikation hinzugefügt, welche die miRNA-Expression in Maus-NK-Zellen untersuchte (Fehniger et al., 2010).

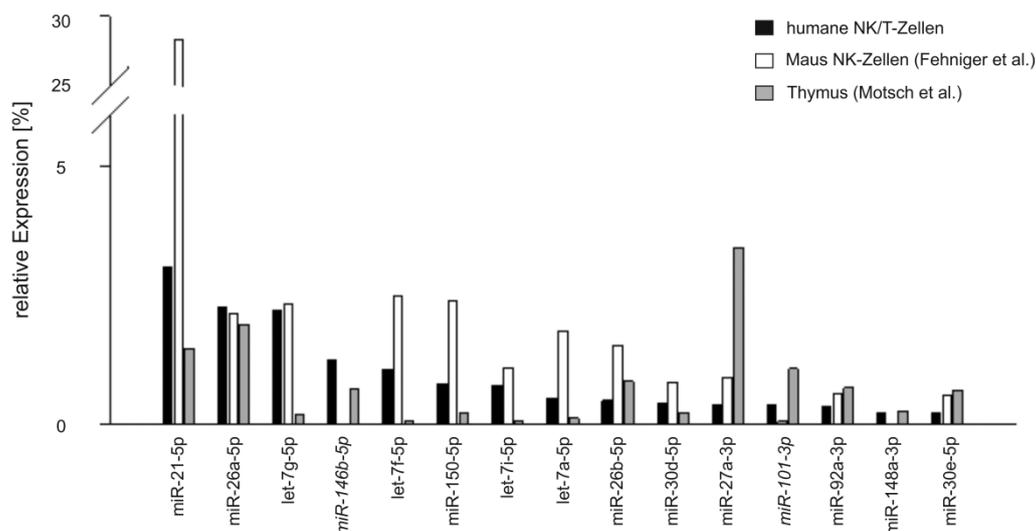


Abbildung 19: Top zehn miRNAs in primären NK/T-Zellen vs. Maus-NK-Zellen vs. Thymusgewebe

Dargestellt sind die zehn miRNAs, die in humanen CD56⁺CD3⁺-PBMC die stärkste relative Expression aufwiesen und die entsprechenden relativen Expressionen in murinen NK-Zellen bzw. Thymusgewebe. Schwarze Balken repräsentieren die relative miRNA-Expression in humanen primären NK/T-Zellen, weiße Balken stehen für die relative Expression muriner miRNAs, die eine Homologie zu den entsprechenden humanen miRNAs aufweisen (Fehniger et al., 2010) und graue Balken zeigen die relative miRNA-Expression in Thymusgewebe (Motsch et al., 2012). *Anm. miR-146b: Die Sequenzierdaten aus dem Thymusgewebe galten aufgrund von Homologien für die miRNAs miR-146b-5p und miR-146a.* *Anm. miR-101: Unter den murinen miRNAs unterscheidet man zwischen miR-101a, -101b und -101c, während man unter den humanen miRNAs lediglich miR-101-5p und -3p findet. Aus diesem Grund wurden die Daten für eine murine miR-101 ausgelassen.*

Die in humanen NK/T-Zellen am stärksten exprimierte miR-21-5p war ebenfalls in Maus-NK-Zellen am stärksten exprimiert. MiR-26a-5p und -92a-3p zeigten in allen drei cDNA-Banken

eine ähnlich starke Expression. Die im Thymus relativ stark exprimierte miR-27a-3p zeigte in den beiden anderen Kontrollgeweben lediglich eine moderate Expression, während die verbleibenden aufgeführten miRNAs im Thymus auch eine abweichende Tendenz aufwiesen. Die Daten aus den Maus-NK-Zellen deckten sich hingegen größtenteils mit den relativen Werten der miRNAs aus humanen NK/T-Zellen.

6.2.2.1.3 Vergleich der miRNA-Expression zwischen NK/T-Zelllinien und NK/T-Zelllymphomen

Da es in dieser Arbeit aufgrund des vor allem in Europa sehr seltenen Vorkommens an NK/T-Zelllymphomen nicht möglich war, neben Zelllinien auch Tumorgewebe hinsichtlich des miRNA-Transkriptomes zu untersuchen, wurde ein Vergleich zwischen den neu sequenzierten Tumorzelllinien und den bereits sequenzierten NK/T-Zelllymphomen (Motsch et al., 2012) herangezogen (Tabelle 28).

Tabelle 28: Auflistung der zehn am stärksten exprimierten miRNAs in den Zelllinien SNK6, SNT16 und dem NK/T-Zell Lymphom aus der vorangegangenen Sequenzierung

SNK6		SNT16		NKTL (Motsch et al.)	
miRNA	rel. Expr. [%]	miRNA	rel. Expr. [%]	miRNA	rel. Expr. [%]
hsa-miR-21-5p	17,65	hsa-miR-21-5p	9,67	hsa-miR-16	9,09
hsa-miR-155-5p	7,75	hsa-miR-155-5p	2,85	hsa-miR-23b+23a	7,23
hsa-miR-92a-3p	3,08	hsa-miR-146b-5p	2,24	hsa-miR-21	5,87
hsa-let-7f-5p	1,69	hsa-let-7f-5p	1,00	hsa-miR-27a	5,01
hsa-miR-146b-5p	1,68	hsa-miR-27b-3p	0,59	hsa-miR-26a	4,52
hsa-let-7i-5p	1,05	hsa-let-7i-5p	0,55	hsa-miR-199a-3p+199b-3p	4,08
hsa-let-7g-5p	0,71	hsa-miR-92a-3p	0,43	hsa-miR-27b	3,31
hsa-miR-20a-5p	0,68	hsa-let-7g-5p	0,34	hsa-miR-15a	2,96
hsa-let-7a-5p	0,52	hsa-let-7a-5p	0,22	hsa-miR-26b	2,90
hsa-miR-30e-5p	0,39	hsa-miR-26a-5p	0,22	hsa-miR-145	2,31

In den untersuchten Zelllinien sind untereinander acht von den zehn am stärksten vertretenen miRNAs vorhanden. Lediglich die miRNAs miR-20a-5p und miR-30e-5p sind nicht in SNT16-Zellen vorhanden, bzw. die miRNAs miR-27b-5p und miR-26a-3p fehlen in den SNK6-Zellen. Nur drei der zehn aufgelisteten miRNAs aus dem Tumorgewebe können ebenfalls in den zehn am stärksten vertretenen miRNAs der Zelllinien gefunden werden. miR-21 befand sich unter den drei am stärksten exprimierten miRNAs in allen der drei cDNA-

Banken, miR-26a und miR-27-b wurden ebenfalls in den zehn am stärksten exprimierten miRNAs der SNT16-Zellen gefunden. Keine miRNA der let7-Familie war im sequenzierten NKTL-Gewebe (Motsch et al., 2012) so stark vertreten, dass sie zu den zehn am stärksten exprimierten miRNAs gezählt werden konnten.

6.2.2.2 Expressionsanalyse EBV-kodierter miRNAs

In EBV-positiven Zellen werden neben humanen miRNAs auch viruskodierte miRNAs exprimiert. Wie bereits erwähnt wurde, konnten in den Zelllinien SNK6 bzw. SNT16 14,72% bzw. 31,37% aller miRNA-Reads viralen miRNAs zugeordnet werden (Tabelle 26).

6.2.2.2.1 Verteilung der viralen miRNAs in den NK/T-Zelllinien SNK6 und SNT16

Mit Ausnahme der BHRF1-kodierten miRNAs wurden in den untersuchten NK/T-Zelllinien alle der 40 bekannten EBV-miRNAs detektiert (Abbildung 20).

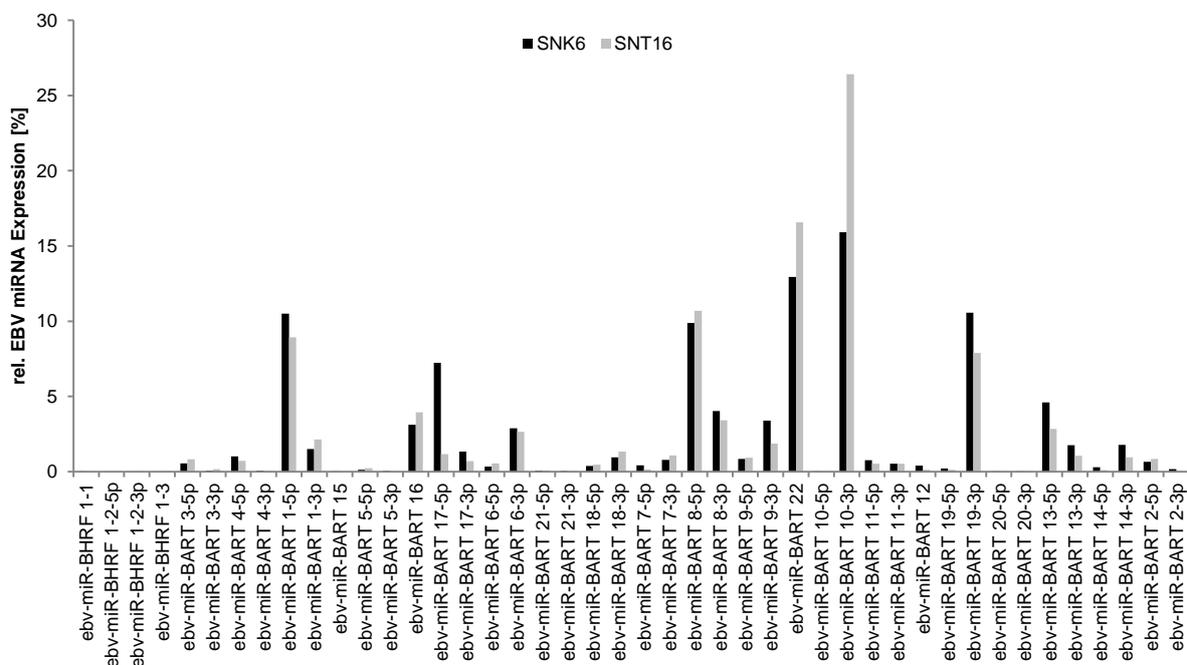


Abbildung 20: Verteilung der EBV-miRNAs in NKTL-Zelllinien

Dargestellt sind die relativen Expressionen viruskodierter miRNAs in den EBV-positiven NK/T-Zelllymphom-Zelllinien SNK6 (schwarze Balken) und SNT16 (graue Balken) in % aller validen viralen Sequenzen.

Die Zelllinien wiesen ein vergleichbares Expressionsmuster an EBV-miRNAs auf. Von den viralen miRNAs zeigte ebv-miR-BART10-3p in beiden Zelllinien SNK6 bzw. SNT16 die stärkste Expression mit 15,91%, bzw. 26,41% aller viralen miRNA-Reads. Darüber hinaus wurde ebenfalls eine sehr hohe Expression für die miRNAs ebv-miR-BART19-3p (10,57% / 7,88%), -BART22, (12,95% / 16,58%) -BART8-5p (9,89% / 10,68%) und -BART1-5p (10,49% / 8,93%) festgestellt.

6.2.2.2 Vergleich der Expression EBV-kodierter miRNAs zwischen NK/T-Zelllinien und NK/T-Zelllymphomen

Da in einer früheren Sequenzierung neben Thymus und EBV-negativen T-Zelllymphomen auch NKTL-Tumorgewebe sequenziert wurde, bot sich ein Vergleich zwischen den NK/T-Zelllymphomen und den Lymphom-Zelllinien hinsichtlich der Expression EBV-kodierter miRNAs an (Abbildung 21).

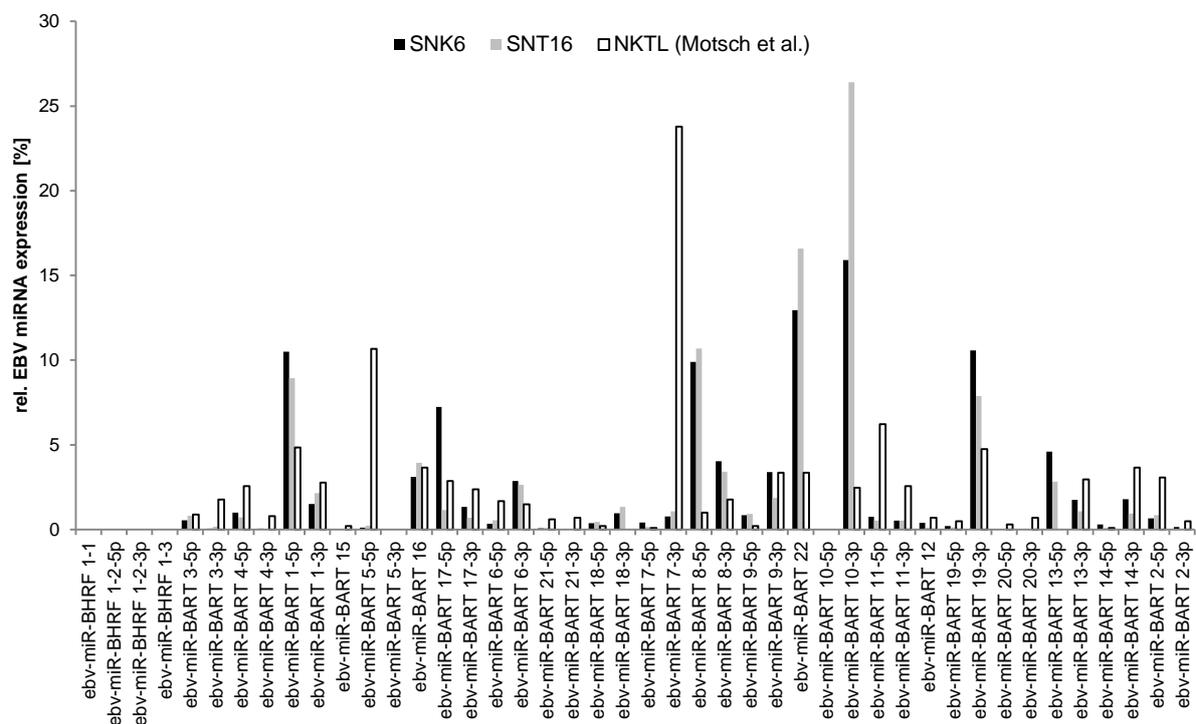


Abbildung 21: Verteilung der EBV-miRNAs in Zelllinien und Vergleich zur miRNA-Expression im Tumor
Dargestellt sind die Expressionen viraler miRNAs im Verhältnis zu allen EBV-miRNA-Reads aus den NK/T-Zelllinien SNK6 und SNT16 sowie aus dem NKTL-Tumorkollektiv der vorherigen Sequenzierung. Schwarze bzw. graue Balken kennzeichnen relative EBV-miRNA Expressionen der Zelllinie SNK6, bzw. SNT16 und weiße Balken repräsentieren die jeweilige EBV-miRNA im NKTL-Tumorgewebe aus der früheren Sequenzierung (Motsch et al., 2012).

Die im Tumor am stärksten exprimierte ebv-miR-BART7-3p zeigte in den Zelllinien nur eine geringe relative Expression. Dasselbe galt auch für ebv-miR-BART5-5p und ebv-miR-BART11-5p. Die viralen miRNAs, die in den Zelllinien die stärkste relative Expression aufwiesen, nämlich ebv-miR-BART10-3p, -BART22 und -BART8-5p, waren hingegen im sequenzierten NKTL-Gewebe nur wenig exprimiert. Eine ähnlich starke, bzw. schwache Repräsentation sowohl in den Zelllinien als auch im Tumor zeigte sich für die miRNAs ebv-miR-BART3-5p, -BART16, -BART6-3p, -BART18-5p, -BART9-3p, -BART12, -BART19-5p und -BART14-5p. Die Abwesenheit der miRNAs des BHRF1-Clusters im NKTL setzte sich auch in den Zelllinien SNK6 und SNT16 fort.

6.2.2.3 Expressionsanalyse viraler EBER-RNAs

Neben der Anwesenheit von viralen miRNAs wurden in den Sequenzdaten auch Fragmente der EBV-kodierten EBER-RNAs gefunden. Tabelle 29 zeigt einen Überblick über ermittelte EBER-Sequenzen.

Tabelle 29: Übersicht über die Gesamtzahl und Annotationen der EBER-Sequenzen in den EBV-positiven cDNA-Banken

	SNK6	SNT16
EBER1 / EBER2 - Reads	1641 / 886	8795 / 9001

Die Analyse der Sequenzier-Rohdaten ergab einen Anteil von 1,55% aller viralen Sequenzen, die in der cDNA-Bank SNK6 den EBER-RNAs zugewiesen werden konnten, und 3,14% aller viralen Sequenzen entsprachen den EBER-RNAs in der cDNA-Bank der Zelllinie SNT16. Eine genauere Untersuchung dieser Annotationen ergab nicht nur Sequenzen, die den EBERs in ihrer vollen Länge entsprachen, sondern auch eine Vielzahl an Sequenzen, die den EBER-RNAs in kürzerer Form entsprachen (Abbildung 22).

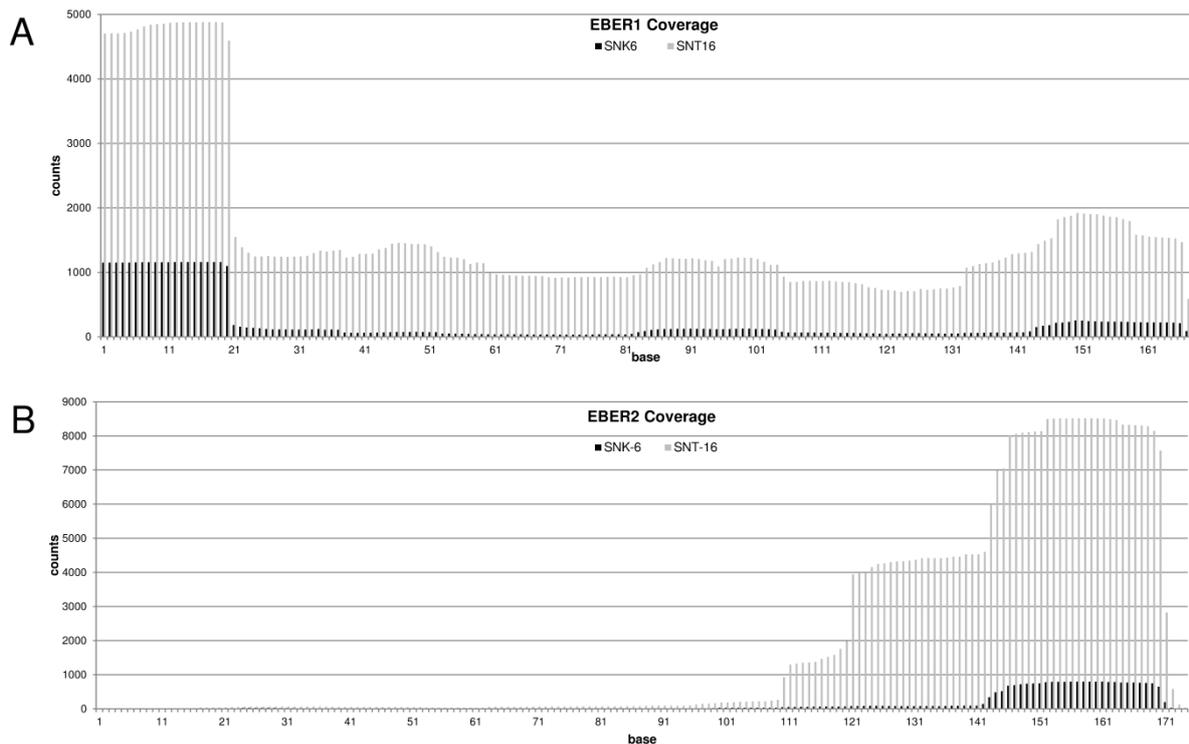


Abbildung 22: Sequenzabdeckung der EBER1/2-RNAs

A: Abdeckung der EBER1-RNA in den Zelllinien SNK6 (schwarze Balken) und SNT16 (graue Balken). B: Abdeckung der EBER2-RNA in den Zelllinien SNK6 (schwarze Balken) und SNT16 (graue Balken).

Die Sequenzen, die am häufigsten in beiden NK/T-Zelllymphom-Linien gefunden wurden, entsprachen den Nukleotiden 1-20 am 5'-Ende von EBER1. Ebenso konnten auch Sequenzen, die von EBER2 stammten, zahlreich detektiert werden. Diese deckten das 3'-Ende von EBER2 mit den Nukleotiden 143-170 ab. Neben diesen auffälligsten Sequenzen fanden sich fernerhin Fragmente verschiedenster Längen, die von EBER1 abgeleitet waren.

6.3 Analyse der Expression deregulierter miRNAs zur Validierung der Sequenzierung durch quantitative RT-PCR

Die Expressionsmuster, die die bioinformatische Sequenzdaten-Auswertung ergab, wurden anhand einer weiteren Methode untersucht. Durch quantitative Real-Time PCR wurden die Expressionen von vier deregulierten miRNAs in den Zelllinien SNK6, bzw. SNT16 im Verhältnis zu primären CD56⁺CD3⁺-PBMC ermittelt (Abbildung 23).

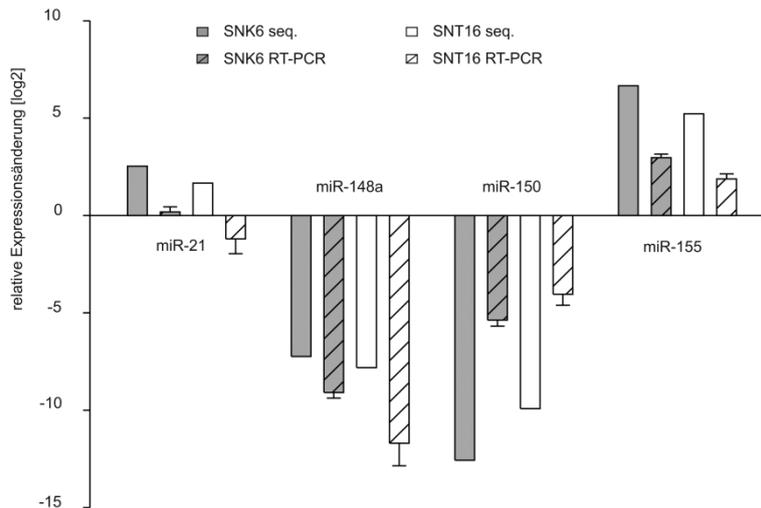


Abbildung 23: Validierung der Illumina-Sequenzdaten durch SYBR-Green qRT-PCR

Dargestellt sind die relativen Expressionsänderungen von vier laut Illumina-Sequenzierung differenziell exprimierten miRNAs. Einfarbige Balken repräsentieren die relativen Expressionsänderungen, die die bioinformatische Auswertung der Sequenzierdaten ergab, schraffierte Balken stellen relative Expressionsänderungen dar, die aus qRT-PCR-Experimenten resultieren und graue, bzw. weiße Balken kennzeichnen Daten für die Zelllinien SNK6, bzw. SNT16. Die dargestellten Daten repräsentieren drei unabhängige Experimente. Die Auswertung der qRT-PCR-Rohdaten erfolgte anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode unter Verwendung eines internen Standards (5.8s rRNA).

Für die miRNAs hsa-miR-148a und hsa-miR-150 konnte in der Sequenzierung eine starke negative Deregulation festgestellt werden. Sie sind sogar die beiden am stärksten reprimierten miRNAs, ausgehend von der bioinformatischen Auswertung der Illumina-Sequenzierung. Die starke Reprimierung der beiden miRNAs konnte anhand der qRT-PCR in beiden untersuchten Zelllinien, relativiert zur Expression in den primären NK/T-Zellen, ebenfalls beobachtet werden. Für die in der Sequenzierung stark hochregulierte hsa-miR-155 konnte mithilfe der qRT-PCR in den Zelllinien ebenfalls eine Induktion im Vergleich zu NK/T-Zellen bestätigt werden. Hsa-miR-21, die laut Sequenzierung ebenfalls unter den fünf am stärksten induzierten miRNAs vertreten war, zeigte in der qRT-PCR für die Zelllinie SNK6 nur eine leichte Hochregulation und für SNT16 eine Reprimierung.

6.4 Identifizierung von Zielgenen deregulierter miRNAs

Um die Funktion deregulierter miRNAs während der Tumorentstehung und –progression zu charakterisieren, wurde nach Zielgenen dieser miRNAs gesucht. Die bioinformatische Vorhersage anhand verschiedener Algorithmen erweist sich nach wie vor als schwierig. Es

wird nach einer bis zu sieben Nukleotiden langen Sequenz in mRNAs gesucht, die revers komplementär zum Großteil der Seed-Sequenz einer miRNA ist. In der Regel ergibt diese Suche mehrere Hundert potenzielle Zielgene, von denen einige mit höherer Wahrscheinlichkeit ein Target sein könnten als andere. Abgesehen von der Tatsache, dass meist nur eine kleine Anzahl verifiziert werden kann, können sich auch teilweise sehr schlechte Vorhersagen als wahr erweisen. Aus diesem Grund sollten solche Vorhersagen zusätzlich mit mRNA- bzw. Proteinexpressionsdaten verglichen werden (Barbato et al., 2009). Eine Korrelation von stark exprimierter miRNA und im Tumor reprimiertem Zielgen oder umgekehrt erweist sich hierbei als sehr hilfreich. Online-Datenbanken, wie z. B. „Oncomine“ (www.oncomine.org), bieten für eine Vielzahl an Tumoren mRNA-Expressionsstudien, die meist auf Microarray-Experimenten basieren. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren allerdings keine Studien über Transkriptom-Analysen zu NK/T-Lymphomen in „Oncomine“ veröffentlicht. Eine etwas umständlichere Alternative stellt die Suche nach wissenschaftlichen Artikeln über potenziell deregulierte Proteine in NKTL oder anderen Tumoren über das „National Center for Biotechnology Information“ (= NCBI) dar. Von den für sinnvoll betrachteten, potenziellen Zielgenen wurden jeweils ihre 3'UTR in einen Luciferase-Reportervektor kloniert und in dualen Luciferaseassays konnte der Einfluss der deregulierten miRNA auf ihr potenzielles Zielgen analysiert werden.

6.4.1 CUL5 als potenzielles Zielgen der miR-148a

In der Sequenzierung stellte sich hsa-miR-148a-3p als sehr stark negativ deregulierte miRNA heraus. Ein mögliches Zielgen für diese miRNA war Cullin 5 (= CUL5). Unter der Verwendung des Programms „miRecords“ (<http://mirecords.biolead.org>), welches in der Lage ist, elf verschiedene Programme, die ihrerseits eigene Algorithmen benutzen, um miRNA-mRNA-Interaktionen vorherzusagen, in einer Übersicht zu vergleichen, wurde eine Interaktion zwischen miR-148a-3p und CUL5 von sechs Vorhersage-Algorithmen bestätigt (Abbildung 24).

miRNA	Target Gene		Predictions										
			 : Interaction predicted  : Interaction not predicted ↓ Sort according to predictions made by this program										
Mature ID	Symbol	RefSeq	DIANA-microT	Micro Inspector	mi Randa	Mir Target2	mi Target	NB miRTar	Pic Tar	PITA	RNA 22	RNA hybrid	TargetScan/TargetScanS
hsa-miR-148a	CUL5	NM_003478											

Abbildung 24: MiRecords-Vorhersage über CUL5 als potenzielles Target für miR-148a
 CUL5 als Target für miR-148a wurde von sechs verschiedenen Programmen vorhergesagt.

Cullin 5 gehört zur Cullin-Familie der RING E3 Ubiquitinligasen. Es ist für die proteasomale Degradation von Proteinen verantwortlich (Petroski and Deshaies, 2005) und reguliert somit Apoptose (Kalla et al., 2007). Abbildung 25 zeigt eine Übersicht über die CUL5-3'UTR mit der für hsa-miR-148a-3p vorhergesagten Bindestelle.

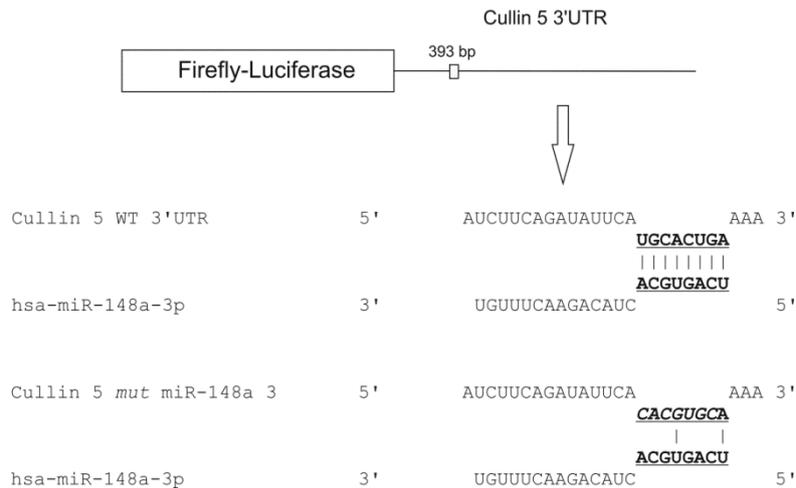


Abbildung 25: Schematische Darstellung der wildtypischen und mutierten CUL5-3'UTR

Dargestellt ist das Wildtyp-CUL5-Reportergenkonstrukt mit der Bindestelle für miR-148a-3p (oben), die Vorhersage der Interaktion zwischen 3'UTR und miR-148a-3p nach TargetScan (Mitte) sowie die Mutagenese des Reporterkonstruktes (unten). Die verwendeten CUL5-Reporterkonstrukte wurden von Dr. Martin Hart hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das Konstrukt, welches in Abbildung 25 (Mitte) skizziert wurde, wurde im Luciferaseassay eingesetzt. Bei positivem Ergebnis musste die Bindestelle für die miRNA-Seed-Sequenz entfernt, bzw. ersetzt werden, um sicher zu gehen, dass dieser Effekt alleine durch die miRNA zu Stande kam. Abbildung 25 (unten) zeigt den schematischen Überblick über die mutierte CUL5-3'UTR.

6.4.1.1 Einfluss der miR-148a auf die CUL5-3'UTR

Um die Interaktion zwischen hsa-miR-148a-3p und CUL5-3'UTR zu analysieren, wurden Dual-Luciferaseassays durchgeführt. Hierfür wurden HEK-293T-Zellen mit miRNA-Effektorplasmid und Reporterplasmid co-transfiziert und nach 48 Stunden die Analysen durchgeführt. Abbildung 26 stellt die relativen Lichteinheiten (= RLU) mit zugehörigen Standardfehlern aller gemessenen Proben dar. Die mittlere Luciferaseaktivität des

Reportergens bei Verwendung des „leeren“ Effektorplasmids pSG5 wurde dabei auf 100% gesetzt. Das Balkendiagramm repräsentiert drei unabhängige Experimente, die jeweils als Doppelansatz ausgeführt wurden.

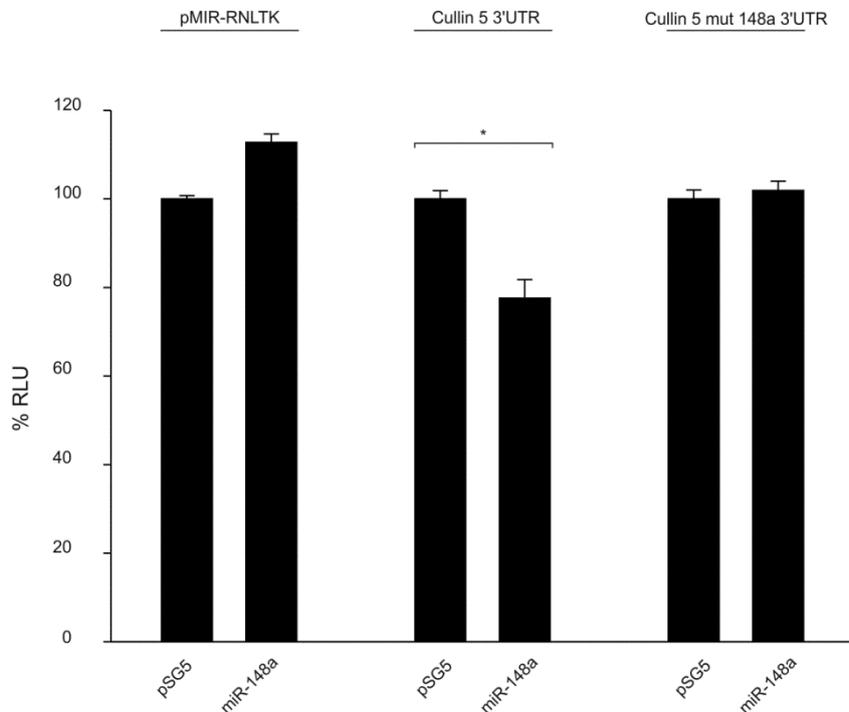


Abbildung 26: Regulation der CUL5-3'UTR durch hsa-miR-148a

HEK-293T-Zellen wurden mit je 0,2µg Reporterplasmid und 0,8µg Effektorplasmid co-transfiziert. 48h später wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivitäten ermittelt. Dargestellt sind die Werte aus drei unabhängigen Assays, die als Duplikate durchgeführt wurden, mit Standardfehlern. Die Co-Transfektion von hsa-miR-148a und der CUL5-3'UTR führte zu einer signifikant verminderten Luciferaseaktivität um 23% ($p < 0,05$). Co-Transfektion von hsa-miR-148a und der mutierten CUL5-3'UTR ergab keine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität.

Die Überexpression der hsa-miR-148a übte auf den leeren Reportervektor einen leicht induktiven Effekt aus. Wurde die hsa-miR-148a mit dem CUL5-3'UTR-haltigen Reportervektor co-transfiziert, war die relative Luciferaseaktivität signifikant um 23% erniedrigt ($p = 0,0006$). Um zu analysieren, ob diese Reduktion auf einem miRNA-spezifischen Effekt beruhte, wurde ein weiterer Reportervektor hergestellt, in dem die Bindestelle der hsa-miR-148a-3p in der CUL5-3'UTR derart verändert wurde, dass sie Seed-Sequenz der miRNA nicht mehr daran binden konnte. Die hsa-miR-148a-3p-Bindestelle wurde mittels zielgerichteter Mutagenese durch eine *Pml*-Restriktionsstelle ersetzt (Abbildung 25 unten). Die Co-Expression von hsa-miRNA-148a und dem mutierten CUL5-3'UTR Reporterkonstrukt zeigte keine signifikante Änderung der relativen Luciferaseaktivität. Dies war ein starker Hinweis, dass Cullin 5 posttranskriptional durch die hsa-miR-148a-3p reguliert wird.

6.4.1.2 Einfluss der miR-148a auf die endogene Proteinmenge von CUL5

Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob sich die posttranskriptionelle Regulation von CUL5 durch hsa-miR-148a-3p, welche bereits in Luciferase-Reporterassays festgestellt werden konnte, auch auf Proteinebene nachweisen lässt. Zu diesem Zweck wurden HEK-293T-Zellen mit hsa-miR-148a, bzw. dem pSG5-Leervektor transient transfiziert und nach 48 Stunden zu Sample Buffer-Gesamtproteinextrakten verarbeitet. Von jeder Probe wurden 30µg Protein in einem denaturierenden, 8,75%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion der endogenen Cullin 5- bzw. β -Aktin-Proteine im Western Blot erfolgte mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (Tabelle 3). Die Quantifizierung der Proteinbanden wurde mit der Software „Quantity One“ (Biorad) durchgeführt. In Abbildung 27 ist repräsentativ einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.

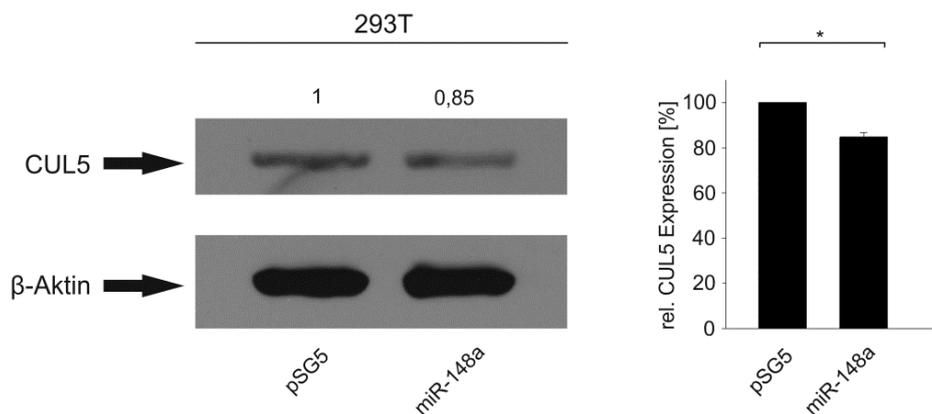


Abbildung 27: Einfluss der hsa-miR-148a auf die endogene CUL5-Proteinmenge in HEK-293T-Zellen

293T-Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils in 6-Loch Zellkulturplatten mit 2µg hsa-miR-148a-Expressionsplasmid, bzw. pSG5-Leervektor transfiziert. 48h nach Transfektion wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt, in 8,75%igen SDS-Polyacrylamidgelen zu je 30µg aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und CUL5, bzw. β -Aktin zur Ladekontrolle mittels spezifischer Antikörper detektiert. Die Quantifizierung erfolgte durch „Quantity One“ (Biorad). Die Expression des CUL5-Proteins wurde auf die β -Aktin-Expression normiert und die Expressionen des Kontrollansatzes (pSG5-Leervektor) auf 100% gesetzt. Die Überexpression von hsa-miR-148a führte zu einer Reduktion des CUL5-Proteins um 15,3% ($p = 0,0003$).

Die ektopische Expression von hsa-miR-148a führte zu einer signifikanten Reduktion der endogenen Cullin 5-Proteinmenge auf 84,7%, im Gegensatz zur Expression des Kontrollvektors ($p = 0,0003$). Zusammen mit den Luciferaseassays erbrachten die Western Blots einen weiteren Hinweis zur Bindung der hsa-miR-148a-3p an die CUL5-3'UTR und die dadurch resultierende Translationshemmung, was eine Reduktion des CUL5-Proteinniveaus zur Folge hatte.

Der Nachweis eines miRNA-Zielgens in Folge einer Sequenzierung macht nur Sinn, wenn dieses Gen auch in den entsprechenden Zelltypen exprimiert wird und die miRNA-Expression, die sich aus der Sequenzierung ergab, mit dem Proteingehalt in primären CD56⁺CD3⁺-PBMC, bzw. den NKTL-Zelllinien SNK6 und SNT16 korreliert. Zu diesem Zweck wurde die endogene CUL5-Proteinmenge in primären NK/T-Zellen und SNK6-, bzw. SNT16-Tumorzellen ermittelt. Aus isolierten NK/T-Zellen und Zellen der Lymphom-Linien SNK6 und SNT16 wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt und die Bestimmung der Menge an endogenem CUL5- und β -Aktin erfolgte im Western Blot. Abbildung 28 zeigt ein repräsentatives von drei unabhängigen Western Blot-Experimenten.

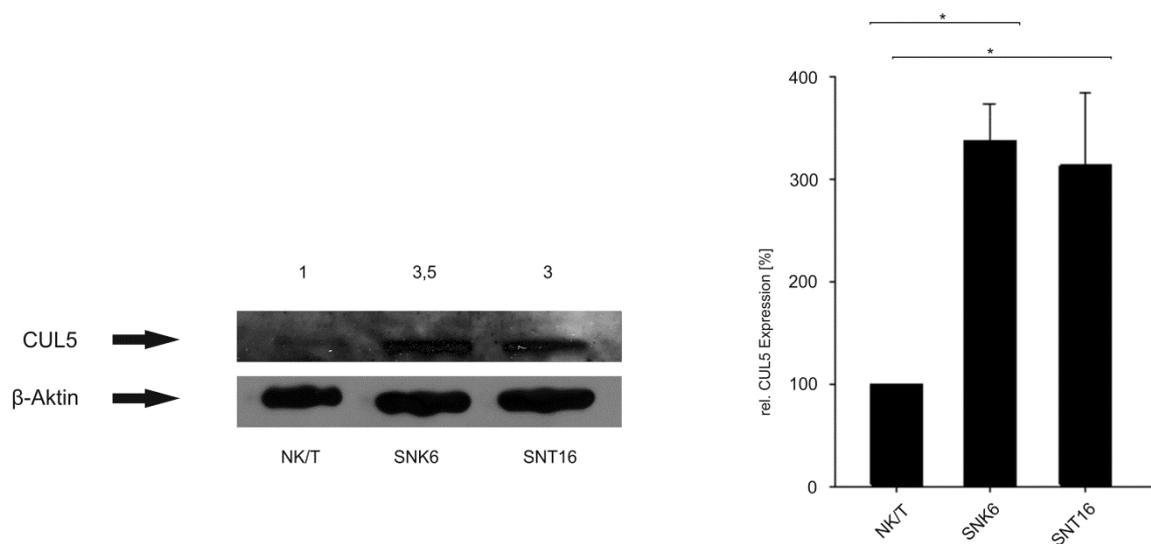


Abbildung 28: Analyse der endogenen Proteinexpression von Cullin 5 in NK/T-Zelllinien und primären NK/T-Zellen im Western Blot

Von den jeweiligen Proteinextrakten wurden 30 μ g in einem 8,75%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und CUL5, bzw. β -Aktin zur Ladekontrolle anhand spezifischer Antikörper detektiert. Die Quantifizierung der zu β -Aktin relativen Proteinmenge erfolgte mit der Quantity One-Software (Biorad). Die EBV-positiven NK/T-Zelllinien zeigen einen deutlich höheren CUL5-Proteinlevel als die EBV-negativen, primären NK/T-Zellen ($p = 0,002$, bzw. $0,016$).

In primären NK/T-Zellen war nur eine sehr schwache CUL5-Proteinbande erkennbar, jedoch konnte in den NK/T-Zelllinien eine starke CUL5-Expression nachgewiesen werden. Die Proteinexpression des CUL5-Gens in der Zelllinie SNK6 war mehr als dreifach stärker als in den primären Referenz-Zellen ($p = 0,0002$). SNT16 zeigte ebenfalls eine dreifache Induktion des CUL5-Proteins verglichen zu den CD56⁺CD3⁺-PBMC ($p = 0,016$).

6.5 Analyse der EBER-RNAs

Neben zellulären und viralen miRNA-Sequenzen ergab die Illumina-Hochdurchsatzsequenzierung der EBV-positiven NK/T-Zelllinien SNK6 und SNT16 auch Sequenzen, die von EBV-kodierten EBER-RNAs abgeleitet sind. Im Folgenden wird dieser Sachverhalt beschrieben und anschließend durch funktionelle Analysen untersucht.

6.5.1 Darstellung der prozessierten EBER-RNAs in EBV-positiven Zelllinien

Zur Bestätigung der Sequenzierungsergebnisse erfolgten zunächst Northern Blot-Experimente der sequenzierten und anderen EBV-positiven Zelllinien. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus den jeweiligen Zellen extrahiert. In einem 12%igen Urea-Polyacrylamidgel wurden je 20µg Gesamt-RNA aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und fixiert. Der Nachweis von EBER1 und EBER2 erfolgte anhand spezifischer Oligonukleotid-Sonden. Abgebildet ist einer von drei unabhängig durchgeführten Northern Blots. Abbildung 29 (links) zeigt den Nachweis der EBER1-Fragmente. In den Zelllinien SNK6 und SNT16 konnte EBER1 detektiert werden. Es waren Signale zu erkennen, die der 167 Nukleotide langen EBER1 entsprachen. Außerdem waren weitere Signale erzeugt worden, die Fragmentlängen von 70, 52 und 23 Nukleotiden entsprachen. Die EBER1-Fragmente konnten außerdem in den ebenfalls EBV-positiven Zelllinien P3HR1, B95.8 und U2932-cl3 nachgewiesen werden. In den EBV-negativen Zelllinien DG-75, U2932 und BL-41 konnten keine EBER1-Signale detektiert werden. Da für Northern Blots kein Größenstandard zur Verfügung stand, konnten die Längen der jeweiligen RNA-Fragmente nur grob abgeschätzt werden. Um das in der Sequenzierung am häufigsten vorkommende RNA-Fragment genauer in seiner Länge bestimmen zu können, wurde derselbe Northern Blot nach Exposition „gestriped“. Der Blot wurde reexponiert, um die Entfernung der EBER-Sonde zu bestätigen. Anschließend wurde eine Sonde hybridisiert, welche hsa-miR-21-5p detektiert (Abbildung 29, rechts). Die Signale für Vollängen-EBER1 waren jedoch so stark, dass diese nicht vollständig entfernt werden konnten. Die Signale für hsa-miR-21-5p dienten als Größenstandard für die EBER1-Fragmente. Die Banden der reifen miRNA lagen auf derselben Höhe wie das kurze EBER1-Fragment, welches laut Sequenzierung aus den ersten 20 Nukleotiden der EBER1 bestand.

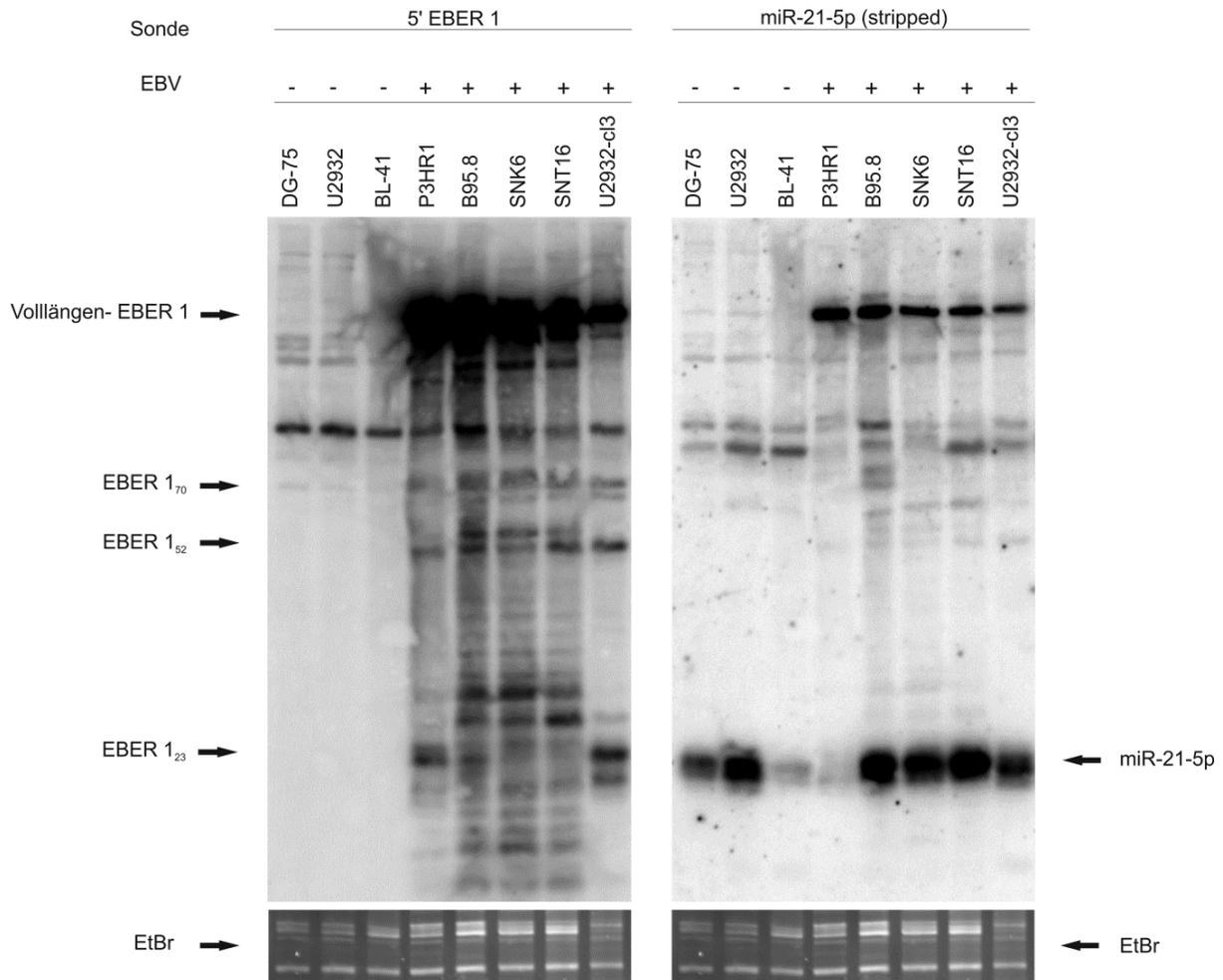


Abbildung 29: Detektion der EBER1-Fragmente in EBV-positiven Zelllinien

Dargestellt ist ein Northern Blot, für den je 20µg RNA aufgetrennt wurden. EBER1 wurde mittels einer Sonde nachgewiesen, die den Nukleotiden 1-20 entspricht (linke Seite). In allen EBV-positiven Zelllinien wurden EBER1-Fragmente verschiedenster Längen detektiert: Volllängen-EBER1, EBER1₇₀, EBER1₅₂ und EBER1₂₃. Die 5'-EBER1-Sonde wurde zum größten Teil entfernt und der Blot wurde mit einer Sonde gegen hsa-miR-21-5p rehybridisiert (rechte Seite). Eine Ethidiumbromidfärbung der t-RNA diente als Ladekontrolle.

Ein Northern Blot, der EBER2 in verschiedenen B-Zelllinien detektierte, ist in Abbildung 30 dargestellt. Die verwendete Oligonukleotidsonde war gegen die 27 Nukleotide von EBER2 gerichtet, die laut Illumina-Sequenzierung als RNA-Fragment in den Zelllinien SNK6 und SNT16 angereichert waren. Die 172 Nukleotide lange EBER2 konnte in den EBV-positiven Zelllinien P3HR1, B95.8, SNK6, SNT16 und U2932-cl3 nachgewiesen werden, nicht aber in den EBV-negativen Zelllinien DG75, U2932 und BL41. Allerdings konnten auch nach zweiwöchiger Exposition keine Signale kleinerer Fragmente, die eine Länge von miRNAs aufwiesen, detektiert werden. Bei den Banden, welche etwas unterhalb der Volllängen-EBER2 erkennbar waren, handelte es sich um unspezifische Signale, welche auf jedem Northern Blot gefärbt wurden und somit auch in Abbildung 29 auftauchten.

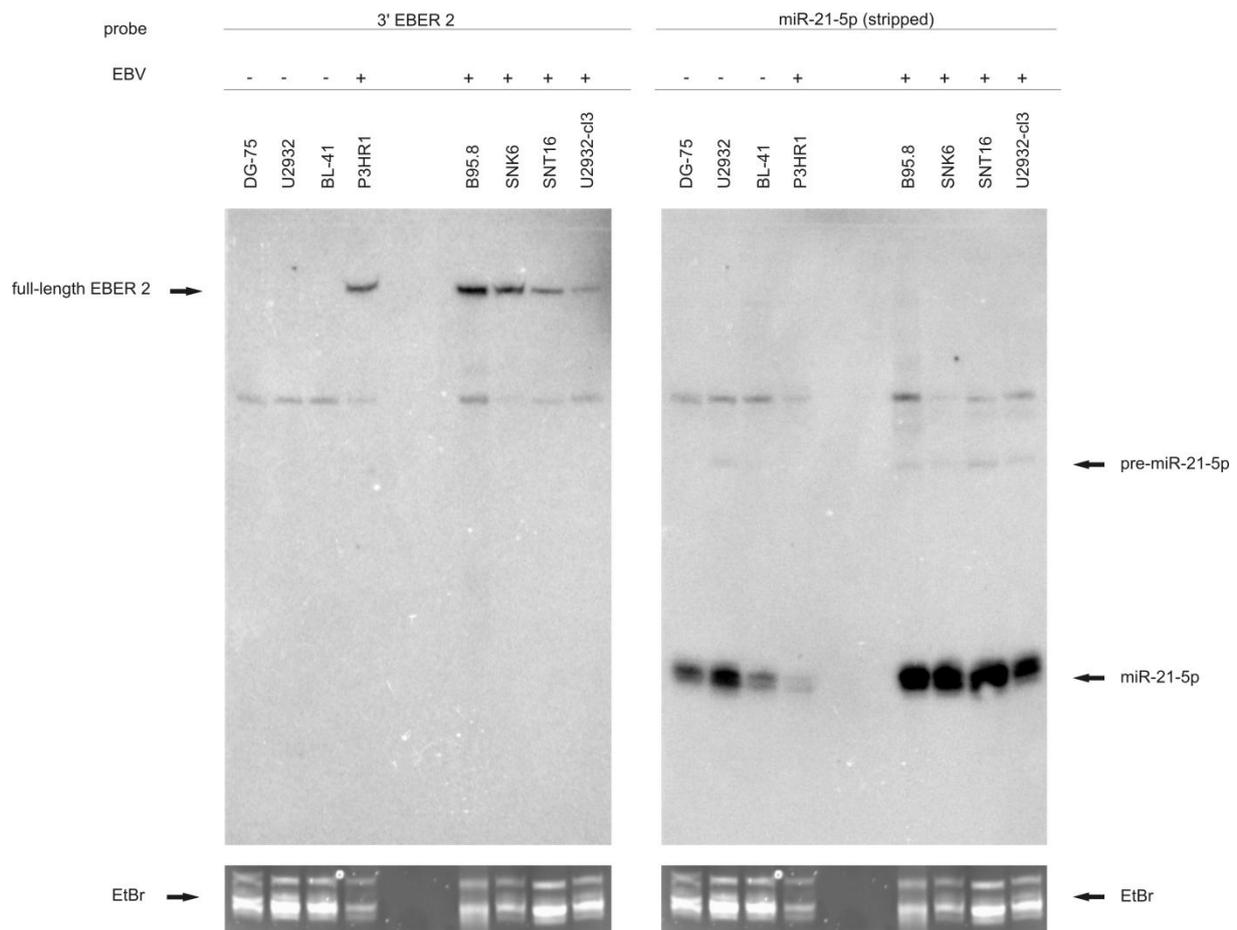


Abbildung 30: Darstellung von EBER2 in B-Zelllinien

Für den Northern Blot wurden je 20µg RNA aufgetrennt. Die Detektion von EBER2 erfolgte mittels einer Sonde, die gegen die Nukleotide 143-170 von EBER2 gerichtet war (linke Seite). EBER2 in seiner vollen Länge konnte in allen EBV-positiven Zelllinien nachgewiesen werden, nicht aber kleinere Fragmente. Die Sonde gegen EBER2 wurde anschließend komplett entfernt und der Blot mit einer Sonde gegen hsa-miR-21-5p rehybridisiert (rechte Seite). Eine Ethidiumbromidfärbung der aufgetrennten RNA diente als Ladekontrolle.

6.5.2 Subzelluläre Lokalisation der EBER1/2-RNAs

Da der Nachweis der nichtkodierenden EBER1/2-RNAs als sog. „Goldstandard“ für die Anwesenheit von EBV in (Tumor-)Zellen betrachtet wird, war auch die subzelluläre Lokalisation der Vollängen-EBERs bereits untersucht worden. Mehrere Arbeitsgruppen fanden EBER1 und EBER2 strikt im Zellkern (Fok et al., 2006a; Howe and Steitz, 1986; Teramoto et al., 1998; Wu et al., 1995), aber auch im Zytoplasma vor (Collandre et al., 1984; Rymo, 1979). Aufgrund der Tatsache, dass verschieden große EBER1-Fragmente in EBV-positiven Zelllinien existieren, wurde untersucht, ob diese Fragmente ebenfalls hauptsächlich im Zellkern lokalisiert sind. Hierfür wurden Kern- und Zytoplasmafraktionen aus EBV-positiven Raji-Zellen hergestellt und zu RNA- und Proteinextrakten weiterverarbeitet. Anschließend erfolgte ein Nachweis der EBER1 und EBER2-RNAs im Northern Blot. Zur Kontrolle der Zellfraktionierung wurden die Proteinfraktionen im Western Blot auf die

Lokalisation bekannter Kern- bzw. Zytoplasmaproteine untersucht. Es wurden insgesamt drei Raji-Zellfraktionierungen durchgeführt. Abbildung 31 zeigt ein repräsentatives Experiment.

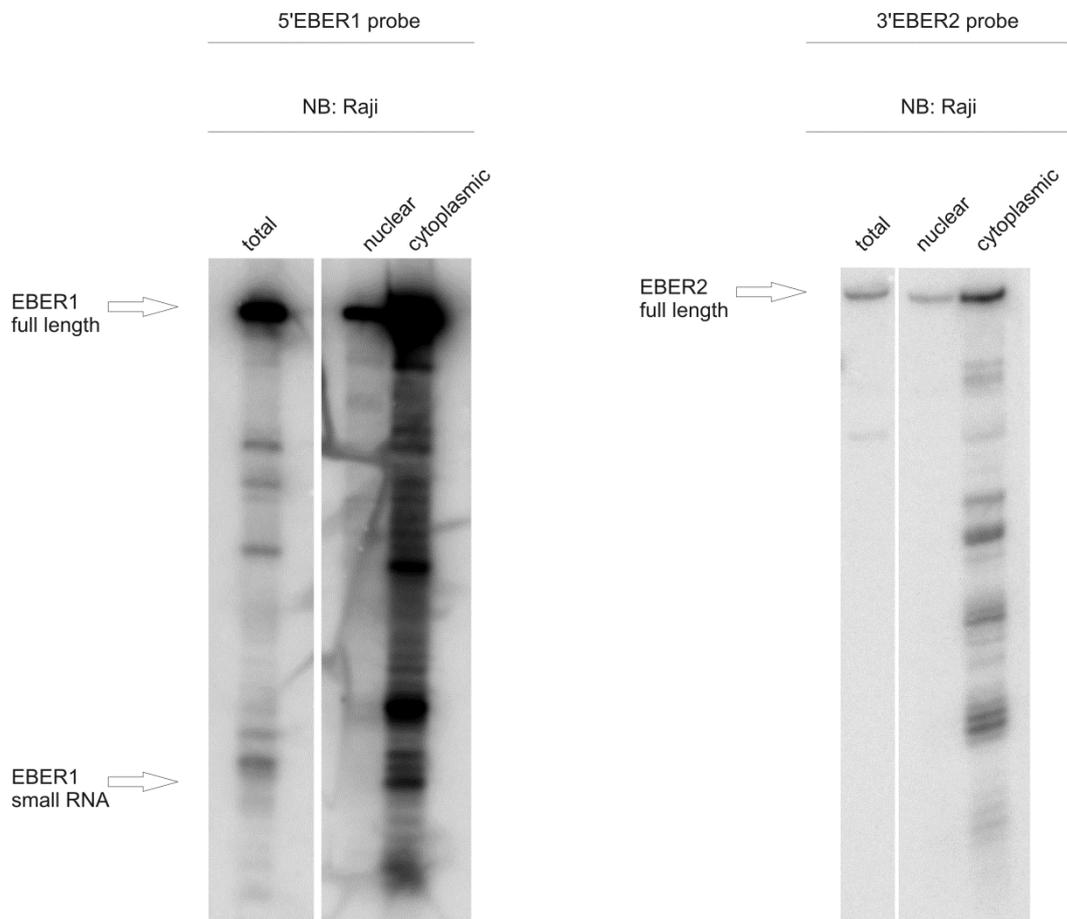


Abbildung 31: Subzelluläre Lokalisation der EBER1- und EBER2-RNAs

Northern Blots zur Analyse der Raji-Kern- und -Zytoplasmafractionen. Je 20µg RNA aus fraktionierten Raji-Zellen, bzw. Gesamt-RNA wurden im 12%igen Urea-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert, fixiert und mit Sonden gegen die Nukleotide 1-20 von EBER1, bzw. 143-170 von EBER2 hybridisiert. Das EBER1-Volllängenfragment sowie die kleineren EBER1-Fragmente konnten in Raji-Zellen überwiegend im Zytoplasma detektiert werden (linke Seite). EBER2 als 172nt langes Fragment und kleinere Fragmente wurden ebenfalls überwiegend im Zytoplasma nachgewiesen (rechte Seite).

Die Northern Blots zur Lokalisierung der kleinen EBER1/2-Fragmente zeigten, dass sowohl EBER1 als auch EBER2 in Form ihrer vollen Länge vorrangig im Zytoplasma detektiert werden. Die kleineren Fragmente der EBER1 wurden ebenfalls fast ausschließlich in der Zytoplasmafraction angefärbt. Im Fall von EBER2 waren außerdem erstmalig kürzere Fragmente nachweisbar und zwar ebenfalls in der Zytoplasmafraction. Diese kleineren Fragmente waren in der Gesamt-RNA der Raji-Zellen und auch in anderen EBV-positiven Zelllinien nicht detektierbar. Um sicher zu stellen, dass die EBER1/2-Signale in den Zytoplasmafractionen nicht aufgrund unreiner Fractionierung resultierten, wurden im Western Blot mit dem Nachweis des viruskodierten EBNA1-Proteins durch spezifische Antikörper die

Reinheit der Kernfraktionen bestimmt. Die Qualität der Zytoplasmafraktionen wurde mit dem Nachweis des α -Tubulin-Proteins durch spezifische Antikörper beurteilt (Abbildung 32).

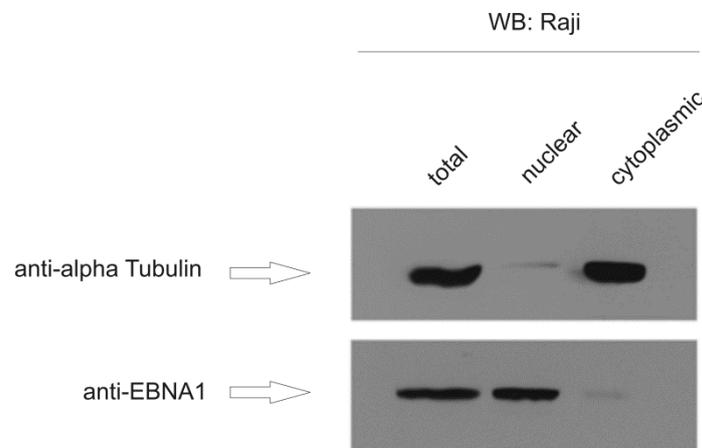


Abbildung 32: Qualitätskontrolle der Raji-Zellfraktionierung

Im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel wurden je 30 μ g der Raji-Proteinfraktionen aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. EBNA1 ist im Zellkern und α -Tubulin im Zytoplasma lokalisiert. Die Kern- und Zytoplasmaextrakte waren nur schwach mit jeweils dem anderen „kontaminiert“.

Ein repräsentatives Experiment für die Kontrolle der Raji-Zellfraktionierungen ist in Abbildung 32 dargestellt. Wie zu erkennen ist, konnte in der kernhaltigen Raji-Fraktion nur eine sehr schwache Bande des zytoplasmatischen α -Tubulins nachgewiesen werden. In der Zytoplasmafraktion hingegen ist nur eine geringe Menge an EBV-kodiertem EBNA1-Kernprotein detektierbar. Diese Kontrolle war ein Hinweis darauf, dass die starken EBER1/2-Banden in den RNA-Extrakten der Zytoplasmafraktion nicht durch ungenaue Trennung der Zellkompartimente zu Stande kamen.

6.5.3 EBER-RNAs als Bestandteil des AGO1-Komplexes

6.5.3.1 Co-Immünpräzipitation von Ago1 und EBER1/2 aus HEK-293T-Zellen

Nachdem die EBER1/2-RNAs im Zytoplasma von EBV-positiven B-Zellen nachgewiesen werden konnten, wurde die biologische Funktionalität der kleinen EBER1/2-Fragmente analysiert. Yamakawa und Kollegen publizierten eine Studie, in der die selektive Bindung von kleinen RNAs an Ago1 in B-Zellen nachgewiesen werden konnte (Yamakawa et al., 2014). Aufgrund dieser Publikation wurde analysiert, ob sich die kleinen EBER1/2-

Fragmente ebenfalls im Komplex mit Ago1 befinden. Zu diesem Zweck wurden zunächst HEK-293T-Zellen in 10cm-Zellkulturschalen ausgesät und transient mit Ago1- und EBER1/2-Expressionsplasmiden co-transfiziert. 48h nach Transfektion wurden Ago1- bzw. EBNA2-RNA-Co-Immünpräzipitationen durchgeführt. Im Northern Blot wurde analysiert, ob sich EBER1, bzw. EBER2 und ihre kürzeren Fragmente im Komplex mit Ago1 befinden. Zum Nachweis, dass funktionelles Ago1-Protein präzipitiert wurde, wurde die Membran „gestriped“, mit einer Sonde gegen eine miRNA, von der man weiß, dass sie im Komplex mit Ago1 vorzufinden ist, rehybridisiert und reexponiert. Western Blots wurden durchgeführt, um zu demonstrieren, dass zum einen die Präzipitation von Ago1 erfolgreich war und zum anderen in den Ansätzen der EBNA2-Isotypkontrolle kein Ago1 präzipitiert wurde.

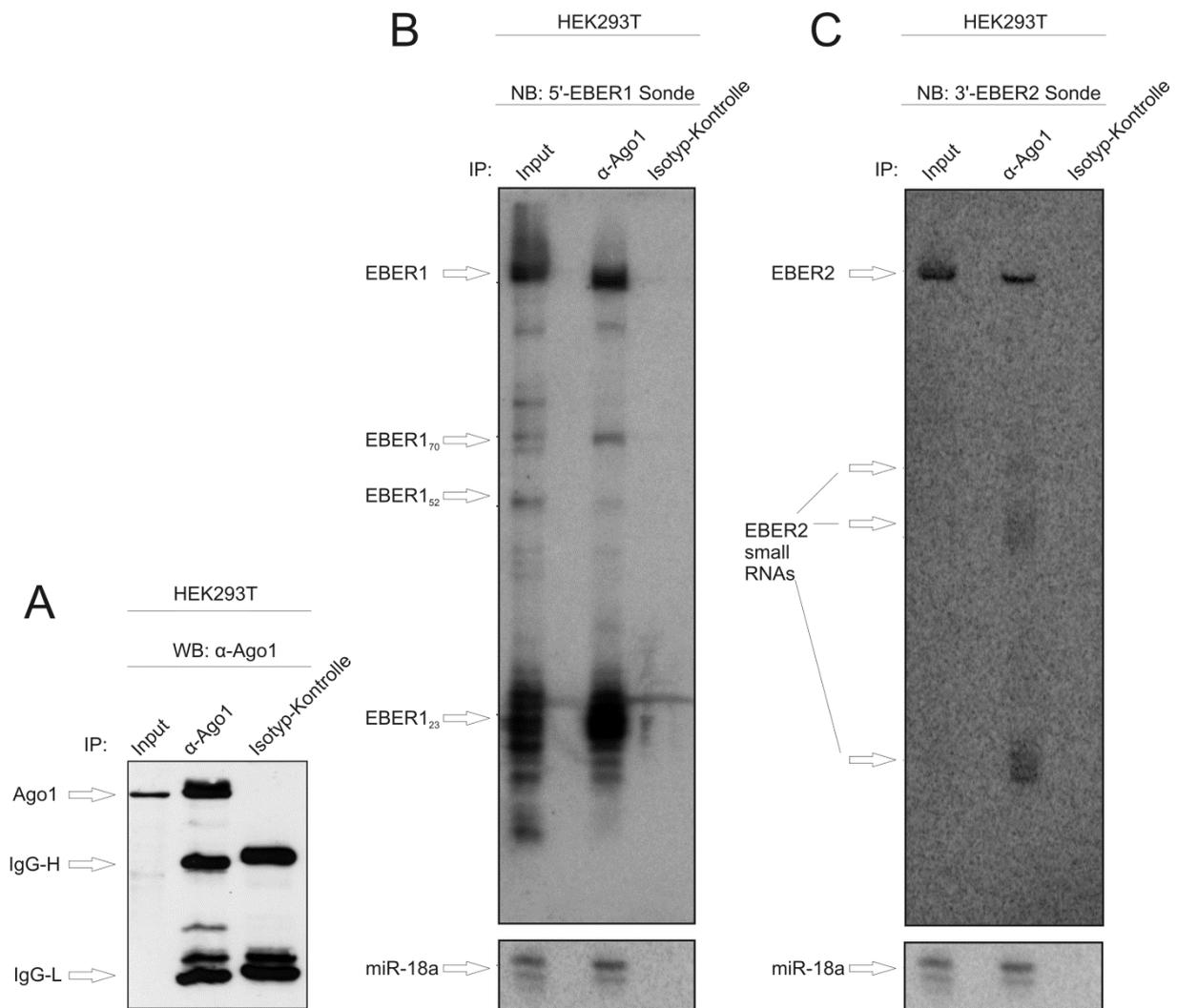


Abbildung 33: Ago1 Co-Immünpräzipitation von EBER1/2 in HEK-293T-Zellen

HEK-293T-Zellen wurden in 10cm Zellkulturschalen ausgesät und mit je 4 μ g Ago1 und EBER1/2 co-transfiziert. 48h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und mit an Antikörpern gekoppelte Beads inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden parallel Protein- und RNA-Extrakte hergestellt und im Western und Northern Blot analysiert. A: Kontrolle der Ago1-Co-IP im Western Blot. Je 25 μ l Probe wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und Ago1 mithilfe spezifischer Antikörper detektiert. B und C: Northern Blot der Ago1-Co-IP. 10 μ l RNA-Extrakt wurden im 12%igen Urea-Polyacrylamidgel aufgetrennt,

auf eine Nylonmembran transferiert und fixiert und mit einer Oligonukleotidsonde, die gegen die Nukleotide 1-12 von EBER1 (B), bzw. mit einer Oligonukleotidsonde, die gegen die Nukleotide 143-170 von EBER2 gerichtet war (C), hybridisiert. Als weitere Kontrolle der IP wurde derselbe Blot gestripped und mit einer Oligonukleotidsonde gegen hsa-miR-18a rehybridisiert. Sowohl Vollängen-EBER1 als auch die kürzeren Fragmente EBER1₇₀, EBER1₅₂ und EBER1₂₃ konnten mit α -Ago1 präzipitiert werden, nicht aber mit der EBNA2-Isotypkontrolle. EBER2 konnte ebenfalls sowohl als Vollängen-RNA, als auch als kürzere Fragmente nachgewiesen werden. Diese Experimente wurden von Hannes Borchardt im Rahmen seiner Masterarbeit unter meiner Betreuung durchgeführt.

Wie in Abbildung 33A erkennbar, konnte das ca. 95kDa große Ago1-Protein durch den Ago1-spezifischen Antikörper präzipitiert werden. Die Isotypkontrolle zeigte kein Ago1-Signal. Die schweren und leichten Ketten der verwendeten Antikörper wurden jeweils in etwa gleichen Mengen nachgewiesen. Abbildung 33B stellt die korrespondierende RNA-Analyse der Immunpräzipitation dar. Im Input konnten alle vier der prominenten EBER1-Fragmente nachgewiesen werden. Im Präzipitat konnte ein deutliches Signal für die Vollängen-EBER1-RNA detektiert werden. Außerdem konnte eine sehr starke Bande für das kürzeste EBER1-Fragment (EBER1₂₃) dokumentiert werden. Das EBER1₇₀-Fragment wurde ebenfalls von Ago1 präzipitiert. EBER1₅₂ allerdings konnte nur als schwache Bande nachgewiesen werden. In der RNA der Isotypkontrolle war kein Signal erkennbar. Abbildung 33C zeigt einen der Immunpräzipitation zugehörigen Northern Blot, der mit der 3'-EBER2-Sonde angefärbt wurde. Im Input konnte die Vollängen EBER2-RNA nachgewiesen werden. In der RNA der Ago1-IP konnten überdies weitere EBER2-Fragmente detektiert werden, die, vergleichbar mit den bereits nachgewiesenen EBER1-Fragmenten, Längen von etwa 23, 52 und 70 Nukleotiden entsprachen und nicht im Input nachzuweisen waren. Als weiteres Kontrollexperiment wurden die 5'-EBER1- und 3'-EBER2-Sonden von der Northern Blot-Membran entfernt und diese mit einer Oligonukleotidsonde gegen hsa-miR-18a rehybridisiert. Wie deutlich in Abbildung 33B und C ersichtlich ist, konnte sowohl im jeweiligen Input als auch in den Präzipitaten hsa-miR-18a detektiert werden. In der RNA der Isotypkontrolle war wiederum kein hsa-miR-18a-Signal detektierbar. Mit dem Nachweis von hsa-miR-18a wurde die Bindung des Ago1-Komplexes an eine miRNA sichergestellt.

6.5.3.2 Co-Immunpräzipitation von Ago1 und EBER1 aus Raji-Zellen

Nachdem die Interaktion der EBER1/2-RNAs mit dem Ago1-Komplex in Zellen nachgewiesen war, in denen EBER1/2 und Ago1 überexprimiert waren, sollte im nächsten Schritt die Interaktion in EBV-positiven Raji-Zellen untersucht werden, die endogen sowohl Ago1 als auch die beiden EBER-RNAs exprimieren. Die Herstellung der Zelllysate und Durchführung der Immunpräzipitation erfolgte nach denselben Bedingungen wie bereits in

Abschnitt 6.5.3.1 beschrieben. Da in Raji-Zellen eine starke Expression von hsa-miR-155 vorliegt, wurde diese miRNA gewählt, um die allgemeine Fähigkeit des Ago1-Komplexes zur miRNA-Bindung zu verifizieren.

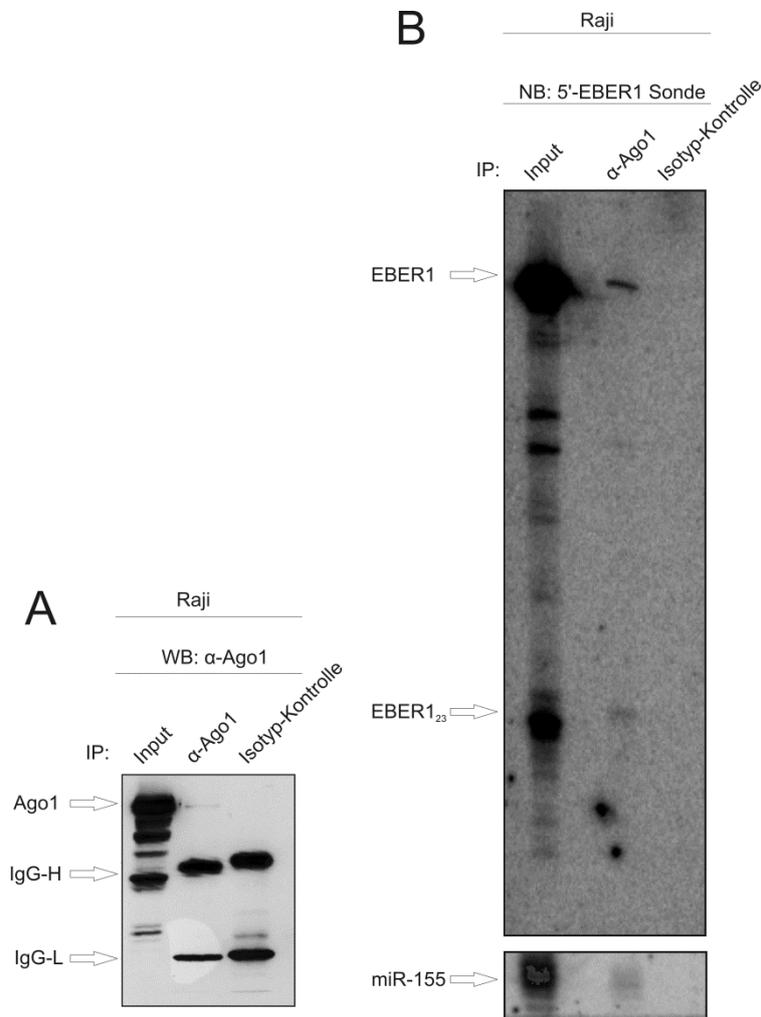


Abbildung 34: Ago1 Co-Immunpräzipitation von EBER1 in Raji-Zellen

Raji-Zellen wurden lysiert und mit Beads inkubiert, an welche zuvor Ago1-, bzw. Isotypkontroll-Antikörper gekoppelt wurden. Nach mehreren Waschschrritten wurden parallel Protein- und RNA-Extrakte hergestellt und im Western und Northern Blot untersucht. A: Kontrolle der Ago1-Co-IP im Western Blot. Je 25 μ l Probe wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und Ago1 mithilfe spezifischer Antikörper detektiert. B: Northern Blot der Ago1-Co-IP. 10 μ l RNA-Extrakt wurden im 12%igen Urea-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und fixiert und mit einer Oligonukleotidsonde, die gegen die Nukleotide 1-12 von EBER1 hybridisiert. Als weitere Kontrolle der IP wurde derselbe Blot mit einer Oligonukleotidsonde gegen hsa-miR-155 rehybridisiert. Sowohl Vollängen-EBER1 als auch das kürzere Fragment EBER1₂₃ konnte mit α -Ago1 präzipitiert werden, nicht aber mit der Isotypkontrolle.

Der Western Blot der IP-Kontrolle, welcher in Abbildung 34A dargestellt ist, zeigt, dass endogenes Ago1-Protein erfolgreich, aber nur in geringer Menge, aus Raji-Zellen präzipitiert werden konnte. Die Proteine der Isotypkontrolle wiesen keine Bande für Ago1 auf. Auch bei dieser Immunpräzipitation konnten die schweren und leichten Ketten der verwendeten

Antikörper etwa in gleichen Mengen nachgewiesen werden. Abbildung 34B zeigt den dazugehörigen Northern Blot, welcher mit einer 5'-EBER1-Sonde hybridisiert wurde. Im RNA-Input der IP waren deutlich Vollängen-EBER1 und das 23 Nukleotide kurze EBER1-Fragment zu erkennen. Die RNA der Ago1-Immunpräzipitation zeigte ebenfalls eine Bande, die der Vollängen-EBER1-RNA entsprach. Außerdem konnte darüber hinaus ein Signal für das 23nt kurze EBER1-Fragment detektiert werden. Die RNA der Isotypkontrolle zeigte keinerlei Signale. MiR-155 konnte ebenfalls sowohl in Input als auch im Ago1-Präzipitat nachgewiesen werden.

6.5.4 Additive Effekte zwischen miRNAs und EBER-RNAs

Die Tatsache, dass die EBER1/2-RNAs als Fragmente von 23nt-Länge nachgewiesen werden konnten, lässt eine Ähnlichkeit zu miRNAs vermuten. Die Assoziation mit Ago1 könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese kurzen viralen RNAs miRNA-ähnliche biologische Funktionen innerhalb der infizierten Zelle übernehmen könnten. Im Folgenden wird diese Fragestellung näher untersucht.

6.5.4.1 Additive Effekte der EBER-RNAs mit zellulären miRNAs

6.5.4.1.1 Additive Effekte der EBER-RNAs mit hsa-miR-142-3p in Bezug auf 3'UTRs

Aufgrund der möglichen Interaktion zwischen den kurzen EBER1/2-Fragmenten und dem Ago1-Protein, welches ein fester Bestandteil des RISC-Komplexes darstellt, wurde untersucht, ob EBER1/2 einen Effekt bei der posttranskriptionellen Regulation von Zielgenen durch miRNAs ausübt. Zu diesem Zweck wurden die beiden bereits bekannten Targets für hsa-miR-142-3p RAC1 (Wu et al., 2011) und IL-1 α (Motsch et al., 2012) verwendet. In Dual-Luciferase-Experimenten wurde untersucht, ob EBER1/2 einen alleinigen oder additiven Effekt auf einen 3'UTR-haltigen Reportervektor ausüben könne.

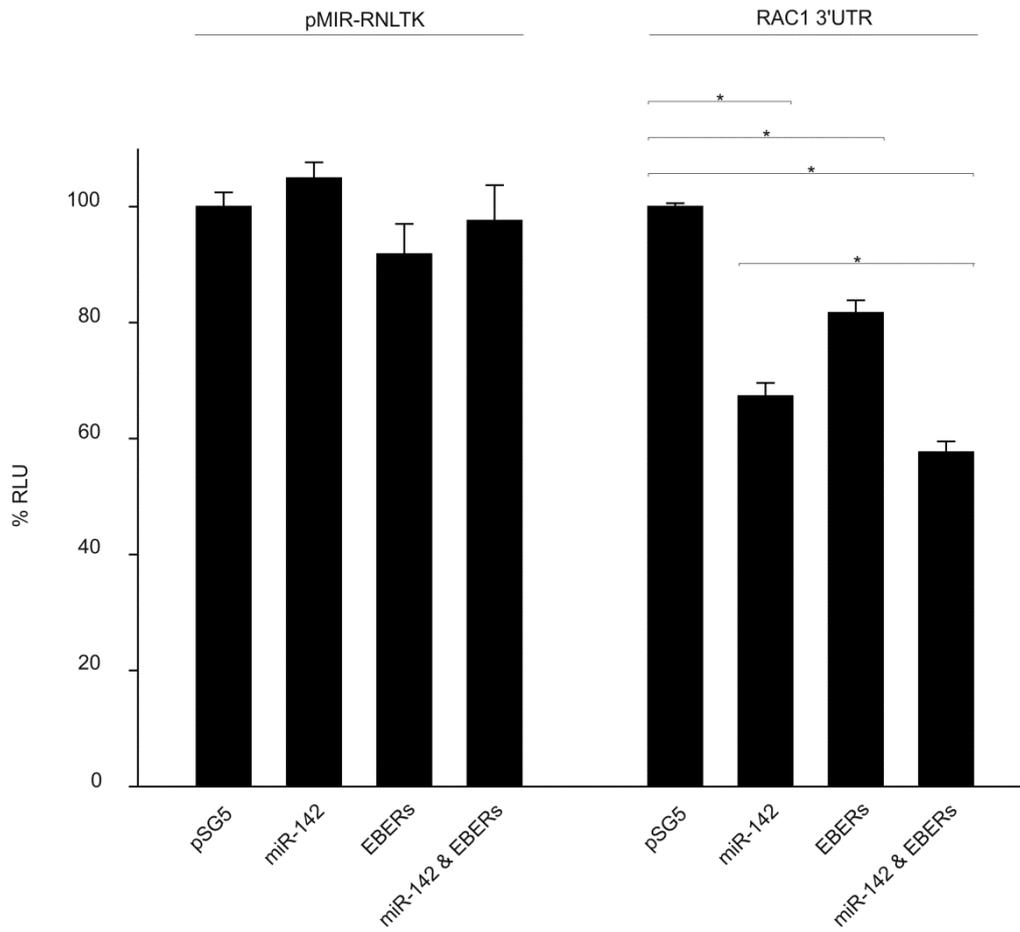


Abbildung 35: Einfluss der EBER1/2-RNAs auf die RAC1-3'UTR

HEK-293T-Zellen wurden mit je 0,2µg Reporterplasmid und 0,8µg Effektorplasmiden transfiziert. In Ansätzen mit der Kombination aus zwei Effektorplasmiden wurde von jeder DNA 0,4µg eingesetzt. Ansätze, die nur mit einem Effektorplasmid transfiziert wurden, wurden zusätzlich mit 0,4µg pSG5-Leervektor transfiziert. 48h nach Transfektion erfolgte die Zellyse und die Messung der Luciferaseaktivität. Das Experiment wurde dreifach in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind mittlere Luciferaseaktivitäten mit Standardfehlern. Transfektion von hsa-miR-142 und EBER1/2 jeweils alleine führte zu einer Reduktion der Luciferaseaktivität. Die Kombination von hsa-miR-142 und EBER1/2 reduzierte die Luciferaseaktivität stärker als die beiden Effektorplasmide alleine ($p < 0,05$).

Abbildung 35 bestätigt die bereits publizierte Wirkung der hsa-miR-142-3p auf den RAC1-3'UTR-Reportervektor (Kwanhian et al., 2012; Liu et al., 2014a; Wu et al., 2011). Die relative Luciferaseaktivität wurde auf 67% ($p < 0,001$) reduziert. EBER1/2 übten ebenfalls einen signifikanten Effekt auf die RAC1-3'UTR aus, indem sie die relative Luciferaseaktivität auf 82% ($p < 0,001$) verringerten. Betrachtet man jedoch die Kombination aus hsa-miR-142 und EBER1/2 so ist im Vergleich zu den Effekten der einzelnen Effektorplasmide eine noch stärkere Reduktion der Luciferaseaktivität auf 58% ($p = 0,008$), verglichen mit dem miRNA-Effekt alleine, ersichtlich. Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurde ein weiteres Zielgen der hsa-miR-142-3p hinsichtlich eines potenziellen kombinatorischen Effektes von miRNA und EBER1/2 untersucht. Die mRNA des IL-1 α -Gens wurde bereits als Target für hsa-miR-142-3p bestätigt und sollte in gleicher Weise in Dual-Luciferaseassays auf die Effekte der miRNA und EBER1/2-RNAs analysiert werden.

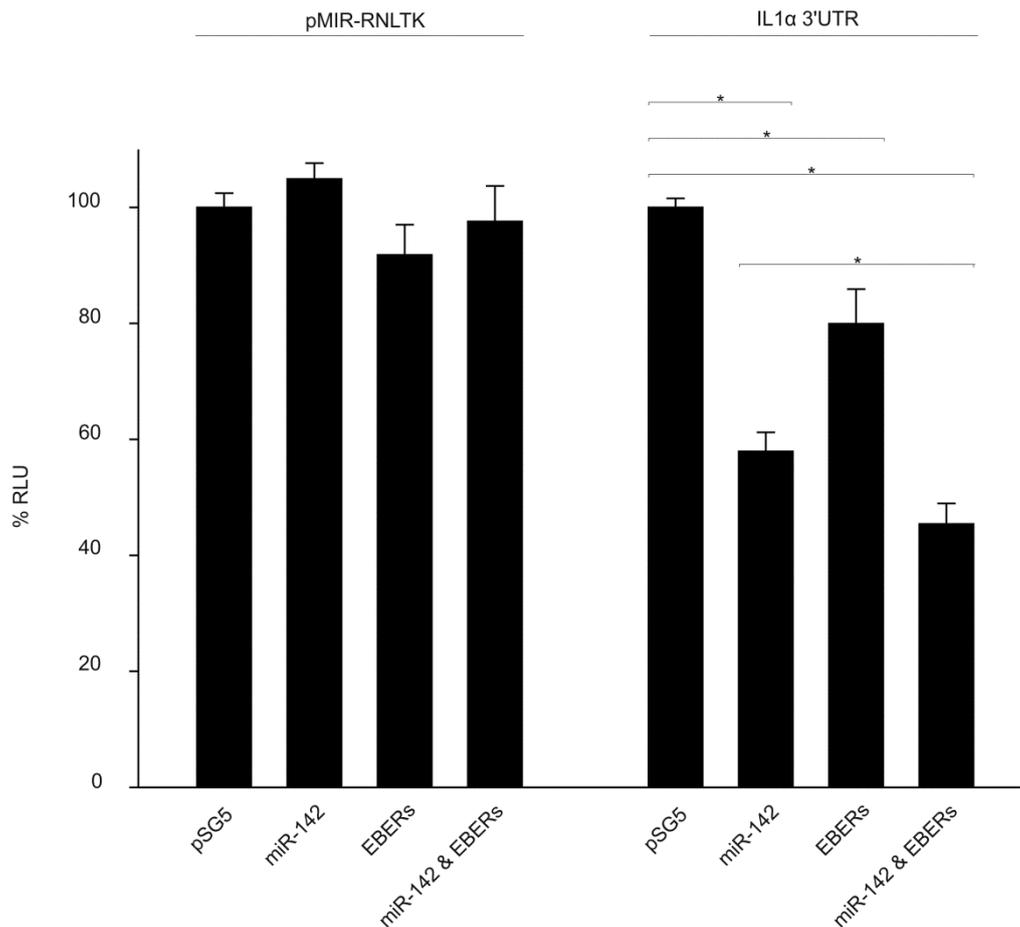


Abbildung 36: Einfluss der EBER1/2-RNAs auf die IL-1 α -3'UTR

HEK-293T-Zellen wurden mit je 0,2 μ g Reporterplasmid und 0,8 μ g Effektorplasmiden transfiziert. In Ansätzen mit der Kombination aus zwei Effektorplasmiden wurde von jeder DNA 0,4 μ g eingesetzt. Ansätze, die nur mit einem Effektorplasmid transfiziert wurden, wurden zusätzlich mit 0,4 μ g pSG5-Leervektor transfiziert. 48h nach Transfektion erfolgte die Zellyse und die Messung der Luciferaseaktivität. Das Experiment wurde vierfach in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind mittlere Luciferaseaktivitäten mit Standardfehlern. Transfektion von hsa-miR-142 und EBER1/2 jeweils alleine führte zu einer Reduktion der Luciferaseaktivität. Die Kombination von hsa-miR-142 und EBER1/2 reduzierte die Luciferaseaktivität stärker als die beiden Effektorplasmide alleine ($p < 0,05$).

Wiederum konnte der bereits publizierte Effekt der hsa-miR-142 auf die IL-1 α -3'UTR bestätigt werden (Abbildung 36) (Motsch et al., 2012). In diesem Fall wurde die relative Luciferaseaktivität auf 58% ($p < 0,001$) verringert. Auch in diesem Experiment reduzierten bereits die EBER-RNAs die Luciferaseaktivität signifikant auf 80% ($p = 0,006$). Die Co-Transfektion von hsa-miR-142 und EBER1/2 bewirkte, wie bereits in Abbildung 35 gezeigt werden konnte, eine weitaus stärkere Verminderung der relativen Luciferaseaktivität auf 45% als die einzelnen Effektorplasmide für sich alleine. Die P-Werte lagen bei $p = 0,02$ im Vergleich zu dem hsa-miR-142-3p-Effekt, bzw. $p = 0,0002$ im Vergleich zu dem Effekt, den die EBER1/2-RNAs alleine auf den Reportervektor ausübten.

6.5.4.1.2 Additiver Effekt der EBER-RNAs mit hsa-miR-142-3p in Bezug auf die IL-1 α -Proteinmenge

Nachdem im Reporterassay gezeigt werden konnte, dass EBER1/2 in Verbindung mit hsa-miR-142-3p stärkere Effekte auf 3'UTRs von Zielgenen ausüben konnten als die jeweiligen Effektoren alleine, sollte nun der Einfluss der viralen EBER-RNAs auf die Proteinmenge analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden Zellen der humanen Keratinozytenlinie HaCaT, die konstitutiv IL-1 α exprimieren und sezernieren (van Rietschoten et al., 2006), mit den jeweiligen Effektorplasmiden (co-)transfiziert. 48h nach Transfektion wurden die Zellüberstände abgenommen und im ELISA auf die Menge des sezernierten IL-1 α -Proteins untersucht. Abbildung 37 stellt die relative IL-1 α -Sekretion mit Standardfehlern aus fünf unabhängigen Experimenten, die in Doppelansätzen durchgeführt wurden. Wie bereits beschrieben wurde, führte die Überexpression von hsa-miR-142 in HaCaT-Zellen zu einer deutlich verringerten Sekretion des IL-1 α -Proteins von nur noch 76% ($p = 0,003$) (Motsch et al., 2012). Exprimierten die Zellen EBER1/2 im Überschuss, so wurde die IL-1 α -Sekretion auf 80% ($p = 0,006$) reduziert. Wurden jedoch sowohl hsa-miR-142 als auch die EBER-RNAs in hohem Maße exprimiert, so sekretierten die HaCaT-Zellen nur noch 58% IL-1 α . Die P-Werte für die statistische Signifikanz liegen bei $p = 0,03$ im Vergleich zur Expression von hsa-miR-142 und $p = 0,007$ im Vergleich zu Expression von EBER1/2 einzeln.

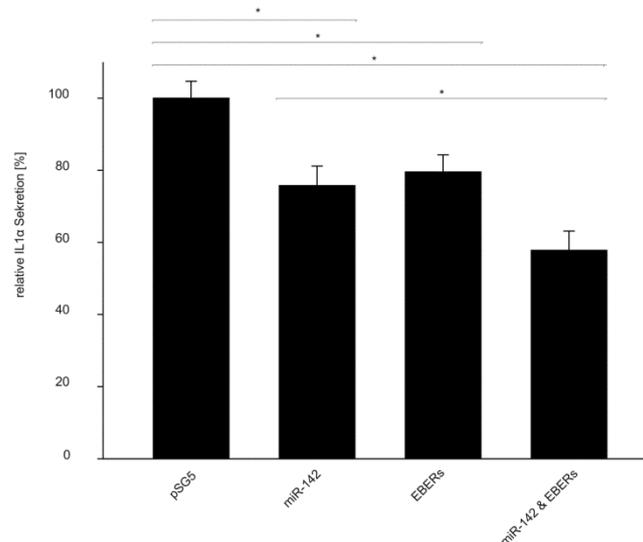


Abbildung 37: Reduktion der IL-1 α -Sekretion durch miR-142 und EBER1/2

HaCaT-Zellen wurden in 24-Loch Zellkulturplatten mit 1 μ g Kontrollvektor, bzw. je 0,5 μ g RNA-Effektorplasmid transfiziert. Die Überstände wurden 48h nach Transfektion im ELISA auf den IL-1 α -Gehalt untersucht. Das Experiment wurde fünffach in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt ist die mittlere IL-1 α -Sekretion mit Standardfehlern. Transfektion von hsa-miR-142 führt zu der bekannten Reduktion der IL-1 α -Sekretion. Auch EBER1/2 reduziert die Sekretion von IL-1 α . Hsa-miR-142 und EBER1/2 zusammen verringern die IL-1 α -Sekretion wiederum stärker als die beiden RNAs es alleine tun ($p < 0,05$).

Den Ergebnissen der Reporter- und ELISA-Experimenten zufolge, kann von einer Addition der Effekte von EBER-RNAs und hsa-miR-142-3p bei der posttranskriptionellen Regulation von miRNA-Zielgenen ausgegangen werden.

6.5.4.2 Additive Effekte der EBER-RNAs mit viralen miRNAs

Um eine potenzielle additive Wirkung der EBER1/2 mit miRNAs weiterhin zu bestätigen, wurde untersucht, ob dieser Sachverhalt auch bei viralen miRNAs auftritt. Hierfür wurden zwei Zielgene der viral kodierten ebv-miR-BART16 auf den Einfluss der EBER-RNAs analysiert.

6.5.4.2.1 S1PR1 als Target für ebv-miR-BART16

Die Suche nach neuen Zielgenen für EBV-kodierte miRNAs ergab den Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor 1 (= S1PR1) als potenzielles Target für ebv-miR-BART16. S1PR1 ist einer von insgesamt fünf G-Protein gekoppelten Rezeptoren, der durch Sphingosin-1-phosphat aktiviert werden kann (Takuwa et al., 2002). Eine Repression von S1PR1 wurde unter anderem in Lungenkarzinomen gefunden (Nakano et al., 2012). Abbildung 38 zeigt eine Vorhersage der ebv-miR-BART16 Bindestelle in der S1PR1-3'UTR.

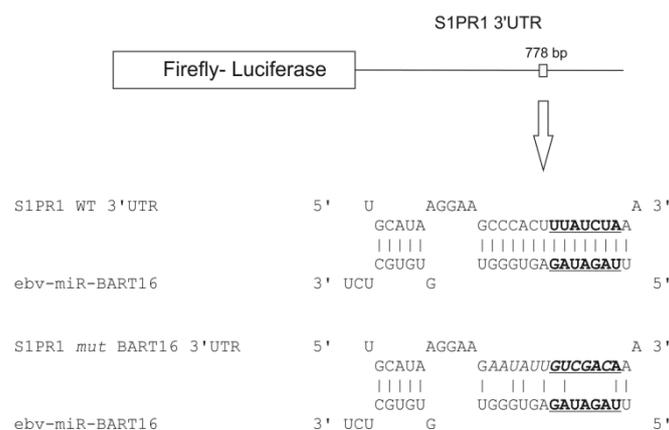


Abbildung 38: Schematische Darstellung der wildtypischen und mutierten S1PR1-3'UTR

Dargestellt ist das Wildtyp-S1PR1-3'UTR-Reporterkonstrukt mit der Bindestelle für ebv-miR-BART16 (oben), die Vorhersage der Interaktion zwischen 3'UTR und ebv-miR-BART16 (Mitte) sowie die Mutagenese des Reporterkonstruktes (unten). Die S1PR1-3'UTR-Reporterkonstrukte wurden von Dr. Natalie Motsch hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Ein Reporterkonstrukt, mit der 3'UTR der S1PR1-mRNA wurde zunächst in Dual-Luciferaseassays eingesetzt (Abbildung 38, oben). In diesen Experimenten stellte sich heraus, dass die miRNA einen Effekt auf den Reportervektor ausübt. Daher musste die Bindestelle für diese miRNA (Abbildung 38, Mitte) durch zielgerichtete Mutagenese zerstört werden (Abbildung 38, unten). Da nicht nur die Seed-Sequenz der miRNA Komplementarität zur S1PR1-3'UTR aufwies, wurden zwei Restriktionsschnittstellen (*SspI* und *SalI*) eingefügt, um eine Bindung der miRNA an die 3'UTR möglichst ausschließen zu können.

6.5.4.2.2 Regulation der 3'UTR von S1PR1 durch ebv-miR-BART16 & EBERs

Zunächst wurden 48h nach (Co-)Transfektion von HEK-293T-Zellen Dual-Luciferaseassays durchgeführt. Das Transfektionsschema war analog zu dem in Abschnitt 6.5.4.1.

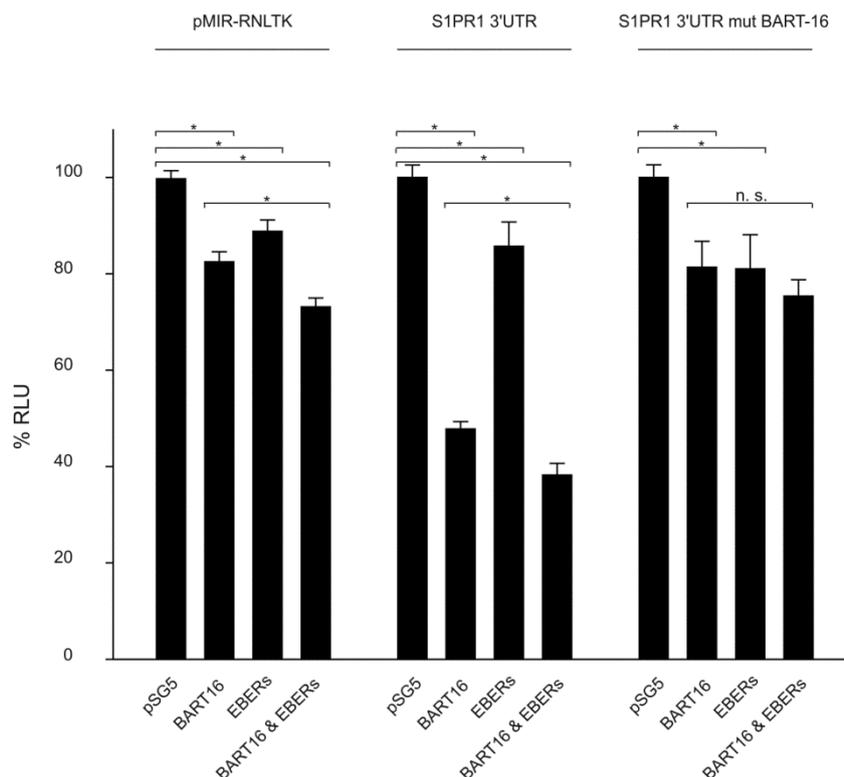


Abbildung 39: Regulation der S1PR1-3'UTR durch ebv-miR-BART16 und EBER1/2

HEK-293T-Zellen wurden mit je 0,2µg Reporterplasmid und 0,8µg Effektorplasmid co-transfiziert. 48h später wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivitäten ermittelt. Dargestellt sind Werte aus vier unabhängigen Assays, die in Duplikaten durchgeführt wurden und Standardfehlern. Transfektion von BART16, bzw. EBER1/2 alleine führte jeweils zur Reduktion der relativen Luciferaseaktivität auf 48% bzw. 86% ($p < 0,05$). Die Co-Transfektion von ebv-miR-BART16, EBER1/2 und der S1PR1-3'UTR führte zu einer signifikant verminderten Luciferaseaktivität um 62% ($p < 0,05$). Weder eine Co-Transfektion von ebv-miR-BART16 alleine noch mit EBER1/2 und der mutierten S1PR1-3'UTR ergab eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität, die sich in den Effekten auf den Kontroll-Reporter unterschied.

Betrachtet man in Abbildung 39 (links) die Werte für den leeren Reportervektor, die die Effekte der jeweilig eingesetzten Effektorplasmidkombinationen auf den Kontrollreporter widerspiegelt, so ist ersichtlich, dass die virale miRNA BART16 bereits einen signifikanten Effekt auf den leeren Reportervektor auszuüben scheint. Ebenso resultiert die Co-Transfektion der EBER1/2-RNAs mit dem Kontroll-Reportervektor in einer statistisch reduzierten Luciferaseaktivität. Der Einfluss der Effektor-RNAs auf die S1PR1-3'UTR sind in der mittleren Balkengruppe in Abbildung 39 dargestellt. Auch hier lassen sich Unterschiede in den relativen Luciferaseaktivitäten erkennen. Die Reduktion der gemessenen Lichteinheiten aufgrund des Effektes der viralen miRNA BART16 auf die S1PR1-3'UTR war jedoch deutlich stärker als die auf den leeren Reporter. Ebv-miR-BART16 war in der Lage, die relative Luciferaseaktivität um 52% zu senken ($p < 0,001$). Die EBER1/2-RNAs verringerten ebenfalls die Luciferaseaktivität des S1PR1-3'UTR Reporters im Vergleich zum Kontrollansatz, jedoch nicht statistisch signifikant mehr als sie es bei dem leeren Reportervektor taten. Die Kombination aus ebv-miR-BART16 und EBER-RNAs verursachte wiederum eine noch stärkere Reduktion der gemessenen relativen Lichteinheiten als die beiden Effektor-RNAs für sich alleine genommen. In diesem Fall betrug die ermittelte relative Luciferaseaktivität 38%, was einem P-Wert von $p = 0,002$ in Bezug auf die RLU des Ansatzes, in dem nur ebv-miR-BART16 transfiziert wurde, entspricht. Die vier Balken in Abbildung 39 (rechts) zeigen die Effekte der Effektorplasmide auf den Reportervektor, dessen Bindestelle für ebv-miR-BART16 mutiert wurde. Die Verringerung dieser jeweiligen Luciferaseaktivitäten unterschied sich statistisch kaum zu denen des leeren Reportervektors, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die ermittelten Effekte tatsächlich aufgrund der eingesetzten RNA-Effektorplasmide zustande kamen. Diese Ergebnisse waren ein erster Hinweis darauf, dass eine Addition der Effekte von miRNA und EBER1/2 auch mit viralen miRNAs stattfinden könnte.

6.5.4.2.3 Additive Effekte der EBER-RNAs und ebv-miR-BART16 in Bezug auf die endogene S1PR1-Proteinmenge

Die Vermutung, dass EBER-RNAs auch mit viralen miRNAs in der posttranskriptionellen Regulation von Zielgenen fungieren könnten, sollte nun auch auf Proteinebene untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Proteinextrakte aus transient transfizierten HEK-293T-Zellen hinsichtlich der Menge an S1PR1-Protein untersucht. Endogenes S1PR1-, bzw. GAPDH-Protein als Ladekontrolle, wurde mittels spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert. Abbildung 40 zeigt einen repräsentativen Western Blot (links) und die dazugehörige Quantifizierung der relativen S1PR1-Proteinmenge (rechts).

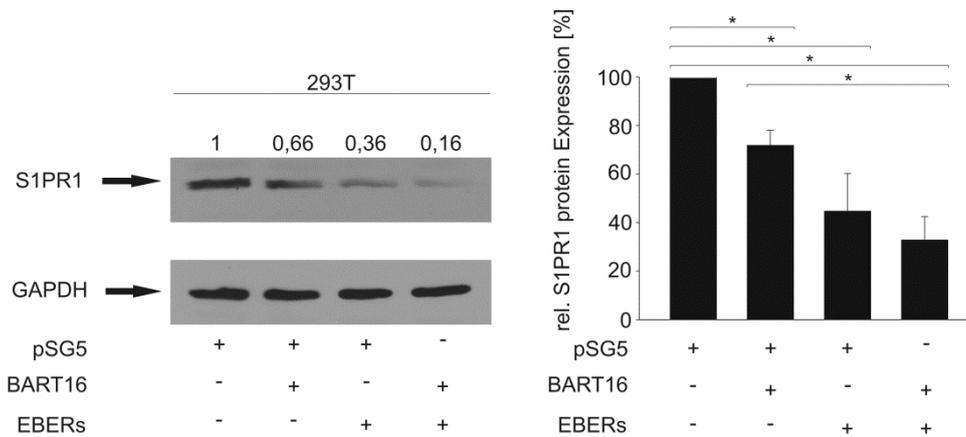


Abbildung 40: Einfluss der ebv-miR-BART16 auf die endogene S1PR1-Proteinmenge in HEK-293T-Zellen

links: HEK-293T-Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils in 6-Loch Zellkulturplatten mit 2µg pSG5-Leervektor, bzw. 1µg ebv-miR-BART16- und/oder EBER1/2-Expressionsplasmid transfiziert. 48h nach Transfektion wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt, in 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen zu je 30µg aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und S1PR1, bzw. GAPDH zur Ladekontrolle mittels spezifischer Antikörper detektiert. rechts: Die Quantifizierung erfolgte durch „Quantity One“ (Biorad). Die Expression des S1PR1-Proteins wurde auf die GAPDH-Expression normiert und die Expressionen des Kontrollansatzes (pSG5-Leervektor) auf 100% gesetzt. Die Überexpression von ebv-miR-BART16, bzw. EBER1/2 alleine führte zu einer Reduktion des S1PR1-Proteins um 28%, bzw. 55%. Die Kombination von ebv-miR-BART16 und EBER-RNAs führte zu einer noch stärkeren Reduktion des S1PR1-Proteins um 67% ($p < 0,05$).

Das Niveau an endogenem S1PR1-Protein in 293T-Zellen wurde durch die Überexpression von ebv-miR-BART16 statistisch signifikant auf 72% ($p = 0,01$) verringert. Auch die ektopische Expression der beiden EBER-RNAs resultierte in einer signifikanten Reduktion des S1PR1-Proteins auf 45% ($p = 0,02$). Die Co-Transfektion von ebv-miR-BART16 mit EBER1/2 ließ die endogene Proteinmenge an S1PR1 im Vergleich zur Einzeltransfektion der viralen miRNA noch weiter auf 33% ($p = 0,03$) sinken.

Um die Korrelation zwischen ebv-miR-BART16 und EBER1/2 hinsichtlich der Reduktion der S1PR1-Proteinmenge weiterhin zu bestätigen, wurde der endogene Proteingehalt an S1PR1 in den NKTL-Zelllinien SNK6 und SNT16 mit der S1PR1-Proteinmenge in primären CD56⁺CD3⁺-PBMC, sowie in den Lymphoblastoid-Zelllinien LCL AM 29 und LCL AM 58, im Western Blot verglichen. Die Menge an GAPDH diente als Ladekontrolle. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängig durchgeführten Western Blots und die Quantifikation aller Ergebnisse sind in Abbildung 41 und 42 aufgeführt.

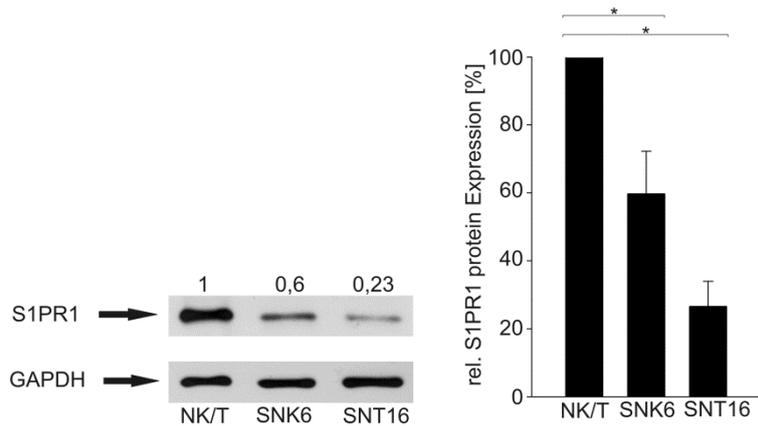


Abbildung 41: Reduzierte endogene Proteinexpression von S1PR1 in NKTL-Zelllinien im Vergleich zu primären NK/T-Zellen

Rechts: Von den jeweiligen Proteinextrakten wurden 30µg in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und S1PR1, bzw. GAPDH zur Ladekontrolle anhand spezifischer Antikörper detektiert. Links: Die Quantifizierung der zu GAPDH relativen Proteinmenge erfolgte mit der Quantity One-Software (Biorad). Die beiden EBV-positiven NKTL-Zelllinien SNK6 und SNT16 zeigten ein deutlich geringeres S1PR1-Proteinniveau als die EBV-negativen, primären NK/T-Zellen ($p < 0,05$).

Primäre NK/T-Zellen wiesen eine hohe Menge an endogenem S1PR1-Protein auf. Die S1PR1-Expression der NKTL-Zelllinien war hingegen statistisch signifikant vermindert. Im Vergleich zu den primären NK/T-Zellen wiesen die EBV-positiven Lymphom-Zelllinien SNK6 und SNT16 eine Reduktion des S1PR1-Proteinniveaus auf knapp 60% ($p = 0,03$) bzw. 27% ($p = 0,006$) auf. S1PR1 lag in den EBER1/2-deletierten LCL AM 58 um 26% ($p = 0,008$) verstärkt vor als in den Zellen der LCL AM 29, die mit Wildtyp-EBV infiziert sind (Abbildung 42). Diese Daten waren ein weiterer Hinweis auf die mögliche Addition der Effekte von EBER1/2-RNAs und viralen miRNAs wie z. B. ebv-miR-BART16.

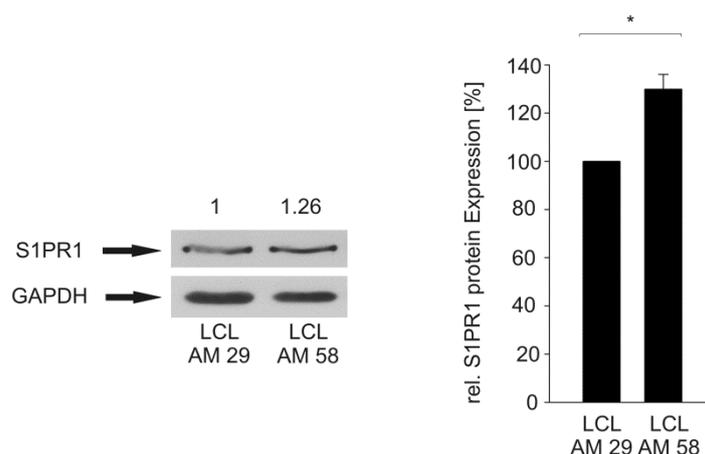


Abbildung 42: Endogene S1PR1-Proteinmenge in Lymphoblastoid-Zelllinien, die EBER1/2 exprimieren oder nicht

Rechts: 30µg Gesamtprotein der Lymphoblastoid-Zelllinien AM 29 (Wildtyp EBV) und AM 58 (EBV mit einer EBER1/2-Deletion) wurden in einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anhand spezifischer Antikörper wurden S1PR1 und GAPDH (Ladekontrolle) detektiert. Links: Relative S1PR1-Proteinmengen in den Linien LCL AM 29 und AM 58. Die S1PR1-Proteinmenge liegt in den EBER1/2-deletierten LCL AM 58 um 26% erhöht vor ($p = 0,008$).

6.5.4.2.4 Selektive Addition zwischen ebv-miR-BART16- und EBER1/2-Effekten

Ähnlich wie im Fall des Zusammenwirkens von EBER1/2 und hsa-miR-142-3p sollte ein weiteres Zielgen der ebv-miR-BART16 hinsichtlich ihrer additiven Effekte mit EBER1/2 untersucht werden. TOMM22 war bereits als Target für diese virale miRNA beschrieben (Dolken et al., 2010) und eignete sich daher für weitere Experimente. Im Dual-Luciferaseassay wurde der Einfluss der EBER-RNAs zusammen mit ebv-miR-BART16 auf die TOMM22-3'UTR analysiert. Transfektionen und weitere Reaktionsbedingungen wurden wie für S1PR1 beschrieben (Abschnitt 6.5.4.1) durchgeführt.

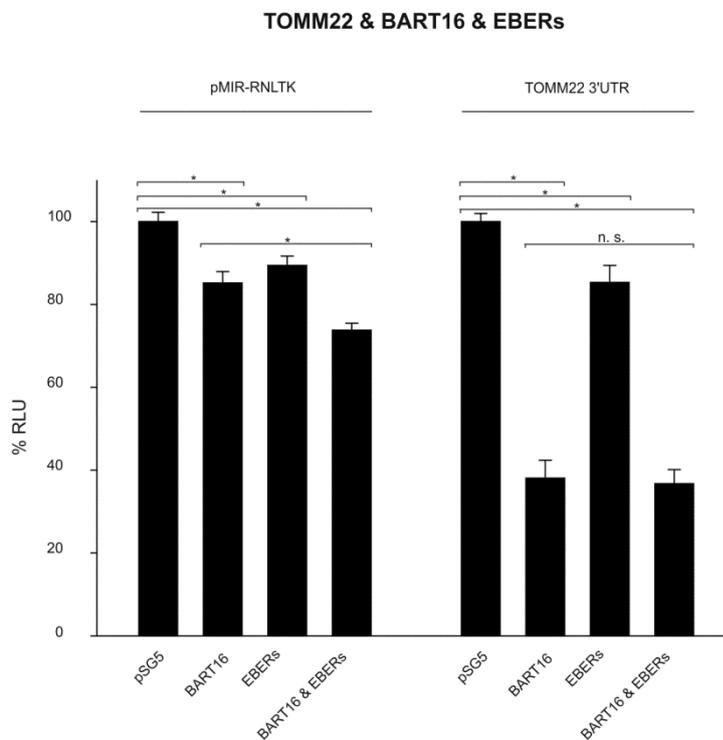


Abbildung 43: Regulation der TOMM22-3'UTR durch ebv-miR-BART16

HEK-293T-Zellen wurden mit je 0,2µg Reporterplasmid und 0,8µg Effektorplasmid co-transfiziert. 48h später wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivitäten ermittelt. Dargestellt sind Werte aus sechs unabhängigen Assays, die in Duplikaten durchgeführt wurden und Standardfehlern. Transfektion von BART16, bzw. EBER1/2 alleine führte jeweils zur Reduktion der relativen Luciferaseaktivität auf 38% bzw. 85% ($p < 0,05$). Die Co-Transfektion von ebv-miR-BART16, EBER1/2 und der TOMM22-3'UTR führte zu keiner signifikant verminderten Luciferaseaktivität.

In Abbildung 43 ist das Balkendiagramm zu den durchgeführten Dual-Luciferaseassays dargestellt. Wie bereits publiziert worden war, reduzierte ebv-miR-BART16 die relativen Lichteinheiten, die der TOMM22-3'UTR-Reporter produzierte, statistisch signifikant um 62% ($p < 0,001$). Auch die EBER-RNAs waren in der Lage, die relative Aktivität der Luciferase signifikant um 15% ($p = 0,004$) zu verringern. Der Ansatz, in dem sowohl ebv-miR-BART16

als auch EBER1/2 in Kombination einen Einfluss auf die TOMM22-3'UTR darstellen sollten, zeigte keine statistisch signifikante Veränderung in den gemessenen Lichteinheiten, verglichen zu dem Ansatz, in dem nur ebv-miR-BART16 überexprimiert wurde. Die signifikanten Dezimierungen der RLU auf den leeren Reportervektor, die bereits in Abbildung 39 auftraten, waren in diesem Experiment ebenfalls erkennbar. Dieses Ergebnis lieferte keinen Hinweis einer potenziellen additiven Wirkung von ebv-miR-BART16 und EBER1/2 auf dieses Target.

6.5.5 Subzelluläre Lokalisation des Lupus Antigen

Es ist bekannt, dass die EBER1/2-RNAs an das humane La-Protein binden und nicht, wie miRNAs, durch Exportin-5 aus dem Kern transportiert werden (Fok et al., 2006a; Lerner et al., 1981). In Zusammenarbeit mit Daniele Hasler, Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gunter Meister, konnte auch die Bindung des EBER1₂₃-Fragments an La nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt wurde, dass sich die EBER-RNAs hauptsächlich im Zytoplasma EBV-transformierter Raji-Zellen befinden, wurde die subzelluläre Lokalisation ebenfalls für das Lupus Antigen bestimmt. Zu diesem Zweck wurden kernhaltige und zytoplasmatische Fraktionen der LCL AM 29, LCL AM 58 und Raji hergestellt und, verglichen mit den jeweiligen Gesamtproteinextrakten, im Western Blot das La-Protein mithilfe eines spezifischen Antiserums detektiert.

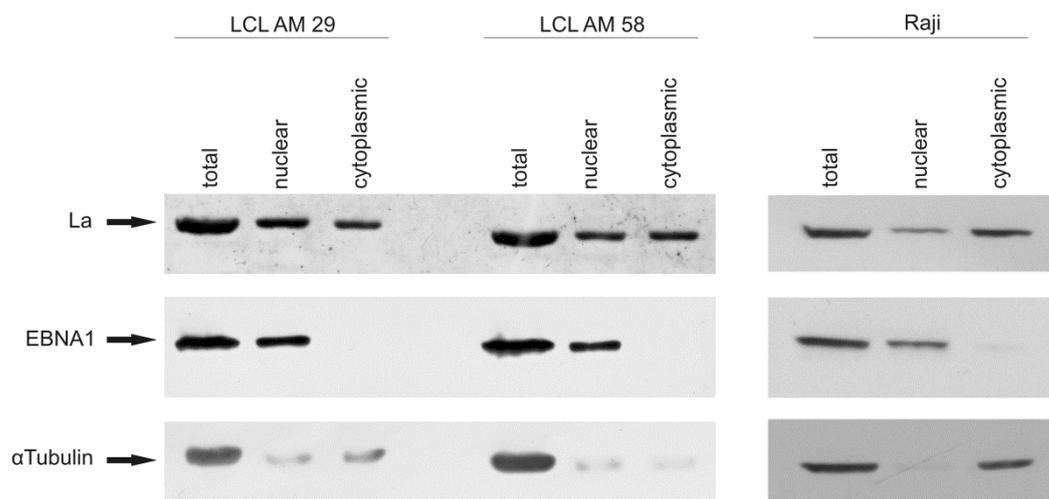


Abbildung 44: Detektion des Lupus Antigens in fraktionierten EBV-infizierten Zellen

Jeweils 30µg Gesamtproteinextrakt, bzw. Proteinextrakt von fraktionierten Zellen wurden in 10% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Detektion des La-Proteins in Lymphoblastoid-Zelllinien LCL AM 29 (Wildtyp-EBV), LCL AM 58 (EBER1/2 deletiert) und EBV-positiven Burkitt-Lymphomzellen (Raji) erfolgte mit einem spezifischen Antiserum. Zur Kontrolle der Zellfraktionierung wurden das strikt nukleäre virale EBNA1 und das zytoplasmatische α Tubulin detektiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Zytoplasmafractionen nicht mit Kernen kontaminiert wurden. Die α Tubulin-Signale in den Kernfraktionen stammen von nicht lysierten Zellen. La ist zum größten Teil im Zytoplasma der analysierten Zellen lokalisiert.

Abbildung 44 zeigt, dass das Lupus Antigen in den Zytoplasmafraktionen aller drei Zelllinien vorlag. Dabei schien die Expression der EBER1/2-RNAs keine Rolle zu spielen. Die Reinheit der Fraktionen wurde durch Detektion des kernlokalisierten EBV-Proteins EBNA1 und des zytoplasmatischen α Tubulins bestimmt. Die Zytoplasmafraktionen aller drei Zelllinien enthielten kein, bzw. nur sehr wenig EBNA1. In den nukleären Fraktionen wurde α Tubulin in geringen Mengen nachgewiesen, was auf noch nicht lysierte Zellen während der Präparation der Kernextrakte zurückzuführen ist.

7 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Erstellung eines microRNA Expressionsprofils EBV-positiver NKTL-Zelllinien und in der Bestimmung potenzieller neuer miRNA Zielgene. Bei den miRNA Sequenzierungen wurden kleine Fragmente der EBV-kodierten EBER-RNAs gefunden. Daher wurden funktionale Analysen der EBV-kodierten EBER-Transkripte durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden aus den beiden NKTL-Zelllinien SNK6 und SNT16 sowie aus primären CD56⁺CD3⁺PBMC cDNA-Banken hergestellt und in einem Illumina Hochdurchsatzsystem sequenziert. Nach bioinformatischer Auswertung konnten Unterschiede in den Expressionen von miRNAs gezeigt werden. Außerdem ergab sich ein erster Hinweis auf die Existenz prozessierter Fragmente der EBER-RNAs. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden zum einen durch qRT-PCR-Validierung von ausgewählten miRNAs und zum anderen durch Nachweis der kürzeren EBER-Fragmente durch Northern Blots EBV-positiver Zelllinien validiert. CUL5 konnte als neues Zielgen der deregulierten hsa-miR-148a-3p beschrieben werden. EBER1/2 und La erwiesen sich durch Zellfraktionierungsexperimente als hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert und mittels Co-Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass EBER1/2-Fragmente an Ago1 binden. Mit S1PR1 wurde ein weiteres neues Zielgen für die virale miRNA ebv-miR-BART16 identifiziert. Weiterhin wurde ein additiver Effekt zwischen EBER-RNAs und der zellulären miR-142-3p, bzw. der ebv-miR-BART16 in Bezug auf die posttranskriptionelle Regulation der Zielgene RAC1 und IL-1 α , bzw. S1PR1 durch Reporteranalysen und Experimenten auf Proteinebene aufgedeckt.

7.1 Illumina Hochdurchsatz-Sequenzierung von NK/T-Zellen und den Zelllinien SNK6 und SNT16

7.1.1 Auswahl des Zellmaterials und Herstellung der cDNA-Banken

Nasale NK/T-Zell Lymphome stellen eine sehr seltene Tumorentität dar. Der Sachverhalt, dass diese Tumore zum einen ein sehr heterogenes Gewebe mit einer Vielzahl an infiltrierenden Lymphozyten darstellt und zum anderen durch progressive, nekrotische Läsionen repräsentiert werden, macht die Forschung an diesen Lymphomen, vor allem in Europa, zu einem äußerst schwierigen Unterfangen. Daher wurde in dieser Arbeit auf die

Beschaffung von Patientenmaterial verzichtet und stattdessen auf Zelllinien zurückgegriffen, die aus primären NK/T-Zell Lymphomen etabliert worden waren. Der zelluläre Ursprung der Tumore wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Allerdings entfernt sich die wissenschaftliche Meinung von einer reinen NK-Zell Abstammung und geht eher in Richtung der Theorie, dass diese Lymphome mit NK- und T-Zell Abstammung aus aktivierten zytotoxischen T-Zellen hervorgehen (Arnulf et al., 1998). SNK6 ist eine Zelllinie, die aus Tumormaterial eines NKTL-Patienten etabliert wurde, Sie zeigt einen NK-Zell Phänotyp mit folgenden Eigenschaften: CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻ CD16⁻ CD19⁻ CD21⁻ CD25⁺ CD56⁺ CD57⁻ HLA-DR⁺, TCR α/β ⁻ TCR γ/δ ⁻ (Nagata et al., 2001). Die Zelllinie SNT16 stammt ebenfalls von einem NKTL eines Patienten, der zudem eine chronisch aktive EBV-Infektion aufwies. Diese Zellen zeigen den Phänotyp von T-Zellen mit den folgenden Eigenschaften: CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD16⁻ CD19⁻ CD56⁻ HLA-DR⁺, TCR α/β ⁺ TCR γ/δ (Zhang et al., 2003). Um einen Vergleich der miRNA Expressionen zwischen den Tumorzelllinien und Normalgewebe heranziehen zu können, wurde als korrespondierendes Gewebe CD56⁺CD3⁺ Lymphozyten von gesunden Spendern gewählt, da sie sowohl NK- als auch T-Zellen vereinen und somit die beiden am häufigsten vorkommenden Ursprünge von NKTL vertreten. Nach erfolgreicher Qualitätskontrolle der RNA aus den beiden Zelllinien und den primären NK/T-Zellen und anschließender Herstellung der cDNA-Banken am Max Planck Institut für Pflanzenzüchtungsforschung (MPIPZ) Köln wurde die Illumina-Hochdurchsatzsequenzierung durchgeführt.

7.1.2 Sequenzanalyse der NK/T(L)-cDNA-Banken

Nach Auswertung der Sequenzier-Rohdaten durch Herrn Norbert Eichner (Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin, Lehrstuhl für Biochemie I) an der Universität Regensburg wurden die relativen Expressionen der annotierten miRNAs berechnet (Tabellen 30 und 31, Anhang 1).

7.1.2.1 Expression humaner miRNAs

In den drei sequenzierten cDNA-Banken wurde eine unterschiedliche Anzahl an zellulären miRNAs detektiert. Die Zelllinien SNK6 und SNT16 wiesen mit 512 und 636 weniger miRNAs auf als die primären NK/T-Zellen, in denen 706 zelluläre miRNAs gefunden wurden. Das Phänomen, bei dem die miRNA-Vielfalt in Lymphomen im Vergleich zum Normalgewebe abnimmt, wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. So wurde diese

Besonderheit z. B. für akute lymphatische Leukämie beobachtet (Zhang and Chen, 2009). Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten ebenfalls eine Reduktion der Gesamtzahl an nachweisbaren, annotierten miRNAs in primären NK/T-Zell Lymphomen und in primären diffus großzelligen B-Zell Lymphomen (Imig et al., 2011; Motsch et al., 2012). Die Tumorzelllinien unterschieden sich nicht nur in der miRNA-Anzahl sondern auch in deren Menge. So ist z. B. aus Abbildung 18 ersichtlich, dass mehr zelluläre miRNAs in den Zelllinien reprimiert als induziert auftraten. Bereits 2011 konnten Ng und Kollegen beobachten, dass differenziell exprimierte miRNAs in NK/T-Zelllymphomen hauptsächlich herunterreguliert sind (Ng et al., 2011).

Die Ursachen für eine aberrante miRNA-Expression können beispielsweise in einer beeinträchtigten Prozessierung liegen. Vor allem die miRNA-modifizierenden Enzyme Drosha und Dicer stehen im Verdacht, durch ihre veränderte Expression, funktionsbeeinträchtigende Mutationen oder gar Regulation durch miRNAs selbst, die Expression anderer miRNAs zu variieren (Abdelmohsen et al., 2012; Kumar et al., 2007; Ma et al., 2011; Martello et al., 2010; Rakheja et al., 2014). Durch die Assoziation von RNA-bindenden Proteinen mit unreifen miRNAs könnte die korrekte Prozessierung ebenfalls reduziert werden, wie es z. B. für die Regulation von miR-let-7 durch Lin28 der Fall ist (Zhou et al., 2013). Da der größte Teil der miRNAs von RNA-Polymerase II transkribiert wird, unterliegen sie denselben regulatorischen Prozessen wie mRNA-Transkripte (Ozsolak et al., 2008). Daher ist die Expression vieler miRNAs abhängig von Transkriptionsfaktoren, wie z. B. c-Myc, welcher in der Lage ist, die Transkription von miRNAs sowohl zu induzieren (O'Donnell et al., 2005) als auch zu reprimieren (Chang et al., 2008). MiRNA-Regulation auf epigenetischer Ebene ist durch Methylierung von Promotersequenzen möglich (Suzuki et al., 2012). Außerdem ist bekannt, dass sich ca. die Hälfte der miRNA-Gene innerhalb chromosomal instabiler Regionen befindet, in denen in Tumoren häufig Deletionen und Amplifikationen auftreten können (Di Leva and Croce, 2010; Marcinkowska et al., 2011).

Die in beiden NKTL-Zelllinien am stärksten reprimierten miRNAs waren hsa-miR-150-5p und hsa-miR-148a-3p. Die Arbeitsgruppe um K. Sawada beschrieb im Jahre 2011 hsa-miR-150 bereits als Tumorsuppressor in NKTL, wobei diese miRNA ebenfalls in Tumoren eine deutlich geringere Expression aufwies als in normalen NK-Zellen. Ihre tumorsuppressive Eigenschaft kommt durch Induktion weiterer Tumorsuppressoren, wie z. B. Bim und p53 zustande. Außerdem wurde nachgewiesen, dass eine Reprimierung dieser miRNA den PI3K/AKT-Signalweg aktiviert und somit zur Immortalisierung von Krebszellen beiträgt (Watanabe et al., 2011). Darüber hinaus konnte eine Herunterregulation der hsa-miR-150 auch in Hodgkin-Lymphomen (Gibcus et al., 2009), Burkitt-Lymphomen (Wang et al., 2014), T-Zelllymphomen (Ito et al., 2014) und in chronischer B-Zell-Leukämie (Wang et al., 2008) beobachtet werden. In T-Zelllymphomen inhibiert hsa-miR-150 das Übergreifen des Tumors

auf gesunde Organe und die Metastasierung durch Hemmung des CCR6-Rezeptors für das Chemokin CCL20 (Ito et al., 2014). Außerdem wurde im Burkitt-Lymphom gezeigt, dass hsa-miR-150 c-Myb und Survivin reguliert (Wang et al., 2014). Die starke Deregulation dieser miRNA macht sie somit zu einem potenziellen Marker für die Diagnose und zu einem potenziellen Angriffspunkt für die Therapie von Lymphomen.

Hsa-miR-148a, die ebenfalls als Tumorsuppressor beschrieben wird (Li et al., 2014c), ist für die Regulation von CCKBR und Bcl-2 in Pankreas- und kolorektalen Karzinomen bekannt (Zhang et al., 2014a). Dadurch könnte eine geringe Expression dieser miRNA mit vermehrter Proliferation, einem geringerem Maß an Apoptose und induzierter Angiogenese (Yu et al., 2011) korrelieren. Außerdem wird durch die Hemmung des MMP7-Proteins die Invasivität und Aggressivität von Tumoren gefördert (Sakamoto et al., 2014). Zudem wurde eine Herunterregulierung der hsa-miR-148a auch in Magenkarzinomen (Sakamoto et al., 2014), Lungenkarzinomen (Li et al., 2013), Mammakarzinomen (Yu et al., 2011) und Leberkarzinomen (Zhang et al., 2014b) beschrieben. Im Fall von Hepatitis B-induzierten Tumoren wird die Expression der hsa-miR148a vom viruskodierten HBx-Protein inhibiert (Xu et al., 2013). Die deutliche Repression der hsa-miR-148a in nicht HBV-assoziierten Tumorarten kommt vermutlich durch DNA-Methylierung von Promoter-CpG-Inseln zu Stande (Li et al., 2014c).

Hsa-miR-26a und -b zeigten in den NK/T-Lymphom Zelllinien eine deutlich geringere Expression als in den primären NK/T-Zellen. Im EBV-Kontext ist zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nichts über diese miRNAs bekannt. In anderen Tumoren können die beiden miRNAs aber den Fortgang des Zellzyklus durch Repression ihrer Zielgene CDK6, CDK8, EZH2 und Cyclin E1, verhindern (Li et al., 2014b; Lu et al., 2011; Zhu et al., 2012). Ein niedriger Gehalt an hsa-miR-26a/b schützt die Zellen demnach nicht mehr vor weitergehender Proliferation. Aufgrund einer Regulation durch hsa-miR-26a könnte der hohe Anteil an IL-6-Protein in EBV-immortalisierten Zellen erklärt werden (Tosato et al., 1990), der zur Aktivierung des STAT3-Signalweges führt und somit die Tumorprogression fördert (Ho et al., 2013; Militi et al., 2005).

Die in den NKTL-Zelllinien SNK6 und SNT16 mit Abstand am stärksten induzierte miRNA war hsa-miR-155-5p. Diese miRNA ist in einer Vielzahl an Tumoren hochreguliert (D'Urso et al., 2012; Jurkovicova et al., 2014; Nassar et al., 2014; Zhang et al., 2013a; Zhang et al., 2013b) und repräsentiert eine OnkomiR, d. h. miRNA mit onkogenem Potenzial. Auch in Lymphomen wurde hsa-miR-155 bereits mehrfach als induziert beschrieben (Imig et al., 2011; Kopp et al., 2013; Pedersen et al., 2009). Vor allem in EBV-assoziierten B-Zelllymphomen wird hsa-miR-155, bzw. ihr Vorläufer, das BIC-Cluster, durch das virale LMP1 induziert (Rahadiani et al., 2008) und die miRNA trägt auf diese Weise zur Proliferation und Zellmigration in NPC bei (Zhu et al., 2014). Die hier vorliegende Induktion

bestätigt die Ergebnisse von Yamanaka und Kollegen, die in NK-Lymphomen eine Überexpression von hsa-miR-155 und hsa-miR-21 feststellen konnten, wodurch der AKT-Signalweg aktiviert und so die Tumorigenese von NK-Lymphomen begünstigt wird (Yamanaka et al., 2009). In einem anderen Kontext konnte eine virusbedingte Induktion der hsa-miR-155 durch Hepatitis C nachgewiesen werden (Zhang et al., 2012). Ähnlich wie in dieser Sequenzierung ist hsa-miR-21 in fast allen Krebsarten induziert. So z. B. in soliden Tumoren epithelialen Ursprungs (Kulda et al., 2010; Li et al., 2014a; Li et al., 2012; Mar-Aguilar et al., 2013; Nouraei et al., 2013; Osawa et al., 2011; Sicard et al., 2013; Yu et al., 2014), Glioblastomen (Hua et al., 2012), Osteosarkomen (Ziyan et al., 2011), aber auch in hämatologischen Tumoren, wie z. B. Leukämie (Feng et al., 2010) und Lymphomen (Jardin and Figeac, 2013). Durch Reprimierung einer Vielzahl an Zielgenen, womit z. B. genomische Instabilität, tumorfördernde Inflammation, Invasion und Angiogenese begünstigt wird, ist hsa-miR-21 für ihre onkogene Wirkung bekannt, die anhand antiapoptotischer Eigenschaften zustande kommt (Buscaglia and Li, 2011). In EBV-infizierten Zellen wurde eine Induktion von hsa-miR-21 durch das virale EBNA2-Protein über phosphoryliertes AKT nachgewiesen (Rosato et al., 2012), wodurch es in NKTL zu einem positiven Feedback aufgrund der zuvor erwähnten AKT-Phosphorylierung durch hsa-miR-21 (Yamanaka et al., 2009) kommen könnte, was zu einer Steigerung der hsa-miR-21-Expression und verstärkte Zellproliferation führen würde. Ebenso wurde eine Korrelation zwischen EBV-kodiertem LMP1 und miR-21 gezeigt, wodurch dieser Feedback-Loop nochmals zusätzlich gesteigert werden könnte (Yang et al., 2013a).

7.1.2.2 Expressionsunterschiede der primären NK/T-Zellen im Vergleich zu Thymusgewebe und Maus-NK-Zellen

NK-Zellen spielen nicht nur im Zusammenhang mit ihrer Entartung zu Lymphomen sondern auch als Teil des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle. Daher gibt es bis dato mehrere Studien, die den Einfluss von miRNAs auf die Reifung und Funktion von humanen und Maus-NK-Zellen mit verschiedenen Methoden untersuchen. In dieser Arbeit wurde das miRNA-Profil von CD56⁺CD3⁺-Lymphozyten durch Illumina-Methodik erstellt. Dieses sollte mit bestehenden miRNA-Profilen von Thymusgewebe (Motsch et al., 2012), welches im Rahmen einer vergangenen Arbeit mittels 454-Methode sequenziert wurde, und Maus-NK-Zellen (Fehniger et al., 2010), welches ebenfalls durch Illumina-Sequenzierung erstellt wurde, verglichen werden. Hsa-miR-21 zeigte sowohl in humanen NK/T- als auch in Maus-NK-Zellen mit Abstand die stärkste Expression. Die Expression im Thymus hingegen war auch relativ stark, jedoch war hsa-miR-21 im Thymus nicht die am stärksten exprimierte

miRNA. In Maus-NK-Zellen repräsentierte hsa-miR-21 mehr als ein Viertel aller Annotationen. Eine solch starke Expression einer onkogen wirkenden miRNA in gesundem Normalgewebe ist eher ungewöhnlich, daher könnte in diesem Fall ein sog. „Klonierungsbias“ zugrunde liegen. Dieser Fehler könnte z. B. durch einen bestimmten RNA-Adapter verursacht worden sein, der bei der cDNA-Synthese zu einer übermäßig effizienten Amplifikation einer bestimmten miRNA führen würde (Tian et al., 2010). Alternativ könnte eine hohe hsa-miR-21 Expression einen großen Anteil an stark proliferierenden, aktivierten murinen NK-Zellen repräsentieren. Wie im vorherigen Abschnitt bereits beschrieben wurde, stellt hsa-miR-21 eine OncomiR dar, d. h. sie besitzt onkogene Eigenschaften. Es wurde bereits gezeigt, dass hsa-miR-21 im Tumorgewebe, bzw. in Tumorzelllinien stark induziert wird, woraufhin ihr tumorförderndes Potenzial erst zur Geltung kommen könnte. Für die miRNAs der let-7-Familie und hsa-miR-150-5p zeigte sich eine ähnlich starke Expression in humanen NK/T-Zellen, sowie in Maus-NK-Zellen, aber nur eine schwache Expression im Thymus. Hsa-miR-27a-3p zeigte jedoch im Thymus eine ziemlich starke Expression, wohingegen sie in humanen NK/T- und Maus-NK-Zellen nur gering exprimiert wurde. Diese Unterschiede im Expressionsniveau könnten darin begründet sein, dass sich im Thymus verschiedene Lymphozyten-Subpopulationen befinden. T-Vorgängerlymphozyten wandern in den Thymus, um dort zu CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen, den Thymozyten, zu reifen (Shah and Zuniga-Pflucker, 2014). Somit repräsentiert die Sequenzierung des Thymus hauptsächlich die miRNA-Expressionen von verschiedenen T-Zell-Subtypen. Ein Vergleich dieser Daten mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Elaine Mardis, die nur einen Zelltyp untersuchte, welcher zudem noch nicht humanem, sondern murinen Ursprunges war, sollte kritisch betrachtet werden. Eine weitere Schwierigkeit beim Vergleich der miRNA-Profile dieser drei Sequenzierungen stellte die Tatsache dar, dass verschiedene Methoden angewandt wurden. 454-Sequenzierungen, mit welcher Thymus analysiert wurde, basieren auf dem Prinzip der Pyrosequenzierung. Man benötigt hier zwar eine kleinere Menge an Ausgangsmaterial und die Durchführung ist weniger zeitaufwändig, allerdings werden weitaus weniger Daten generiert, die von der Leselänge deutlich länger sein können (Liu et al., 2012a). Ein erheblicher Nachteil stellte allerdings die (semi-) manuelle Auswertung der Thymussequenzierung dar, welche sehr viel Zeit in Anspruch nimmt und ein hohes Potenzial für anfallende Fehler aufweist.

7.1.2.3 miRNA-Expressionsvergleich zwischen NK/T-Zelllinien und NKTL

Beim Vergleich der zehn am stärksten exprimierten miRNAs in den NKTL-Zelllinien SNK6 und SNT16 mit den zehn miRNAs, die in primärem NKTL-Gewebe am stärksten exprimiert

waren, fanden sich lediglich drei miRNAs, die sowohl in der cDNA-Bank des Tumorgewebes als auch in mindestens einer cDNA-Bank der NKTL-Zelllinien aufgelistet werden konnten (Tabelle 28). Hsa-miR-21 zählte sogar zu den drei am stärksten exprimierten miRNAs in allen drei sequenzierten cDNA-Banken. Hsa-miR-26a und hsa-miR-27b teilten jeweils eine starke Expression im NKTL-Tumorgewebe und der Zelllinie SNT16. Sofern ein Vergleich dieser beiden Sequenzierungen überhaupt legitim ist, könnte eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanzen in der Beschaffenheit des sequenzierten Tumormaterials liegen. Die Qualität von NK/T-Zell Lymphom-Biopsien ist zum einen oftmals abhängig von der Arbeit des operierenden Chirurgen und wie gut die Grenze des Lymphoms zum umgrenzenden gesunden Gewebe ersichtlich ist, sodass möglichst wenig umliegendes Normalgewebe versehentlich entfernt wird. Auf diese Weise können Ergebnisse verfälscht werden. Darüber hinaus gibt es in NK/T-Zell Lymphomen einen großen Anteil an infiltrierenden Zellen, wie z. B. eosinophile Lymphozyten und Makrophagen, die das miRNA-Profil ebenfalls beeinflussen können (Jiang et al., 2012). Am wahrscheinlichsten aber liegt die Problematik in der Anzahl der untersuchten Lymphome. Es wurden lediglich zwei Fälle EBV-positiver, nasaler NK/T-Zell Lymphome sequenziert, sodass aufgrund dieser geringen Proben-Anzahl eigentlich keine statistischen Rückschlüsse gezogen werden dürften.

7.1.2.4 Expressionsmuster EB-viraler miRNAs

Epstein-Barr viruskodierte miRNAs repräsentierten mit 14,72% bzw. 31,37% fast ein Drittel aller miRNAs, die in SNK6- bzw. SNT16-Zellen exprimiert waren. Im Gegensatz zu den ebv-BART-miRNAs wurden keine miRNAs aus dem BHRF1-Cluster detektiert. Die Abwesenheit der drei ebv-BHRF1-miRNAs wurde außerdem ebenfalls für NPC (Cosmopoulos et al., 2009), DLBCL (Imig et al., 2011), periphere T-Zell Lymphome (Jun et al., 2008), nasale NK/T-Zell Lymphome (Motsch et al., 2012) und Magenkarzinome (Kim do et al., 2007) beobachtet. Die EBV-positiven Zellen dieser Tumore befinden sich in Latenz I bzw. II. Ebv-miRNAs der BHRF1-Familie werden ausschließlich in Zellen exprimiert, die sich in Latenz des Typs III befinden (Yang et al., 2013b), was z. B. bei PTLD (Fink et al., 2014) und AIDS-assoziierten Lymphomen der Fall ist. Die BHRF1-miRNAs sind laut einer Studie von Cai und Kollegen in Zellen zu finden, in denen Wp- /Cp-Promoter die charakteristischen Latenztyp III-Gene exprimieren. Sie werden aus einem BamHI-Intron, welches sich innerhalb der langen EBNA pre-mRNAs, welche von den Wp- /Cp-Promotern transkribiert werden, prozessiert und nicht aus einer mRNA, die BHRF1 kodiert (Cai et al., 2006b). In Zellen, die sich in Latenztyp I oder II befinden, ist lediglich der Qp-Promoter aktiv, welcher EBNA1 exprimiert (Schaefer et al., 1995; Smith and Griffin, 1992). Betrachtet man das Expressionsmuster der ebv-BART-

miRNAs, so fällt auf, dass vier der fünf miRNAs mit den stärksten Expressionen – ebv-miR-BART10-3p, BART22, BART8-5p und BART19-3p - aus dem BART-Cluster 2 stammen (Abbildung 20). Das BART-Cluster 1 ist lediglich durch ebv-miR-BART1-5p unter den fünf am stärksten exprimierten viralen miRNAs in den NK/T-Zelllinien vertreten. Cosmopoulos und Kollegen machten in ihrer Studie die Beobachtung, dass BART-miRNAs aus dem Cluster 2 in ihrer Expression einen höheren Grad an Variabilität aufweisen als die miRNAs aus dem BART-Cluster 1 (Cosmopoulos et al., 2009). Allerdings ist dieses Phänomen in dieser Arbeit nicht festzustellen, denn die miRNAs aus dem BART-Cluster 1, wie auch die aus dem Cluster 2 zeigen eine deutliche Variabilität innerhalb ihrer Expressionsstärken. Viel wahrscheinlicher sind in diesem Fall Unterschiede während der Prozessierung durch Dicer bzw. des Splicevorganges der BART-miRNAs (Edwards et al., 2008). Des Weiteren wurde für einzelne miRNAs ein sog. „A-zu-I-Editing“ beobachtet. So ist z. B. für ebv-miR-BART6 und -3 bekannt, dass Adenosine zu Inosinen umgewandelt werden, wodurch die Prozessierung und Funktion dieser miRNAs beeinträchtigt sein kann. Würden in einer miRNA mehrere Adenosine editiert worden sein, so stimmt die veränderte Sequenz nicht mehr mit der eigentlichen miRNA-Sequenz überein. Außerdem liegen gewöhnlich im Nukleotidmix, welcher während des Sequenziervorganges eingesetzt wird, keine Inosine vor, wodurch es zu falsch eingebauten Nukleotiden kommt. In Folge dessen kommt es beim Abgleich der Sequenzierdaten mit der miRBase-Datenbank zu Fehlpaarungen, den sog. „Mismatches“, sodass diese miRNA nicht mehr als solche detektiert werden kann.

MiRNA-Profile anderer EBV-assoziiierter Tumore lieferten z. T. unterschiedliche Anteile an viralen miRNAs. In NPC-Tumorproben konnten ebenfalls bis zu ein Drittel aller miRNA Reads viralen Sequenzen zugewiesen werden (Chen et al., 2010; Zhu et al., 2009), wohingegen EBV-miRNAs in DLBCL lediglich 1,7% aller annotierten miRNAs ausmachten (Imig et al., 2011). Ebv-miR-BART10-3p war die in den NK/T-Zelllinien am stärksten exprimierte virale miRNA. Betrachtet man weitere EBV-assoziierte Tumore hinsichtlich ihrer viralen miRNA-Profile, so findet man ebv-miR-BART10-3p ebenfalls unter den am stärksten exprimierten viralen miRNAs in NPC, DLBCL und Magenkarzinomen (Imig et al., 2011; Marquitz et al., 2014; Wong et al., 2012). In den restlichen, sehr stark exprimierten miRNAs dieser Tumore, sowie auch der NKTL (Motsch et al., 2012) lassen sich keine auffälligen Übereinstimmungen finden. Dies könnte durch zelltypspezifische Unterschiede in der bereits erwähnten Prozessierung oder durch Beeinträchtigung der Regulierung der Transkription begründet sein.

Zum Teil legen die sehr großen Anteile viraler miRNAs in den sequenzierten Geweben und Zelllinien die Vermutung nahe, dass sie einen erheblichen Teil zur Tumorentstehung und -progression, bzw. Infektion und Aufrechterhaltung der Latenz beitragen. Daher stellt die Forschung nach Zielgenen EB-viraler miRNAs einen bedeutenden Schritt in Richtung

Verständnis ihrer Funktion dar und bietet somit potenzielle Behandlungsmöglichkeiten. Gerade in den letzten Jahren wurde ein großer Teil an Zielgenen viraler miRNAs bestimmt. So führt z. B. die Repression der EBV-Gene BZLF1 und BRLF1 durch ebv-miR-BART20-5p zu einer Aufrechterhaltung der Latenz (Jung et al., 2014). Auch die Regulation der viralen Polymerase BALF5 durch ebv-miR-BART2 (Barth et al., 2008) trägt zur Stabilisierung der Viruslatenz bei. Das Ansteuern des zellulären Proteins PUMA durch ebv-miR-BART5 hindert die Wirtszelle, in den programmierten Zelltod über zu gehen, was ebenfalls einen positiven Faktor für die Latenz darstellt (Choy et al., 2008). Durch die Inhibition von LMP1 durch ebv-miR-BART1, -3, -9 -16 und -17 (Lo et al., 2007; Ramakrishnan et al., 2011) wird der zytotoxische Effekt dieses viralen Membranproteins deutlich verringert (Le Clorennec et al., 2008). Auch LMP2A ist Zielgen einer viralen miRNA. Die Regulation dieses viralen Antigens durch ebv-miR-BART22 verhindert die Identifikation durch zytotoxische T-Zellen, wodurch die Eliminierung infizierter Zellen durch das Immunsystem des Wirts deutlich erschwert wird (Lung et al., 2009). Neben diesen viralen Zielgenen werden auch zahlreiche zelluläre Gene von EBV-kodierten miRNAs posttranskriptionell reguliert, wie z. B. das bereits erwähnte Gen PUMA durch ebv-miR-BART5 (Choy et al., 2008), T-bet durch ebv-miR-BART20-5p (Lin et al., 2013), BRUCE durch ebv-miR-BART15-3p (Choi et al., 2013), BIM durch miRNAs des Cluster 1 (Marquitz et al., 2011) und TOMM22 und CASP3 durch ebv-miR-BART16 (Dolken et al., 2010; Vereide et al., 2014), welche alle eine Rolle in der Kontrolle der Apoptose spielen. Um vor dem Immunsystem unentdeckt zu bleiben, reguliert z. B. ebv-miR-BART3 IPO7 (Dolken et al., 2010), ebv-miR-BART6 DICER (Iizasa et al., 2010) und ebv-miR-BART2-5p MICB (Nachmani et al., 2009). Tumorigenese fördernd wirken z. B. ebv-miR-BART10 durch Regulation des Gens BTRC (Zeng et al., 2014) und ebv-miR-BART3-5p durch Inhibition von DICE1 (Lei et al., 2013). Eine Modulation der EMT und somit Förderung der Metastasierung bewirken z. B. ebv-miR-BART7-3p durch posttranskriptionelle Regulation von PTEN (Cai et al., 2014) und ebv-miR-BART9 durch Ansteuern von E-Cadherin (Hsu et al., 2014). Auch die Regulation zellulärer Gene kann zur Latenzaufrechterhaltung beitragen. Ein Beispiel hierfür ist ebv-miR-BART18-5p, welche MAP3K2 ansteuert, also in den MAP-Kinase-Signalweg eingreift und somit die Virusreplikation verringert (Qiu and Thorley-Lawson, 2014).

7.2 Validierung der Illumina-Sequenzierung durch qRT-PCR

Zur Verifizierung der durch Illumina-Hochdurchsatzsequenzierung erstellten miRNA-Profile wurden die Expressionsunterschiede von vier stark deregulierten miRNAs anhand einer weiteren Methode, der quantitativen Real-Time-PCR, untersucht. Ausgewählt wurden hierzu die beiden in den NKTL-Zelllinien am stärksten reprimierten miRNAs hsa-miR-148a-3p und hsa-miR-150-5p, sowie die am stärksten induzierte miRNA hsa-miR-155-5p und die ebenfalls induzierte hsa-miR-21-5p (Abbildung 23). Die Expressionsmuster der beiden negativ deregulierten miRNAs hsa-miR-148a-3p und hsa-miR-150-5p konnten bestätigt werden, ebenso das Expressionsmuster der positiv deregulierten hsa-miR-155-5p. Lediglich in der Expression von hsa-miR-21-5p zeigten sich, zumindest für die Zelllinie SNT16, kleine Unterschiede in den durch qRT-PCR ermittelten relativen Expressionsänderungen, verglichen mit den Expressionsänderungen, die durch Auswertung der Illumina-Sequenzierung ermittelt wurden. Laut Sequenzierdaten liegt hsa-miR-21-5p in den NKTL-Zelllinien SNK6 und SNT16, verglichen zu primären NK/T-Zellen, stark induziert vor. Im Gegensatz dazu erwies sich hsa-miR-21-5p in der NKTL-Zelllinie SNK6 nur schwach induziert und in der Zelllinie SNT16 sogar leicht reprimiert. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanzen könnte in der Verwendung verschiedener Methoden liegen (Dedeoglu, 2014; Kolbert et al., 2013; Mestdagh et al., 2014). Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Verfahren zur Ermittlung von miRNA-Expressionen sind an verschiedenen Stellen anfällig für fehlerhafte Ergebnisse, wodurch sich die Ergebnisse aus beiden Methoden nicht immer decken. Die Grundlage für eine Illumina-Sequenzierung basiert auf mehreren Modifikationsschritten, in denen Enzyme eine wichtige Rolle spielen. Es kann z. B. nicht sichergestellt werden, dass die Ligation von Adaptermolekülen und die anschließende reverse Transkription während der Probenvorbereitung für die cDNA-Banken mit gleicher Effizienz verlaufen. Auch die eigentliche Sequenzierung der cDNA-Banken, die auf einer Amplifikationsreaktion beruht, ist enzymabhängig. Abgesehen von der reversen Transkription als auch bei Amplifikationsreaktionen, die ebenfalls während der Sequenzierung Anwendung finden, sind auch die Vorgänge während einer quantitativen Real-Time PCR abhängig von der Effizienz der verwendeten Enzyme. So verläuft z. B. das Anfügen eines Poly(A)-Schwanzes während der reversen Transkription möglicherweise nicht immer gleichermaßen effektiv ab. Außerdem werden miRNA-spezifische 5'-Primer eingesetzt, deren Annealing an die cDNA nicht unbedingt mit gleicher Effizienz erfolgt. Abgesehen von den reaktionsspezifischen Fehlerquellen können auch Unterschiede im verwendeten Material zu Diskrepanzen zwischen Sequenzier- und qRT-PCR Ergebnissen führen. Besonders die Aufreinigung der primären NK/T-Zellen aus „Buffy Coats“ einer Blutspendezentrale gestaltet

sich als sehr zeitintensiv und die resultierende Menge an primären Zellen reicht gerade, um wenige µg RNA zu extrahieren. Darüber hinaus wurden für die Sequenzierung und die qRT-PCR-Läufe RNA aus verschiedenen Extraktionen, also auch von verschiedenen gesunden Spendern eingesetzt, sodass spenderspezifische Differenzen in den miRNA-Profilen durchaus ebenfalls als Erklärung der Abweichungen in den verschiedenen Methoden in Frage kommen könnten. Der Northern Blot als Methode zur Quantifikation von miRNAs wäre am wenigsten anfällig für reaktionsabhängige Fehlerquellen, allerdings wird dafür eine verhältnismäßig sehr große Menge an RNA benötigt und konnte daher aus Mangel an Material nicht durchgeführt werden.

7.3 Identifizierung von Cullin 5 als Zielgen der deregulierten, zellulären hsa-miR148a-3p

Durch den TargetScanHuman-Algorithmus wurde Cullin 5 als potenzielles Zielgen der in den NKTL-Zelllinien stark reprimierten hsa-miR-148a-3p vorhergesagt. Daher wurde der Einfluss dieser deregulierten miRNA auf CUL5 zunächst in Reportergen-Assays analysiert. Die Überexpression von hsa-miR-148a führte zu einer Reduktion der relativen Luciferaseaktivität um 23% (Abbildung 26). Durch Mutagenese der miRNA-Bindestelle in der CUL5-3'UTR konnte eine direkte Regulation durch hsa-miR-148a-3p bestätigt werden. Die Überprüfung der Proteinexpression von CUL5 in HEK-293T-Zellen, welche hsa-miR-148a überexprimierten, erbrachte eine Reduktion des CUL5-Gesamtproteins um 15% (Abbildung 27). Schließlich wurden auch die NKTL-Zelllinien SNK6 und SNT16 sowie primäre NK/T-Zellen hinsichtlich ihres endogenen CUL5-Proteingehaltes untersucht. Dabei erwies sich eine dreifach verstärkte CUL5-Proteinmenge für die Lymphom-Zelllinien im Vergleich zu primären NK/T-Zellen (Abbildung 28).

CUL5, oder auch bekannt als VACM1, repräsentiert eine von insgesamt sieben humanen Cullin-RING (=Really Interesting New Gene) E3-Ubiquitinligasen, die aus einem Cullin-Proteingerüst und einer katalytischen RING-Untereinheit bestehen (Deshaies and Joazeiro, 2009; Petroski and Deshaies, 2005). Ubiquitylierung stellt eine posttranslationelle Modifikation dar, die nicht nur die proteasomale Proteindegradation einleiten, sondern auch enzymatische Aktivitäten und Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflussen kann. Auf diese Weise können biologische Prozesse, wie z. B. der Zellzyklus, Transkription, Signaltransduktion oder DNA-Reparatur gesteuert werden (Hershko and Ciechanover, 1998). E3 Ubiquitinligasen vermitteln den letzten Schritt in der Ubiquitylierung: die

Isopeptidbindung zwischen einem Substratprotein und Ubiquitin, was zu Mono- oder Polyubiquitinylierungen führen kann (Pickart, 2001). Unter den Substraten der Cullin-RING-Ligasen befinden sich auch onkogene und tumorsuppressive Proteine, sodass Culline, je nach Substrat, entweder die Transformation von Zellen fördern oder verhindern können. CUL5 rekrutiert bestimmte Proteine, die über eine „SOCS“-Box verfügen. Diese Proteine dienen als Substrat-Erkennungskomponenten (Lee and Zhou, 2010), so z. B. auch viruskodierte Proteine, wie das KSHV-Protein LANA und das Adenovirus-4 Protein E4orf6, welche Tumorsuppressoren wie VHL und p53 zur Degradation markieren (Cai et al., 2006a; Forrester et al., 2011). Das HIV-1 Vif-Protein führt die Degradation des antiviralen Proteins APOBEC3G durch Ubiquitinylierung herbei (Yu et al., 2003). Auch das EBV-kodierte BZLF1 sorgt mit CUL5 für die Degradation von p53, wodurch während einer lytischen Infektion die Virusvermehrung gewährleistet werden könnte (Sato et al., 2009). CUL5 wird in der Literatur im Zusammenhang mit Krebs eigentlich als Tumorsuppressor angesehen (Elliott et al., 2008). So ist z. B. bekannt, dass die Src-induzierte Tumorigenese durch CUL5 verhindert werden kann (Laszlo and Cooper, 2009). Durch eine miRNA-abhängige Inhibition von CUL5 in Zervixkarzinomen wird z. B. die Proliferation und Invasion von Zellen gesteigert (Xu et al., 2012). Abhängig vom Zellkontext sind aber auch onkogene Eigenschaften des CUL5-Proteins bekannt. In Leberkarzinomen wurde demnach gezeigt, dass eine Überexpression von CUL5 aufgrund einer niedrigen Gesamtmenge an hsa-miR-7 das Fortschreiten des Zellzyklus am G1/S-Übergang fördert (Ma et al., 2013). In NKTL könnte das niedrige Niveau an hsa-miR-148a-3p durch Regulation von CUL5, was zu einer Überexpression dieses Proteins führt, auf ähnliche Weise das Zellwachstum beeinflussen. Da es aber bisher noch keine Studien über den Einfluss von CUL5 auf das Wachstum und die Progression von Lymphomen gibt, müsste dieser Zusammenhang näher untersucht werden.

7.4 Analyse der EBER-Fragmente

Während der Untersuchung der Illumina-Rohdaten fielen neben Sequenzen, die viralen miRNAs entsprachen, weitere Sequenzen viralen Ursprunges auf. Diese Sequenzen konnten den EBV-kodierten RNAs EBER1 und EBER2 zugewiesen werden und machten unter allen viralen Reads 1,55% bzw. 3,14% in den cDNA-Banken der NKTL-Zelllinien SNK6 bzw. SNT16 aus. Diese Reads entsprachen nicht nur EBER-RNAs in ihrer vollen Länge, sondern auch kürzeren Fragmenten von EBER1 und EBER2. Dabei ergab sich eine Sequenz als besonders auffällig. Diese Sequenz stellte genau die 20 ersten Nukleotide vom 5'-Ende der

EBER1-RNA dar und wurde laut Sequenzierung 915 Mal in SNK6-Zellen und 3060 Mal in SNT16-Zellen gefunden. Die am häufigsten angereicherten EBER2-Fragmente entsprachen dem Bereich zwischen den Nukleotiden 143 und 171, d. h. dem 3'-Ende und schwankten in ihren Sequenzlängen zwischen 25 und 29 Nukleotiden (Abbildung 22).

7.4.1 Validierung der Illumina-Sequenzierung durch Northern Blots

Die tatsächliche Existenz der potenziell kürzeren EBER-Fragmente wurde mittels Northern Blot in verschiedenen EBV-positiven Zelllinien untersucht. Neben dem Volllängen- und dem in der Sequenzierung vorhergesagten 20nt kurzen EBER1-Fragment, welches laut Northern Blot eher eine Größe von ca. 23nt, was der Größe einer miRNA entspricht, aufwies, konnten in den EBV-positiven, nicht aber in EBV-negativen Zelllinien noch zwei weitere auffällige Fragmente mit Sequenzlängen von 52 und 70 Nukleotiden nachgewiesen werden (Abbildung 29). Auf den ersten Blick erinnert das Bandenmuster eher an RNA-Abbauprodukte verschiedener Längen. Noch nicht veröffentlichte Daten, die in Kooperation mit Dr. Joanna Wilson angefertigt wurden, weisen die drei Fragmente EBER1₂₃, EBER1₅₂ und EBER1₇₀ ebenfalls in verschiedenen EBV-positiven Tumorbiopsien nach. Dieser Sachverhalt spricht gegen die Theorie, diese Fragmente könnten vom Abbau der Volllängen EBER1-RNA stammen (Alles et al., 2015, eingereicht, im Review). Die weiteren Signale zwischen diesen drei EBER1-Fragmenten könnten allerdings durchaus degradierte EBER1 darstellen. Die Tatsache, dass die EBER1-Fragmente in allen untersuchten EBV-positiven Zelllinien nachgewiesen werden konnten, deutet auf eine EBV- aber nicht tumorspezifische Angelegenheit hin, d. h. die Fragmente konnten nicht nur in den NKTL-Zelllinien SNK6 und SNT16, sondern auch in den Burkitt-Lymphomzellen P3HR1, Affen-LCL B95.8, und DLBCL-Zellen U2932cl3 dargestellt werden. Auch kurze EBER2-Fragmente sollten in denselben EBV-positiven Zelllinien nachgewiesen werden. Doch selbst nach 14-tägiger Exposition konnte kein Signal, abgesehen von unspezifischen und dem für die Volllängen-EBER2, detektiert werden. Eine Erklärung hierfür könnte das endogene Verhältnis zwischen EBER1 und EBER2 in EBV-infizierten Zellen liefern. Paul Clarke und Kollegen machten in ihrer Studie die Beobachtung, dass die EBER1-Menge in BL-Zellen, verglichen mit der EBER2-Menge, um das Zehnfache erhöht ist (Clarke et al., 1992). Die EBER1/2-Northern Blots konnten dies bestätigen. Die Signale für EBER2 sind um ein Vielfaches schwächer als die für EBER1. Wahrscheinlich ist dies auch der Grund, aus dem sich keine kurzen EBER2-Fragmente nachweisen ließen. Bei zu geringer RNA-Menge ist der Northern Blot daher als Methode zum RNA-Nachweis nicht genügend sensitiv.

7.4.2 Subzelluläre Lokalisation der EBER-Fragmente

Die Existenz solch kurzer EBER-Fragmente wirft die Frage nach ihrem Aufenthaltsort innerhalb der Zelle auf. Daher wurden Kern- und Zytoplasma-Zellfraktionierungen aus EBV-positiven Raji-Zellen mittels Northern Blot auf die Lokalisation von EBER1 und EBER2 bzw. ihren Fragmenten untersucht. EBER1 wurde als Vollängen-RNA fast ausschließlich in der Zytoplasmafraktion und lediglich zu einem kleinen Teil in der RNA der Zellkerne nachgewiesen. Darüber hinaus wurde das kurze EBER1₂₃-Fragment ebenfalls deutlich im Zytoplasma und nicht in den Kernen der Raji-Zellen detektiert. Auch EBER2 wurde in seiner ungekürzten Form zum größten Teil im Zytoplasma und nur schwach in Kernen EBV-positiver Raji-Zellen nachgewiesen. Auch kürzere Fragmente von EBER2 ließen sich in der Zytoplasmafraktion detektieren. Die zytoplasmatische Lokalisation von EBER1 wird von der Theorie gestützt, nach der EBER1 im Komplex mit dem Lupus Antigen La aus dem Kern ins Zytoplasma transloziert werden (Fok et al., 2006a). Diese Komplexe können anschließend mittels Exosomen von EBV-infizierten Zellen sezerniert werden, woraufhin Interferone des Typs I und proinflammatorische Zytokine via Toll-like-Rezeptor 3 induziert werden können (Ahmed et al., 2014; Iwakiri et al., 2009). Da auch das kleine EBER1₂₃-Fragment im Zytoplasma EBV-infizierter Zellen nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass auch dieses Fragment mit La eine Bindung eingeht (Alles et al., 2015 eingereicht, im Review). Die Bindung der EBER1/2-RNAs an das Lupus Antigen geschieht über den Poly-U-Bereich am 3'-Ende von RNA-Polymerase III-Transkripten (Glickman et al., 1988). Daher ist La neben dem „Shuttlen“ zwischen Kern und Zytoplasma für die Transkriptionsregulation der RNA-Polymerase III verantwortlich (Gottlieb and Steitz, 1989). Möglicherweise repräsentiert das starke EBER1-Signal in der Zytoplasmafraktion zum größten Teil EBER1, die sich in Exosomen befand, welche durch die anschließende RNA-Aufreinigung zerstört wurden. Die Färbung von EBER1/2-RNAs dient nach wie vor als Goldstandard, um in tumorösen Gewebeproben EBV nach zu weisen. Hierbei greift man gewöhnlich auf *in situ*-Hybridisierungen zurück. Daher wurde die subzelluläre Lokalisation der EBER1/2-RNAs, wenn auch z. T. kontrovers, von verschiedenen Arbeitsgruppen diskutiert. Bereits 1986 wurden EBER1 und EBER2 im Kern EBV-positiver B-Zelllinien nachgewiesen (Howe and Steitz, 1986). Auch in den meisten anderen Publikationen, die diese Thematik bearbeiteten, konnten EBER1/2 durch *in situ*-Hybridisierung im Kern und nicht im Zytoplasma detektiert werden (Fok et al., 2006a; Teramoto et al., 1998; Weiss and Chen, 2013; Wu et al., 1995). Das Gegenteil konnte nicht nur durch Analysen in dieser Arbeit, sondern auch von Helene Collandre und Kollegen, sowie von Lars Rymo festgestellt werden (Collandre et al., 1984; Rymo, 1979). Die Bindung der EBER1-RNA an weitere Proteine, wie z. B. L22 und PKR würde aufgrund einer Lokalisation im Zytoplasma erst Sinn ergeben (Elia et al., 1996;

Toczyski et al., 1994). Die Diskrepanzen in den Ergebnissen der Studien kommen möglicherweise durch die Wahl der Methode zum EBER1/2-Nachweis zu Stande. Studien, in denen *in situ*-Hybridisierung zur Anwendung kommt, finden EBER1/2 ausschließlich in Kernen, wobei durch Northern Blots eine zytoplasmatische Lokalisation der EBER1/2-RNAs nachgewiesen werden kann. In beiden Methoden werden komplementäre Sonden eingesetzt, die an die jeweilige RNA-Zielstruktur hybridisieren sollen. Ein wesentlicher Unterschied in den beiden Experimenten ist allerdings der Zustand der RNA, die nachgewiesen werden soll. In einer *in situ*-Hybridisierung (= ISH) liegt die RNA in der Zelle meist fixiert vor, sodass ihre Sekundärstruktur noch intakt bleibt. Die beiden EBER-RNAs weisen eine sehr ausgeprägte Sekundärstruktur auf (Rosa et al., 1981), aufgrund derer Sonden, die gegen EBER1/2 in ihrer gesamten Länge gerichtet sind, möglicherweise durch sterische Hinderungen nur schlecht hybridisieren können. Dies könnte eine Erklärung für die relativ schwachen Signale für EBER1/2 im Vergleich zu den Signalen für die U1-RNA, welche von Howe und Steitz als Kontrolle gewählt wurde, liefern, denn die EBER1/2-Transkripte in Raji-Zellen wurden um ein Zehnfaches höher festgestellt als U1 (Howe and Steitz, 1986). Auch die Assoziation von EBER1/2 an andere zelluläre Strukturen, wie z. B. Proteine könnte eine Hybridisierung von Sonden beeinträchtigen. RNA, die durch ein Polyacrylamidgel aufgetrennt wurde, liegt hingegen zum größten Teil denaturiert vor, wodurch Sonden besser an ihre Zielsequenz hybridisieren könnten. Die Sequenzen der EBER-ISH-Sonden werden nicht immer publiziert, sodass ihre Spezifität zum Zwecke eines in dieser Arbeit herangezogenen Vergleichs zwischen ISH und Northern Blot nur schwer eingeschätzt werden kann.

7.4.3 EBER1/2 als Bestandteil des Ago-Komplexes

Die in dieser Arbeit nachgewiesene zytoplasmatische Lokalisation der EBER1/2-RNAs und die Länge der kurzen EBER-Fragmente, die in etwa der Länge einer miRNA entspricht, legen die Vermutung nahe, dass diese EB-viralen, nicht kodierenden RNAs im Zusammenhang mit Argonaute-Komplexen und der posttranskriptionellen, miRNA-abhängigen Genregulation stehen.

7.4.3.1 Die Interaktion von EBER1/2 und Ago1

Eine Interaktion von EBER1 mit Ago1 konnte mittels Co-Immunpräzipitation sowohl in mit EBER1/2 und Ago1 co-transfizierten, EBV-negativen HEK-293T-Zellen als auch in nicht transfizierten, EBV-positiven Raji-Zellen nachgewiesen werden. Hierbei wurden Signale für die Vollängen-EBER1 als auch für die drei kürzeren EBER1-Fragmente EBER1₂₃, EBER1₅₂ und EBER1₇₀ detektiert. Für EBER2 konnte die Interaktion mit Ago1 in co-transfizierten HEK-293T-Zellen ebenfalls dokumentiert werden. Ein in der Sequenzierung vorhergesagtes 21-24nt kurzes EBER2-Fragment, welches bisher in EBV-positiven Zelllinien nicht darstellbar gewesen war, ist nach Co-IP mit α -Ago1 deutlich zu erkennen, ebenso schwache Signale für größere Fragmente, die, analog zu EBER1, ca. 50 und ca. 70 Nukleotide lang sind. Kürzere EBER2-Fragmente waren allerdings im Input nicht erkennbar. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Detektion der kurzen EBER2-Fragmente durch eine Anreicherung derselben durch die Präzipitation zu Stande kam. Eine Präzipitation von endogenem EBER2 aus EBV-positiven Zellen durch endogenes Ago1 war aus diesem Grund nicht möglich. Die Kontrollen, in denen miRNAs in den Ago1-Präzipitaten nachgewiesen worden waren, bestätigten ein funktionales Ago1-Protein. Ob die Bindung von EBER1/2 an Ago1 direkt oder indirekt zu Stande kommt, ist anhand dieser Experimente nicht zu klären. Ago1 ist vor allem in Pflanzen dafür bekannt, die miRNA-gerichtete Genexpression zu steuern (Shao et al., 2014). In humanen Zellen hingegen ist hauptsächlich Ago2 im Komplex mit miRNAs für die RNA-induzierte Inhibierung der Genexpression verantwortlich (Meister et al., 2004). Es wurden aber auch Studien veröffentlicht, die eine ähnliche Funktion für Ago1 nachweisen konnten (Yamakawa et al., 2014), wobei aktives Zerschneiden einer Target mRNA bisher nur für Ago2 bestätigt werden konnte (Rivas et al., 2005). Dieses posttranskriptionelle „Gensilencing“ findet vorwiegend im Zytoplasma statt, wo EBER1/2-RNAs und -Fragmente nachgewiesen werden konnten. Möglicherweise könnten die EBER-RNAs oder kurze EBER1/2-Fragmente diese Genregulierung positiv oder negativ beeinflussen. Weiterhin konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Ago1 auch im Zellkern biologische Funktionen ausübt. Durch Bindung an Enhancer DNA-Sequenzen kontrolliert Ago1 konstitutives und alternatives Splicing (Allo et al., 2014). Außerdem bindet Ago1 an die RNA-Polymerase II und reguliert so die Expression von Genen, die in onkogenen Signalwegen eine wichtige Rolle spielen (Huang et al., 2013). Da EBER1/2 zu einem geringen Teil auch im Zellkern nachgewiesen werden konnten, ist es ebenfalls möglich, dass sie durch die Assoziation mit Ago1 die Genexpression zum Vorteil von EBV oder des Tumors beeinflussen.

7.4.3.2 Einfluss der EBER-RNAs auf die Regulation von bekannten und neuen miRNA-Zielgenen

Nachdem eine Bindung der EBER1/2-RNAs an das Argonaute 1-Protein festgestellt werden konnte, wurde untersucht, ob EBER1/2, bzw. die kurzen EBER-Fragmente im Ago-Komplex die miRNA-abhängige Regulation der Expression von Zielgenen in irgendeiner Art und Weise beeinflussen können. Möglich wären hierbei verschiedene Effekte. Die ca. 23nt kurzen EBER-Fragmente würden anstelle einer miRNA in den RISC inkorporiert, sodass die miRNA in ihrer Aufgabe der posttranskriptionellen Translationsinhibition nicht mehr nachgehen könnte. Oder aber die EBER1/2-RNAs könnten an einer anderen Stelle im RISC binden, wodurch der Komplex in seiner Oberflächenstruktur verändert werden und die Bindung der miRNA an ein Zielgen weniger effektiv stattfinden könnte. Eine weitere mögliche Auswirkung wäre die Stabilisation der miRNA im RISC, sodass die Translation eines Zielgens stärker inhibiert werden würde. Um den Effekt von EBER1/2 auf die miRNA-Regulation von Zielgenen zu untersuchen, wurden drei bekannte Zielgene von miRNAs auf einen potenziellen Einfluss der EBER1/2-RNAs analysiert. Dabei wurden IL-1 α und RAC1 als Targets für hsa-miR-142-3p und TOMM22 als Zielgen für ebv-miR-BART16 gewählt (Dolken et al., 2010; Motsch et al., 2012; Wu et al., 2011). Als neu bestätigtes Target für die ebv-miR-BART16 wurde S1PR1 ebenfalls in diese Analysen miteinbezogen.

Die Luciferaseassays lieferten weitere Hinweise auf einen Effekt der EBER1/2-RNAs während der miRNA-abhängigen Regulation von Zielgenen. RAC1 konnte durch eine deutliche Reduktion der durch die Luciferase entstandenen relativen Lichteinheiten als Target für hsa-miR-142-3p bestätigt werden. Auch die EBER1/2-RNAs zeigten bereits einen signifikant reduktiven Effekt auf die RAC1-3'UTR. Die Kombination der RNA-Effektorplasmide resultierte in einer noch stärkeren Reduktion der Luciferaseaktivität als EBER1/2, bzw. hsa-miR-142 jeweils alleine ausübten. Luciferaseassays für das hsa-miR-142-3p-Target IL-1 α lieferten ein ähnliches Ergebnis. Die Kombination aus hsa-miR-142 und EBER1/2 lieferte eine signifikant stärkere Reduktion der Luciferaseaktivität als hsa-miR-142 und EBER1/2 es jeweils alleine taten. Diese Beobachtung wurde für IL-1 α weiterhin auf Proteinebene untersucht. Mittels ELISA wurde die Menge an sekretiertem IL-1 α ermittelt und auch der relative Level an sekretiertem IL-1 α war in mit hsa-miR-142 und EBER1/2 co-transfizierten Zellen deutlich stärker reduziert als in mit hsa-miR-142 oder EBER1/2 einfach transfizierten Zellen.

Das potenzielle neue Target S1PR1 für ebv-miR-BART16 wurde zunächst ebenfalls mittels Luciferaseassays untersucht. Zum einen ergaben diese Experimente eine tatsächliche Luciferasereduktion aufgrund der Wirkung von ebv-miR-BART16 auf die S1PR1-3'UTR, was durch den Einsatz einer Bindestellen-Mutante weiterhin bestätigt wurde. Darüber hinaus

wurde auch bei dieser viralen miRNA ein additiver Effekt im Zusammenspiel mit EBER1/2 festgestellt. Diese zusätzliche Reduktion der S1PR1 Genexpression aufgrund der EBER-RNAs und ebv-miR-BART16 wurde sowohl im Dual-Luciferaseassay, welcher auf RNA-Ebene fungiert, als auch auf Proteinebene im Western Blot ermittelt. Schließlich wurde die endogene S1PR1-Proteinmenge in den EBV-positiven NKTL-Zelllinien SNK6 und SNT16, welche jeweils sowohl die virale ebv-miR-BART16 als auch die beiden EBER-RNAs exprimieren, mit dem von primären NK/T-Zellen verglichen. Der Gehalt an S1PR1-Protein in den NKTL-Zelllinien war hierbei signifikant niedriger als in den EBV-negativen, primären NK/T-Zellen, was auf die Expression der ebv-miR-BART16 und EBER1/2 zurückgeführt werden könnte. Weitere regulierende Faktoren sind zu diesem Zeitpunkt nicht auszuschließen. Als weiteres Zielgen der viralen ebv-miR-BART16 wurde das bereits publizierte TOMM22 gewählt, um die Addition der EBER1/2-RNA Effekte auch mit viralen miRNAs zu bestätigen. In diesen Luciferaseassays konnte keine zusätzliche Reduktion der relativen Lichteinheiten durch ebv-miR-BART16 in Kombination mit EBER1/2 festgestellt werden. Auch in den Luciferaseassays mit CUL5 als neu bestätigtes Zielgen für hsa-miR-148a konnte kein additiver Effekt von miRNA und EBER1/2 ermittelt werden (siehe Anhang 2).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass EBER1/2 zur miRNA-abhängigen Inhibition der Target-Genexpression beitragen können. Eine solche „Kooperation“ zwischen miRNA und EBER-RNAs macht sich in einer stärkeren Effektivität der Expressionsreduktion bemerkbar. Anhand dieser Daten kann also ausgeschlossen werden, dass miRNAs, die im Ago-Komplex lokalisiert sind, durch EBER1/2 in ihrer Funktion als posttranskriptionelle Genregulatoren gehindert werden. Außerdem ist es eher unwahrscheinlich, dass EBER1/2 in ihrer kurzen Form mit anderen miRNAs um die Bindung im Ago-Komplex konkurrieren. Wäre dies der Fall, so würde eine Co-Transfektion von EBER1/2 und miRNA im Dual-Luciferaseassay zu einer weniger starken Reduktion der RLU führen als die Transfektion der miRNA alleine. Dass EBER1/2-Fragmente als eigenständige miRNAs fungieren, kann anhand bisher unveröffentlichter Daten, die in Zusammenarbeit mit Dr. Joana Wilson (Glasgow) erstellt wurden, zumindest für die wenigen getesteten potenziellen Zielgene, ebenfalls ausgeschlossen werden (Alles et al., 2015, eingereicht, im Review). Dennoch sind die Effekte, die EBER1/2 alleine in den Luciferase-Analysen ausüben nicht von der Hand zu weisen. Die EBER1/2-RNAs alleine führten bei allen getesteten 3'UTR-Reportern und in einigen Fällen bei dem Reporter-Leervektor zu einer signifikanten Reduktion der Luciferaseaktivität. Eine solche Reduktion würde auf eine generelle Inhibierung der Translation deuten. Weiterhin wäre eine Kooperation der EBER1/2-RNAs mit schon vorhandenen zellulären miRNAs möglich. Diese Daten und die bereits erwähnten Experimente von Dr. Joanna Wilson, in denen gezeigt wurde, dass EBER1/2-Fragmente

keine Funktion als eigenständige miRNAs ausüben, lassen z. T. gegensätzliche Rückschlüsse zu. Die stärkeren inhibitorischen Effekte durch miRNA und EBER1/2 in Kombination, verglichen zu ihren Einzeleffekten, könnten kooperativen oder additiven Ursprunges sein. Echte Kooperation ist gewöhnlich dadurch gekennzeichnet, dass ein merklicher Effekt nur durch Einsatz mehrerer Effektoren in Kombination entstehen kann, wobei die Effektoren alleine keine oder nur geringe Effekte ausüben. Bei einer Addition von Effekten würde es bei jedem der Effektoren bereits zu einer deutlichen Reduktion der Luciferaseaktivität kommen und die Kombination beider führt letztendlich in jedem Fall zu einem nochmals stärkeren Effekt. Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten sind weder eindeutige Indizien für einen kooperativen noch für einen additiven Effekt, denn dieser möglicherweise selektive Effekt trat nur bei einem von zwei getesteten ebv-miR-BART16 Zielgenen auf. Demnach sind hier weitere Experimente nötig, um diesen Sachverhalt genauer aufzuklären. Durch die Bindung an das bereits erwähnte Lupus Antigen könnten die EBER1/2-RNAs miRNAs im RISC stabilisieren, wodurch eine effizientere Genregulation zu Stande kommen könnte (Lerner et al., 1981). Eine Bindung des kurzen EBER1₂₃-Fragmentes an La konnte in Zusammenarbeit mit Daniele Hasler (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gunter Meister, Regensburg) ebenfalls gezeigt werden. Dass La, ebenso wie EBER1/2, hauptsächlich im Zytoplasma EBV-transformierter Zellen lokalisiert ist (Abbildung 44), könnte ein weiteres Indiz dafür sein, dass die Kooperation/Addition mit miRNAs basierend auf dem Lupus Antigen fungiert. Möglicherweise könnte diese Stabilisierung abhängig von der Sequenz der zu regulierenden Target-mRNA sein. Das in den Experimenten der vorliegenden Arbeit eingesetzte EBER1/2-Expressionsplasmid kodiert sowohl für EBER1 als auch für EBER2. Demnach ist bisher keine Aussage darüber möglich, ob die beobachteten Effekte nur aufgrund einer bestimmten EBER-RNA, bzw. eines oder mehrerer Fragmente entstehen oder ob es sich um ein Zusammenwirken von EBER1, EBER2 und ihren kurzen Fragmenten handelt. Allerdings konnte in bislang unveröffentlichten Daten in Zusammenarbeit mit Dr. Joana Wilson (Glasgow) gezeigt werden, dass die Effekte durch EBER1 alleine herbeigeführt werden können. Ebenso wurde in Reporteranalysen, durch Verwendung mutierter EBER1-Expressionsplasmide, die kein EBER1₂₃-Fragment mehr prozessieren können, nachgewiesen, dass die additiven/kooperativen Effekte nicht durch das kurze EBER1₂₃-Fragment hervorgerufen werden (Alles et al., 2015, eingereicht, im Review).

RAC1 (RAS-related C3 Botulinum Toxin Substrat 1) gehört zur RAS-Familie der kleinen GTP-Bindeproteine und wurde bereits von Wu und Kollegen als Zielgen für hsa-miR-142-3p bestätigt. Eine negativ differenziell exprimierte hsa-miR-142, die RAC1 reguliert, hat demnach eine erhöhte RAC1-Expression zur Folge, was in Migration und Invasion und Metastasierung von Leberkarzinomzellen resultiert (Wu et al., 2011; Zhou et al., 2014). Außerdem wurde gezeigt, dass RAC1 in Krebszellen das Fortschreiten des Zellzyklus am

G1/S-Phase Kontrollpunkt erleichtern kann (Liu et al., 2014b). Durch Bildung eines Komplexes mit Bcl-2 verhindert RAC1 die Apoptose (Velaithan et al., 2011). Auch die Regulation von RAC1 durch weitere, in anderen Krebsarten negativ deregulierte, miRNAs ist bekannt (Lin et al., 2014; Sun et al., 2014; Zhao et al., 2014). Eine tumorfördernde Funktion von RAC1 in NKTL wurde noch nicht bestätigt. In DLBCL liegt eine Mutation von hsa-miR-142-3p vor, aufgrund der die RAC1-Expression weniger stark reprimiert werden würde, was in einer antiapoptotischen Wirkung resultieren könnte (Kwanhian et al., 2012). In p53-defizienten B- und T-Zell Lymphomen führt eine RAC1-Überexpression zu verstärkter Proliferation (Bosco et al., 2010). Die vermutlich starke Expression von RAC1 in NKTL aufgrund der reprimierten hsa-miR-142-3p könnte durch das Zusammenwirken von EBER1/2 und hsa-miR-142 zu einem kleinen Teil eingedämmt werden, was aber für den Tumor ein Nachteil darstellen könnte. In wie fern dieser z. T. gegensätzliche Effekt in NKTL zur Tumorentstehung oder –progression beiträgt, bleibt unklar.

Das Zytokin IL-1 α wird normalerweise von Makrophagen und Monozyten sezerniert, um inflammatorische Signalwege zu initiieren (Sims and Smith, 2010). Intrazelluläres IL-1 α kann in Tumorzellen ihre Invasivität fördern (Apte et al., 2006). In EBV-assoziierten NPC wurden erhöhte IL-1 α -Mengen nachgewiesen, wodurch das Tumorwachstum und die Infiltration von Lymphozyten stimuliert werden könnte (Huang et al., 1999). Durch eine konstitutive NF κ B-Aktivierung durch IL-1 α können sich chronische Entzündungen manifestieren, welche im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren und den für NKTL charakteristischen nekrotischen Läsionen stehen (Melisi et al., 2009; Meneses-Garcia et al., 2008). Die Regulation von IL-1 α durch hsa-miR-142-3p wurde bereits ausführlich analysiert und eine Kooperation in dieser posttranskriptionellen Regulation mit EBER1/2 wäre, wie auch im Fall von RAC1, eigentlich für den Tumor kontraproduktiv (Motsch et al., 2012). Allerdings liegt in NKTL lediglich ein sehr geringes Niveau an hsa-miR-142-3p vor, sodass das Zusammenspiel mit EBER1/2 wahrscheinlich keinen großen Einfluss auf die IL-1 α -Überexpression ausübt. Durch Analyse der IL-1 α -Expression in EBER1/2-defizienten, EBV-positiven Zellen könnte dieser Sachverhalt untersucht werden.

S1PR1 wurde unter dem Namen EDG1 ursprünglich in sich differenzierenden Endothelzellen entdeckt und stellt einen von insgesamt fünf G-Protein gekoppelten Rezeptoren dar, die durch Sphingosin-1-Phosphat aktiviert werden können (Hla and Maciag, 1990; Rosen and Goetzl, 2005). Auch in B-, T- und NK-Zellen wird S1PR1 als Oberflächenmarker exprimiert und erhielt daher kürzlich den Namen CD363 (Matesanz-Isabel et al., 2011). T- und B-Lymphozyten benötigen S1PR1 zur Auswanderung aus dem Thymus und peripheren lymphoiden Organen (Matloubian et al., 2004; Pappu et al., 2007; Schwab and Cyster, 2007). In vielen Tumoren, auch Lymphomen, findet man eine starke Expression von S1PR1 (Nishimura et al., 2010). S1PR1 aktiviert dort STAT3 via JAK2 und ist, z. B. in DLBCL, für

den hohen STAT3-Level verantwortlich (Liu et al., 2012b). STAT3 wiederum sorgt als Transkriptionsfaktor für eine verstärkte S1PR1- und IL-6-Expression (Lee et al., 2010). Über die Proteinmengen von IL-6 und STAT3 gibt es zu diesem Zeitpunkt noch keine Studien, allerdings konnte gezeigt werden, dass STAT3 in NKTL konstitutiv aktiv ist (Coppo et al., 2009). Eine Herunterregulation von S1PR1 und die daraus resultierende gesteigerte Proliferation wurde für Brustkrebs bestätigt (Wittmann et al., 2003) und in Lungenkarzinomen korrelieren niedrige Mengen an S1PR1-Protein mit einem hohen Potenzial für Metastasierung (Nakano et al., 2012). Die Inhibierung von S1PR1 erhöht auch die Proliferation und Malignität von Glioblastomen (Yoshida et al., 2010). In tumoralen NK-Zellen wurde bereits eine geringe Expression von S1PR1 als in normalen NK-Zellen festgestellt (Gillard-Bocquet et al., 2013). Gemeinsam mit der in dieser Arbeit ermittelten, verminderten S1PR1-Expression durch die EB-virale miR-BART16 in Zusammenarbeit mit EBER1/2 in NKTL-Zellen könnte also ein reduzierter S1PR1-Level die NKTL-Tumorbildung steigern.

8 Literaturverzeichnis

Abdelmohsen, K., Tominaga-Yamanaka, K., Srikantan, S., Yoon, J.H., Kang, M.J., Gorospe, M., 2012. RNA-binding protein AUF1 represses Dicer expression. *Nucleic acids research* 40, 11531-11544.

Ahmed, W., Philip, P.S., Tariq, S., Khan, G., 2014. Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) are present in fractions related to exosomes released by EBV-transformed cells. *PloS one* 9, e99163.

Alles, J., 2011. Vergleich zweier Sequenzierungen von Epstein-Barr Virus assoziierten NK/T-Zell-Lymphomen zur Erstellung eines microRNA Profils. Diplomarbeit.

Alles, J., Hasler, D., Kazmi, S.M.A., Tesson, M., Hamilton, A., Borchard, H., Schlegel, L., Marx, S., Hart, M., Motsch, N., Wolff, M., Eichner, N., Reinhardt, R., Wilson, J.B., Meister, G., Grässer, F., 2015. Epstein-Barr virus EBER transcripts are processed to small RNA fragments that are associated with the lupus antigen (La) and affect miRNA-mediated regulation of distinct mRNA targets. *PloS one* under review.

Allo, M., Agirre, E., Bessonov, S., Bertucci, P., Gomez Acuna, L., Buggiano, V., Bellora, N., Singh, B., Petrillo, E., Blaustein, M., Minana, B., Dujardin, G., Pozzi, B., Pelisch, F., Bechara, E., Agafonov, D.E., Srebrow, A., Luhrmann, R., Valcarcel, J., Eyraes, E., Kornblihtt, A.R., 2014. Argonaute-1 binds transcriptional enhancers and controls constitutive and alternative splicing in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 15622-15629.

Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., Tuschl, T., 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9, 277-279.

Ambrosio, M.R., Navari, M., Di Lisio, L., Leon, E.A., Onnis, A., Gazaneo, S., Mundo, L., Ulivieri, C., Gomez, G., Lazzi, S., Piris, M.A., Leoncini, L., De Falco, G., 2014. The Epstein Barr-encoded BART-6-3p microRNA affects regulation of cell growth and immuno response in Burkitt lymphoma. *Infectious agents and cancer* 9, 12.

Ameyar-Zazoua, M., Rachez, C., Souidi, M., Robin, P., Fritsch, L., Young, R., Morozova, N., Fenouil, R., Descostes, N., Andrau, J.C., Mathieu, J., Hamiche, A., Ait-Si-Ali, S., Muchardt, C., Batsche, E., Harel-Bellan, A., 2012. Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. *Nature structural & molecular biology* 19, 998-1004.

Amini, R.M., Berglund, M., Rosenquist, R., Von Heideman, A., Lagercrantz, S., Thunberg, U., Bergh, J., Sundstrom, C., Glimelius, B., Enblad, G., 2002. A novel B-cell line (U-2932) established from a patient with diffuse large B-cell lymphoma following Hodgkin lymphoma. *Leukemia & lymphoma* 43, 2179-2189.

Aozasa, K., Zaki, M.A., 2011. Epidemiology and pathogenesis of nasal NK/T-cell lymphoma: a mini-review. *TheScientificWorldJournal* 11, 422-428.

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

- Aqeilan, R.I., Calin, G.A., Croce, C.M., 2010. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell death and differentiation* 17, 215-220.
- Aravin, A.A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., Tuschl, T., 2003. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Developmental cell* 5, 337-350.
- Arnulf, B., Copie-Bergman, C., Delfau-Larue, M.H., Lavergne-Slove, A., Bosq, J., Wechsler, J., Wassef, M., Matuchansky, C., Epardeau, B., Stern, M., Bagot, M., Reyes, F., Gaulard, P., 1998. Nonhepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma: a subset of cytotoxic lymphomas with mucosal or skin localization. *Blood* 91, 1723-1731.
- Arrand, J.R., Rymo, L., 1982. Characterization of the major Epstein-Barr virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *Journal of virology* 41, 376-389.
- Azevedo de Andrade, T., Evangelista, A.F., Campos, A.H., Poles, W.A., Borges, N.M., Coutinho-Camillo, C.M., Soares, F.A., Vassallo, J., Paes, R.P., Zerbini, M.C., Scapulatempo, C., Alves, A.C., Young, K.H., Colleoni, G.W., 2014. A microRNA signature profile in EBV+ diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Oncotarget*.
- Babcock, G.J., Decker, L.L., Volk, M., Thorley-Lawson, D.A., 1998. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 9, 395-404.
- Bachmann, M., Pfeifer, K., Schroder, H.C., Muller, W.E., 1989. The La antigen shuttles between the nucleus and the cytoplasm in CV-1 cells. *Molecular and cellular biochemistry* 85, 103-114.
- Barbato, C., Arisi, I., Frizzo, M.E., Brandi, R., Da Sacco, L., Masotti, A., 2009. Computational challenges in miRNA target predictions: to be or not to be a true target? *Journal of biomedicine & biotechnology* 2009, 803069.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Barth, S., Pfuhl, T., Mamiani, A., Ehses, C., Roemer, K., Kremmer, E., Jaker, C., Hock, J., Meister, G., Grasser, F.A., 2008. Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic acids research* 36, 666-675.
- Ben-Bassat, H., Goldblum, N., Mitrani, S., Goldblum, T., Yoffey, J.M., Cohen, M.M., Bentwich, Z., Ramot, B., Klein, E., Klein, G., 1977. Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75). *International journal of cancer. Journal international du cancer* 19, 27-33.
- Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E., Lai, E.C., 2007. Mammalian mirtron genes. *Molecular cell* 28, 328-336.
- Bernard, M.A., Zhao, H., Yue, S.C., Anandaiah, A., Koziel, H., Tachado, S.D., 2014. Novel HIV-1 miRNAs stimulate TNFalpha release in human macrophages via TLR8 signaling pathway. *PloS one* 9, e106006.
- Bhat, R.A., Thimmappaya, B., 1983. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus can functionally substitute for the virus-associated RNAs in the lytic growth of adenovirus 5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 4789-4793.

- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., Filipowicz, W., 2006. Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 71, 513-521.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-1523.
- Bohmer, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., Benning, C., 1998. AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *The EMBO journal* 17, 170-180.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C., Boyer, H.W., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2, 75-93.
- Borchert, G.M., Lanier, W., Davidson, B.L., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology* 13, 1097-1101.
- Bornkamm, G.W., Polack, A., Eick, D., Berger, R., Lenoir, G.M., 1987. [Chromosome translocations and Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma]. *Onkologie* 10, 196-204.
- Bosco, E.E., Ni, W., Wang, L., Guo, F., Johnson, J.F., Zheng, Y., 2010. Rac1 targeting suppresses p53 deficiency-mediated lymphomagenesis. *Blood* 115, 3320-3328.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E., 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology* 106, 761-771.
- Burkitt, D., 1958. A sarcoma involving the jaws in African children. *The British journal of surgery* 46, 218-223.
- Buscaglia, L.E., Li, Y., 2011. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chinese journal of cancer* 30, 371-380.
- Cai, L.M., Lyu, X.M., Luo, W.R., Cui, X.F., Ye, Y.F., Yuan, C.C., Peng, Q.X., Wu, D.H., Liu, T.F., Wang, E., Marincola, F.M., Yao, K.T., Fang, W.Y., Cai, H.B., Li, X., 2014. EBV-miR-BART7-3p promotes the EMT and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by suppressing the tumor suppressor PTEN. *Oncogene*.
- Cai, Q.L., Knight, J.S., Verma, S.C., Zald, P., Robertson, E.S., 2006a. EC5S ubiquitin complex is recruited by KSHV latent antigen LANA for degradation of the VHL and p53 tumor suppressors. *PLoS pathogens* 2, e116.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R., 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957-1966.
- Cai, X., Schafer, A., Lu, S., Bilello, J.P., Desrosiers, R.C., Edwards, R., Raab-Traub, N., Cullen, B.R., 2006b. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS pathogens* 2, e23.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., Croce, C.M., 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15524-15529.

Carbone, A., Cesarman, E., Spina, M., Gloghini, A., Schulz, T.F., 2009. HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. *Blood* 113, 1213-1224.

Carbone, A., Gloghini, A., Dotti, G., 2008. EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. *The oncologist* 13, 577-585.

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

Chang, K.L., Chen, Y.Y., Shibata, D., Weiss, L.M., 1992. Description of an in situ hybridization methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B* 1, 246-255.

Chang, T.C., Yu, D., Lee, Y.S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko, A., Mendell, J.T., 2008. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature genetics* 40, 43-50.

Chen, S.J., Chen, G.H., Chen, Y.H., Liu, C.Y., Chang, K.P., Chang, Y.S., Chen, H.C., 2010. Characterization of Epstein-Barr virus miRNAome in nasopharyngeal carcinoma by deep sequencing. *PloS one* 5.

Chen, Z., Ma, T., Huang, C., Hu, T., Li, J., 2014. The pivotal role of microRNA-155 in the control of cancer. *Journal of cellular physiology* 229, 545-550.

Chiang, A.K., Tao, Q., Srivastava, G., Ho, F.C., 1996. Nasal NK- and T-cell lymphomas share the same type of Epstein-Barr virus latency as nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin's disease. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 68, 285-290.

Choi, H., Lee, H., Kim, S.R., Gho, Y.S., Lee, S.K., 2013. Epstein-Barr virus-encoded microRNA BART15-3p promotes cell apoptosis partially by targeting BRUCE. *Journal of virology* 87, 8135-8144.

Choy, E.Y., Siu, K.L., Kok, K.H., Lung, R.W., Tsang, C.M., To, K.F., Kwong, D.L., Tsao, S.W., Jin, D.Y., 2008. An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *The Journal of experimental medicine* 205, 2551-2560.

Clarke, P.A., Sharp, N.A., Clemens, M.J., 1990. Translational control by the Epstein-Barr virus small RNA EBER-1. Reversal of the double-stranded RNA-induced inhibition of protein synthesis in reticulocyte lysates. *European journal of biochemistry / FEBS* 193, 635-641.

Clarke, P.A., Sharp, N.A., Clemens, M.J., 1992. Expression of genes for the Epstein-Barr virus small RNAs EBER-1 and EBER-2 in Daudi Burkitt's lymphoma cells: effects of interferon treatment. *The Journal of general virology* 73 (Pt 12), 3169-3175.

Collandre, H., Guetard, D., Montagnier, L., 1984. Induction of EBV DNA demethylation and of EBV-specific transcription in Daudi cells treated with TPA and n-butyrate. *Intervirology* 22, 201-210.

Coppo, P., Gouilleux-Gruart, V., Huang, Y., Bouhlal, H., Bouamar, H., Bouchet, S., Perrot, C., Vieillard, V., Dartigues, P., Gaulard, P., Agbalika, F., Douay, L., Lassoued, K., Gorin, N.C., 2009. STAT3 transcription factor is constitutively activated and is oncogenic in nasal-type NK/T-cell lymphoma. *Leukemia* 23, 1667-1678.

- Cosmopoulos, K., Pegtel, M., Hawkins, J., Moffett, H., Novina, C., Middeldorp, J., Thorley-Lawson, D.A., 2009. Comprehensive profiling of Epstein-Barr virus microRNAs in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of virology* 83, 2357-2367.
- D'Urso, P.I., D'Urso, O.F., Storelli, C., Mallardo, M., Gianfreda, C.D., Montinaro, A., Cimmino, A., Pietro, C., Marsigliante, S., 2012. miR-155 is up-regulated in primary and secondary glioblastoma and promotes tumour growth by inhibiting GABA receptors. *International journal of oncology* 41, 228-234.
- Dedeoglu, B.G., 2014. High-throughput approaches for microRNA expression analysis. *Methods Mol Biol* 1107, 91-103.
- Delecluse, H.J., Feederle, R., O'Sullivan, B., Taniere, P., 2007. Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist. *Journal of clinical pathology* 60, 1358-1364.
- Deshaias, R.J., Joazeiro, C.A., 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual review of biochemistry* 78, 399-434.
- Di Leva, G., Croce, C.M., 2010. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends in molecular medicine* 16, 257-267.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G., 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic acids research* 11, 1475-1489.
- Dobbelstein, M., Shenk, T., 1995. In vitro selection of RNA ligands for the ribosomal L22 protein associated with Epstein-Barr virus-expressed RNA by using randomized and cDNA-derived RNA libraries. *Journal of virology* 69, 8027-8034.
- Dolken, L., Malterer, G., Erhard, F., Kothe, S., Friedel, C.C., Suffert, G., Marcinowski, L., Motsch, N., Barth, S., Beitzinger, M., Lieber, D., Bailer, S.M., Hoffmann, R., Ruzsics, Z., Kremmer, E., Pfeffer, S., Zimmer, R., Koszinowski, U.H., Grasser, F., Meister, G., Haas, J., 2010. Systematic analysis of viral and cellular microRNA targets in cells latently infected with human gamma-herpesviruses by RISC immunoprecipitation assay. *Cell host & microbe* 7, 324-334.
- Dugaiczyk, A., Boyer, H.W., Goodman, H.M., 1975. Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *Journal of molecular biology* 96, 171-184.
- Edwards, R.H., Marquitz, A.R., Raab-Traub, N., 2008. Epstein-Barr virus BART microRNAs are produced from a large intron prior to splicing. *Journal of virology* 82, 9094-9106.
- Elia, A., Laing, K.G., Schofield, A., Tilleray, V.J., Clemens, M.J., 1996. Regulation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by RNAs encoded by a repeated sequence in the Epstein-Barr virus genome. *Nucleic acids research* 24, 4471-4478.
- Elliott, J., Hookham, M.B., Johnston, J.A., 2008. The suppressors of cytokine signalling E3 ligases behave as tumour suppressors. *Biochemical Society transactions* 36, 464-468.
- Engels, B.M., Hutvagner, G., 2006. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 25, 6163-6169.
- Epstein, M.A., Achong, B.G., Barr, Y.M., 1964. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1, 702-703.

- Epstein, M.A., Achong, B.G., Barr, Y.M., Zajac, B., Henle, G., Henle, W., 1966. Morphological and virological investigations on cultured Burkitt tumor lymphoblasts (strain Raji). *Journal of the National Cancer Institute* 37, 547-559.
- Epstein, M.A., Henle, G., Achong, B.G., Barr, Y.M., 1965. Morphological and Biological Studies on a Virus in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *The Journal of experimental medicine* 121, 761-770.
- Esquela-Kerscher, A., Slack, F.J., 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews. Cancer* 6, 259-269.
- Faehnle, C.R., Elkayam, E., Haase, A.D., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L., 2013. The making of a slicer: activation of human Argonaute-1. *Cell reports* 3, 1901-1909.
- Feederle, R., Linnstaedt, S.D., Bannert, H., Lips, H., Bencun, M., Cullen, B.R., Delecluse, H.J., 2011. A viral microRNA cluster strongly potentiates the transforming properties of a human herpesvirus. *PLoS pathogens* 7, e1001294.
- Fehniger, T.A., Wylie, T., Germino, E., Leong, J.W., Magrini, V.J., Koul, S., Keppel, C.R., Schneider, S.E., Koboldt, D.C., Sullivan, R.P., Heinz, M.E., Crosby, S.D., Nagarajan, R., Ramsingh, G., Link, D.C., Ley, T.J., Mardis, E.R., 2010. Next-generation sequencing identifies the natural killer cell microRNA transcriptome. *Genome research* 20, 1590-1604.
- Feng, Y., Chen, X., Gao, L., 2010. Knockdown of miR-21 as a novel approach for leukemia therapy. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 109, 621-623.
- Ferdin, J., Kunej, T., Calin, G.A., 2010. Non-coding RNAs: identification of cancer-associated microRNAs by gene profiling. *Technology in cancer research & treatment* 9, 123-138.
- Fink, S.E., Gandhi, M.K., Nourse, J.P., Keane, C., Jones, K., Crooks, P., Johrens, K., Korfel, A., Schmidt, H., Neumann, S., Tiede, A., Jager, U., Duhrsen, U., Neuhaus, R., Dreyling, M., Borchert, K., Sudhoff, T., Riess, H., Anagnostopoulos, I., Trappe, R.U., 2014. A Comprehensive Analysis of the Cellular and EBV-Specific MicroRNAome in Primary CNS PTLD Identifies Different Patterns Among EBV-Associated Tumors. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 14, 2577-2587.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Flores, O., Kennedy, E.M., Skalsky, R.L., Cullen, B.R., 2014. Differential RISC association of endogenous human microRNAs predicts their inhibitory potential. *Nucleic acids research* 42, 4629-4639.
- Fok, V., Friend, K., Steitz, J.A., 2006a. Epstein-Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *The Journal of cell biology* 173, 319-325.
- Fok, V., Mitton-Fry, R.M., Grech, A., Steitz, J.A., 2006b. Multiple domains of EBER 1, an Epstein-Barr virus noncoding RNA, recruit human ribosomal protein L22. *RNA* 12, 872-882.
- Forrester, N.A., Sedgwick, G.G., Thomas, A., Blackford, A.N., Speiseder, T., Dobner, T., Byrd, P.J., Stewart, G.S., Turnell, A.S., Grand, R.J., 2011. Serotype-specific inactivation of the cellular DNA damage response during adenovirus infection. *Journal of virology* 85, 2201-2211.

- Gao, M., Wei, W., Li, M.M., Wu, Y.S., Ba, Z., Jin, K.X., Liao, Y.Q., Adhikari, S., Chong, Z., Zhang, T., Guo, C.X., Tang, T.S., Zhu, B.T., Xu, X.Z., Mailand, N., Yang, Y.G., Qi, Y., Rendtlew Danielsen, J.M., 2014. Ago2 facilitates Rad51 recruitment and DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Cell research* 24, 532-541.
- Garofalo, M., Croce, C.M., 2011. microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annual review of pharmacology and toxicology* 51, 25-43.
- Gibcus, J.H., Tan, L.P., Harms, G., Schakel, R.N., de Jong, D., Blokzijl, T., Moller, P., Poppema, S., Kroesen, B.J., van den Berg, A., 2009. Hodgkin lymphoma cell lines are characterized by a specific miRNA expression profile. *Neoplasia* 11, 167-176.
- Gillard-Bocquet, M., Caer, C., Cagnard, N., Crozet, L., Perez, M., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., Cremer, I., 2013. Lung tumor microenvironment induces specific gene expression signature in intratumoral NK cells. *Frontiers in immunology* 4, 19.
- Gilligan, K., Rajadurai, P., Resnick, L., Raab-Traub, N., 1990. Epstein-Barr virus small nuclear RNAs are not expressed in permissively infected cells in AIDS-associated leukoplakia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 8790-8794.
- Glickman, J.N., Howe, J.G., Steitz, J.A., 1988. Structural analyses of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. *Journal of virology* 62, 902-911.
- Gottlieb, E., Steitz, J.A., 1989. Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *The EMBO journal* 8, 851-861.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36, 59-74.
- Gregorovic, G., Bosshard, R., Karstegl, C.E., White, R.E., Pattle, S., Chiang, A.K., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Russ, R., Farrell, P.J., 2011. Cellular gene expression that correlates with EBER expression in Epstein-Barr Virus-infected lymphoblastoid cell lines. *Journal of virology* 85, 3535-3545.
- Grywalska, E., Markowicz, J., Grabarczyk, P., Pasiarski, M., Rolinski, J., 2013. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 67, 481-490.
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C., 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., Kim, V.N., 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development* 18, 3016-3027.
- Hart, M., Nolte, E., Wach, S., Szczyrba, J., Taubert, H., Rau, T.T., Hartmann, A., Grasser, F.A., Wullich, B., 2014. Comparative microRNA profiling of prostate carcinomas with increasing tumor stage by deep sequencing. *Molecular cancer research : MCR* 12, 250-263.
- Harwig, A., Das, A.T., Berkhout, B., 2014. Retroviral microRNAs. *Current opinion in virology* 7, 47-54.
- Henle, G., Henle, W., Diehl, V., 1968. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 59, 94-101.

- Henle, W., Diehl, V., Kohn, G., Zur Hausen, H., Henle, G., 1967. Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* 157, 1064-1065.
- Hershko, A., Ciechanover, A., 1998. The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* 67, 425-479.
- Hinuma, Y., Konn, M., Yamaguchi, J., Wudarski, D.J., Blakeslee, J.R., Jr., Grace, J.T., Jr., 1967. Immunofluorescence and herpes-type virus particles in the P3HR-1 Burkitt lymphoma cell line. *Journal of virology* 1, 1045-1051.
- Hla, T., Maciag, T., 1990. An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *The Journal of biological chemistry* 265, 9308-9313.
- Ho, Y., Tsao, S.W., Zeng, M., Lui, V.W., 2013. STAT3 as a therapeutic target for Epstein-Barr virus (EBV): associated nasopharyngeal carcinoma. *Cancer letters* 330, 141-149.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., Endres, S., Hartmann, G., 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994-997.
- Howe, J.G., Shu, M.D., 1988. Isolation and characterization of the genes for two small RNAs of herpesvirus papio and their comparison with Epstein-Barr virus-encoded EBER RNAs. *Journal of virology* 62, 2790-2798.
- Howe, J.G., Shu, M.D., 1989. Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: unique transcription units that combine RNA polymerase II and III promoter elements. *Cell* 57, 825-834.
- Howe, J.G., Steitz, J.A., 1986. Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 9006-9010.
- Hsu, C.Y., Yi, Y.H., Chang, K.P., Chang, Y.S., Chen, S.J., Chen, H.C., 2014. The Epstein-Barr virus-encoded microRNA MiR-BART9 promotes tumor metastasis by targeting E-cadherin in nasopharyngeal carcinoma. *PLoS pathogens* 10, e1003974.
- Hu, Q., Tanasa, B., Trabucchi, M., Li, W., Zhang, J., Ohgi, K.A., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2012. DICER- and AGO3-dependent generation of retinoic acid-induced DR2 Alu RNAs regulates human stem cell proliferation. *Nature structural & molecular biology* 19, 1168-1175.
- Hua, D., Mo, F., Ding, D., Li, L., Han, X., Zhao, N., Foltz, G., Lin, B., Lan, Q., Huang, Q., 2012. A catalogue of glioblastoma and brain MicroRNAs identified by deep sequencing. *Omics : a journal of integrative biology* 16, 690-699.
- Huang, V., Zheng, J., Qi, Z., Wang, J., Place, R.F., Yu, J., Li, H., Li, L.C., 2013. Ago1 Interacts with RNA polymerase II and binds to the promoters of actively transcribed genes in human cancer cells. *PLoS genetics* 9, e1003821.
- Huang, Y.T., Sheen, T.S., Chen, C.L., Lu, J., Chang, Y., Chen, J.Y., Tsai, C.H., 1999. Profile of cytokine expression in nasopharyngeal carcinomas: a distinct expression of interleukin 1 in tumor and CD4+ T cells. *Cancer research* 59, 1599-1605.

- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., Zamore, P.D., 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834-838.
- Hutvagner, G., Simard, M.J., 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 22-32.
- Iizasa, H., Wulff, B.E., Alla, N.R., Maragkakis, M., Megraw, M., Hatzigeorgiou, A., Iwakiri, D., Takada, K., Wiedmer, A., Showe, L., Lieberman, P., Nishikura, K., 2010. Editing of Epstein-Barr virus-encoded BART6 microRNAs controls their dicer targeting and consequently affects viral latency. *The Journal of biological chemistry* 285, 33358-33370.
- Imig, J., Motsch, N., Zhu, J.Y., Barth, S., Okoniewski, M., Reineke, T., Tinguely, M., Faggioni, A., Trivedi, P., Meister, G., Renner, C., Grasser, F.A., 2011. microRNA profiling in Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma. *Nucleic acids research* 39, 1880-1893.
- Isobe, Y., Sugimoto, K., Yang, L., Tamayose, K., Egashira, M., Kaneko, T., Takada, K., Oshimi, K., 2004. Epstein-Barr virus infection of human natural killer cell lines and peripheral blood natural killer cells. *Cancer research* 64, 2167-2174.
- Ito, M., Teshima, K., Ikeda, S., Kitadate, A., Watanabe, A., Nara, M., Yamashita, J., Ohshima, K., Sawada, K., Tagawa, H., 2014. MicroRNA-150 inhibits tumor invasion and metastasis by targeting the chemokine receptor CCR6, in advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 123, 1499-1511.
- Iwakiri, D., 2014. Epstein-Barr Virus-Encoded RNAs: Key Molecules in Viral Pathogenesis. *Cancers* 6, 1615-1630.
- Iwakiri, D., Eizuru, Y., Tokunaga, M., Takada, K., 2003. Autocrine growth of Epstein-Barr virus-positive gastric carcinoma cells mediated by an Epstein-Barr virus-encoded small RNA. *Cancer research* 63, 7062-7067.
- Iwakiri, D., Sheen, T.S., Chen, J.Y., Huang, D.P., Takada, K., 2005. Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces insulin-like growth factor 1 and supports growth of nasopharyngeal carcinoma-derived cell lines. *Oncogene* 24, 1767-1773.
- Iwakiri, D., Zhou, L., Samanta, M., Matsumoto, M., Ebihara, T., Seya, T., Imai, S., Fujieda, M., Kawa, K., Takada, K., 2009. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *The Journal of experimental medicine* 206, 2091-2099.
- Janowski, B.A., Huffman, K.E., Schwartz, J.C., Ram, R., Nordsell, R., Shames, D.S., Minna, J.D., Corey, D.R., 2006. Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nature structural & molecular biology* 13, 787-792.
- Jansson, M.D., Lund, A.H., 2012. MicroRNA and cancer. *Molecular oncology* 6, 590-610.
- Jardin, F., Figeac, M., 2013. MicroRNAs in lymphoma, from diagnosis to targeted therapy. *Current opinion in oncology* 25, 480-486.
- Jazbutyte, V., Thum, T., 2010. MicroRNA-21: from cancer to cardiovascular disease. *Current drug targets* 11, 926-935.
- Jiang, Q.P., Liu, S.Y., Yang, Y.X., Tan, X.X., Peng, J., Xiong, Z.T., Li, Z., 2012. CD20-positive NK/T-cell lymphoma with indolent clinical course: report of case and review of literature. *Diagnostic pathology* 7, 133.

- Jun, S.M., Hong, Y.S., Seo, J.S., Ko, Y.H., Yang, C.W., Lee, S.K., 2008. Viral microRNA profile in Epstein-Barr virus-associated peripheral T cell lymphoma. *British journal of haematology* 142, 320-323.
- Jung, Y.J., Choi, H., Kim, H., Lee, S.K., 2014. MicroRNA miR-BART20-5p stabilizes Epstein-Barr virus latency by directly targeting BZLF1 and BRLF1. *Journal of virology* 88, 9027-9037.
- Jurkovicova, D., Magyerkova, M., Kulcsar, L., Krivjanska, M., Krivjansky, V., Gibadulinova, A., Oveckova, I., Chovanec, M., 2014. miR-155 as a diagnostic and prognostic marker in hematological and solid malignancies. *Neoplasma* 61, 241-251.
- Kalla, C., Scheuermann, M.O., Kube, I., Schlotter, M., Mertens, D., Dohner, H., Stilgenbauer, S., Lichter, P., 2007. Analysis of 11q22-q23 deletion target genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: evidence for a pathogenic role of NPAT, CUL5, and PPP2R1B. *European journal of cancer* 43, 1328-1335.
- Kanegane, H., Wang, F., Tosato, G., 1996. Virus-cell interactions in a natural killer-like cell line from a patient with lymphoblastic lymphoma. *Blood* 88, 4667-4675.
- Katze, M.G., Wambach, M., Wong, M.L., Garfinkel, M., Meurs, E., Chong, K., Williams, B.R., Hovanessian, A.G., Barber, G.N., 1991. Functional expression and RNA binding analysis of the interferon-induced, double-stranded RNA-activated, 68,000-Mr protein kinase in a cell-free system. *Molecular and cellular biology* 11, 5497-5505.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., Plasterk, R.H., 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & development* 15, 2654-2659.
- Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D., 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.
- Kim do, N., Chae, H.S., Oh, S.T., Kang, J.H., Park, C.H., Park, W.S., Takada, K., Lee, J.M., Lee, W.K., Lee, S.K., 2007. Expression of viral microRNAs in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Journal of virology* 81, 1033-1036.
- Kincaid, R.P., Sullivan, C.S., 2012. Virus-encoded microRNAs: an overview and a look to the future. *PLoS pathogens* 8, e1003018.
- Kintner, C.R., Sugden, B., 1979. The structure of the termini of the DNA of Epstein-Barr virus. *Cell* 17, 661-671.
- Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., Mourelatos, Z., 2007. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129, 1141-1151.
- Kolbert, C.P., Feddersen, R.M., Rakhshan, F., Grill, D.E., Simon, G., Middha, S., Jang, J.S., Simon, V., Schultz, D.A., Zschunke, M., Lingle, W., Carr, J.M., Thompson, E.A., Oberg, A.L., Eckloff, B.W., Wieben, E.D., Li, P., Yang, P., Jen, J., 2013. Multi-platform analysis of microRNA expression measurements in RNA from fresh frozen and FFPE tissues. *PloS one* 8, e52517.
- Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T., Takada, K., 1999. Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *Journal of virology* 73, 9827-9831.

Kopp, K.L., Ralfkiaer, U., Gjerdrum, L.M., Helvad, R., Pedersen, I.H., Litman, T., Jonson, L., Hagedorn, P.H., Krejsgaard, T., Gniadecki, R., Bonefeld, C.M., Skov, L., Geisler, C., Wasik, M.A., Ralfkiaer, E., Odum, N., Woetmann, A., 2013. STAT5-mediated expression of oncogenic miR-155 in cutaneous T-cell lymphoma. *Cell Cycle* 12, 1939-1947.

Kozomara, A., Griffiths-Jones, S., 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research* 42, D68-73.

Kulda, V., Pesta, M., Topolcan, O., Liska, V., Treska, V., Sutnar, A., Rupert, K., Ludvikova, M., Babuska, V., Holubec, L., Jr., Cerny, R., 2010. Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases. *Cancer genetics and cytogenetics* 200, 154-160.

Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R., Jacks, T., 2007. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nature genetics* 39, 673-677.

Kurniawan, A.N., Hongyo, T., Hardjolukito, E.S., Ham, M.F., Takakuwa, T., Kodariah, R., Hoshida, Y., Nomura, T., Aozasa, K., 2006. Gene mutation analysis of sinonasal lymphomas in Indonesia. *Oncology reports* 15, 1257-1263.

Kutok, J.L., Wang, F., 2006. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annual review of pathology* 1, 375-404.

Kwanhian, W., Lenze, D., Alles, J., Motsch, N., Barth, S., Doll, C., Imig, J., Hummel, M., Tinguely, M., Trivedi, P., Lulitanond, V., Meister, G., Renner, C., Grasser, F.A., 2012. MicroRNA-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer medicine* 1, 141-155.

La Rocca, G., Olejniczak, S.H., Gonzalez, A.J., Briskin, D., Vidigal, J.A., Spraggon, L., DeMatteo, R.G., Radler, M.R., Lindsten, T., Ventura, A., Tuschl, T., Leslie, C.S., Thompson, C.B., 2015. In vivo, Argonaute-bound microRNAs exist predominantly in a reservoir of low molecular weight complexes not associated with mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 767-772.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Laichalk, L.L., Thorley-Lawson, D.A., 2005. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *Journal of virology* 79, 1296-1307.

Laszlo, G.S., Cooper, J.A., 2009. Restriction of Src activity by Cullin-5. *Current biology : CB* 19, 157-162.

Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P., 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.

Le Cloennec, C., Ouk, T.S., Youlyouz-Marfak, I., Panteix, S., Martin, C.C., Rastelli, J., Adriaenssens, E., Zimber-Strobl, U., Coll, J., Feuillard, J., Jayat-Vignoles, C., 2008. Molecular basis of cytotoxicity of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP1) in EBV latency III B cells: LMP1 induces type II ligand-independent autoactivation of CD95/Fas with caspase 8-mediated apoptosis. *Journal of virology* 82, 6721-6733.

Le, S., Sternglanz, R., Greider, C.W., 2000. Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Molecular biology of the cell* 11, 999-1010.

- Lederberg, E.M., Cohen, S.N., 1974. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of bacteriology* 119, 1072-1074.
- Lee, H., Deng, J., Kujawski, M., Yang, C., Liu, Y., Herrmann, A., Kortylewski, M., Horne, D., Somlo, G., Forman, S., Jove, R., Yu, H., 2010. STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. *Nature medicine* 16, 1421-1428.
- Lee, J., Zhou, P., 2010. Cullins and cancer. *Genes & cancer* 1, 690-699.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23, 4051-4060.
- Lei, T., Yuen, K.S., Xu, R., Tsao, S.W., Chen, H., Li, M., Kok, K.H., Jin, D.Y., 2013. Targeting of DICE1 tumor suppressor by Epstein-Barr virus-encoded miR-BART3* microRNA in nasopharyngeal carcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 133, 79-87.
- Lenoir, G.M., Vuillaume, M., Bonnardel, C., 1985. The use of lymphomatous and lymphoblastoid cell lines in the study of Burkitt's lymphoma. IARC scientific publications, 309-318.
- Lerner, M.R., Andrews, N.C., Miller, G., Steitz, J.A., 1981. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 805-809.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.
- Li, B., Ren, S., Li, X., Wang, Y., Garfield, D., Zhou, S., Chen, X., Su, C., Chen, M., Kuang, P., Gao, G., He, Y., Fan, L., Fei, K., Zhou, C., Schmit-Bindert, G., 2014a. MiR-21 overexpression is associated with acquired resistance of EGFR-TKI in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 83, 146-153.
- Li, J., Li, X., Kong, X., Luo, Q., Zhang, J., Fang, L., 2014b. MiRNA-26b inhibits cellular proliferation by targeting CDK8 in breast cancer. *International journal of clinical and experimental medicine* 7, 558-565.
- Li, J., Song, Y., Wang, Y., Luo, J., Yu, W., 2013. MicroRNA-148a suppresses epithelial-to-mesenchymal transition by targeting ROCK1 in non-small cell lung cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry* 380, 277-282.
- Li, S., Chowdhury, R., Liu, F., Chou, A.P., Li, T., Mody, R.R., Lou, J.J., Chen, W., Reiss, J.K., Soto, H., Prins, R.M., Liau, L.M., Mischel, P.S., Nghiemphu, P.L., Yong, W.H., Cloughesy, T.F., Lai, A., 2014c. Tumor suppressive miR-148a is silenced by CpG island hypermethylation in IDH1 mutant gliomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*.
- Li, T., Hongyo, T., Syaifudin, M., Nomura, T., Dong, Z., Shingu, N., Kojya, S., Nakatsuka, S., Aozasa, K., 2000. Mutations of the p53 gene in nasal NK/T-cell lymphoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80, 493-499.

- Li, T., Li, R.S., Li, Y.H., Zhong, S., Chen, Y.Y., Zhang, C.M., Hu, M.M., Shen, Z.J., 2012. miR-21 as an independent biochemical recurrence predictor and potential therapeutic target for prostate cancer. *The Journal of urology* 187, 1466-1472.
- Lin, H., Spradling, A.C., 1997. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 124, 2463-2476.
- Lin, T.C., Liu, T.Y., Hsu, S.M., Lin, C.W., 2013. Epstein-Barr virus-encoded miR-BART20-5p inhibits T-bet translation with secondary suppression of p53 in invasive nasal NK/T-cell lymphoma. *The American journal of pathology* 182, 1865-1875.
- Lin, X., Guan, H., Li, H., Liu, L., Liu, J., Wei, G., Huang, Z., Liao, Z., Li, Y., 2014. miR-101 inhibits cell proliferation by targeting Rac1 in papillary thyroid carcinoma. *Biomedical reports* 2, 122-126.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., Sattler, M., 2004. Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nature structural & molecular biology* 11, 576-577.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., Hannon, G.J., 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.
- Liu, J., Li, W., Wang, S., Wu, Y., Li, Z., Wang, W., Liu, R., Ou, J., Zhang, C., 2014a. MiR-142-3p attenuates the migration of CD4(+) T cells through regulating actin cytoskeleton via RAC1 and ROCK2 in arteriosclerosis obliterans. *PloS one* 9, e95514.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., Parker, R., 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature cell biology* 7, 719-723.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M., 2012a. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, 251364.
- Liu, L., Zhang, H., Shi, L., Zhang, W., Yuan, J., Chen, X., Liu, J., Zhang, Y., Wang, Z., 2014b. Inhibition of Rac1 activity induces G1/S phase arrest through the GSK3/cyclin D1 pathway in human cancer cells. *Oncology reports* 32, 1395-1400.
- Liu, X., Chen, X., Yu, X., Tao, Y., Bode, A.M., Dong, Z., Cao, Y., 2013. Regulation of microRNAs by epigenetics and their interplay involved in cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 32, 96.
- Liu, Y., Deng, J., Wang, L., Lee, H., Armstrong, B., Scuto, A., Kowolik, C., Weiss, L.M., Forman, S., Yu, H., 2012b. S1PR1 is an effective target to block STAT3 signaling in activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 120, 1458-1465.
- Lo, A.K., To, K.F., Lo, K.W., Lung, R.W., Hui, J.W., Liao, G., Hayward, S.D., 2007. Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 16164-16169.
- Lu, J., He, M.L., Wang, L., Chen, Y., Liu, X., Dong, Q., Chen, Y.C., Peng, Y., Yao, K.T., Kung, H.F., Li, X.P., 2011. MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2. *Cancer research* 71, 225-233.
- Lung, R.W., Tong, J.H., Sung, Y.M., Leung, P.S., Ng, D.C., Chau, S.L., Chan, A.W., Ng, E.K., Lo, K.W., To, K.F., 2009. Modulation of LMP2A expression by a newly identified Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART22. *Neoplasia* 11, 1174-1184.

- Ma, C., Qi, Y., Shao, L., Liu, M., Li, X., Tang, H., 2013. Downregulation of miR-7 upregulates Cullin 5 (CUL5) to facilitate G1/S transition in human hepatocellular carcinoma cells. *IUBMB life* 65, 1026-1034.
- Ma, J.B., Ye, K., Patel, D.J., 2004. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429, 318-322.
- Ma, Z., Swede, H., Cassarino, D., Fleming, E., Fire, A., Dadras, S.S., 2011. Up-regulated Dicer expression in patients with cutaneous melanoma. *PloS one* 6, e20494.
- Mar-Aguilar, F., Luna-Aguirre, C.M., Moreno-Rocha, J.C., Araiza-Chavez, J., Trevino, V., Rodriguez-Padilla, C., Resendez-Perez, D., 2013. Differential expression of miR-21, miR-125b and miR-191 in breast cancer tissue. *Asia-Pacific journal of clinical oncology* 9, 53-59.
- Marcinkowska, M., Szymanski, M., Krzyzosiak, W.J., Kozlowski, P., 2011. Copy number variation of microRNA genes in the human genome. *BMC genomics* 12, 183.
- Marquitz, A.R., Mathur, A., Chugh, P.E., Dittmer, D.P., Raab-Traub, N., 2014. Expression profile of microRNAs in Epstein-Barr virus-infected AGS gastric carcinoma cells. *Journal of virology* 88, 1389-1393.
- Marquitz, A.R., Mathur, A., Nam, C.S., Raab-Traub, N., 2011. The Epstein-Barr Virus BART microRNAs target the pro-apoptotic protein Bim. *Virology* 412, 392-400.
- Martello, G., Rosato, A., Ferrari, F., Manfrin, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Enzo, E., Guzzardo, V., Rondina, M., Spruce, T., Parenti, A.R., Daidone, M.G., Bicciato, S., Piccolo, S., 2010. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell* 141, 1195-1207.
- Matesanz-Isabel, J., Sintes, J., Llinas, L., de Salort, J., Lazaro, A., Engel, P., 2011. New B-cell CD molecules. *Immunology letters* 134, 104-112.
- Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., Cyster, J.G., 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355-360.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., Zamore, P.D., 2005. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123, 607-620.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., Tuschl, T., 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular cell* 15, 185-197.
- Melisi, D., Niu, J., Chang, Z., Xia, Q., Peng, B., Ishiyama, S., Evans, D.B., Chiao, P.J., 2009. Secreted interleukin-1alpha induces a metastatic phenotype in pancreatic cancer by sustaining a constitutive activation of nuclear factor-kappaB. *Molecular cancer research : MCR* 7, 624-633.
- Meneses-Garcia, A., Betancourt, A.M., Abarca, J.H., Montes, A.B., Roa, L.S., Ruiz-Godoy, L., 2008. Expression of the metalloproteases MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-11, TIMP-1 and TIMP-2 in angiocentric midfacial lymphomas. *World journal of surgical oncology* 6, 114.

- Mestdagh, P., Hartmann, N., Baeriswyl, L., Andreasen, D., Bernard, N., Chen, C., Cheo, D., D'Andrade, P., DeMayo, M., Dennis, L., Derveaux, S., Feng, Y., Fulmer-Smentek, S., Gerstmayer, B., Gouffon, J., Grimley, C., Lader, E., Lee, K.Y., Luo, S., Mouritzen, P., Narayanan, A., Patel, S., Peiffer, S., Ruberg, S., Schroth, G., Schuster, D., Shaffer, J.M., Shelton, E.J., Silveria, S., Ulmanella, U., Veeramachaneni, V., Staedtler, F., Peters, T., Guettouche, T., Wong, L., Vandesompele, J., 2014. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nature methods* 11, 809-815.
- Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N.S., Kerr, I.M., Williams, B.R., Hovanessian, A.G., 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62, 379-390.
- Militi, S., Chiapparino, C., Testa, U., Carminati, P., De Santis, R., Serlupi-Crescenzi, O., 2005. Role of IL-6 and CD23 in the resistance to growth arrest and apoptosis in LCL41 B lymphoma cells. *Cytokine* 31, 314-323.
- Miller, G., Lipman, M., 1973. Comparison of the yield of infectious virus from clones of human and simian lymphoblastoid lines transformed by Epstein-Barr virus. *The Journal of experimental medicine* 138, 1398-1412.
- Mizugaki, Y., Sugawara, Y., Shinozaki, F., Takada, K., 1998. Detection of Epstein-Barr virus in oral papilloma. *Japanese journal of cancer research : Gann* 89, 604-607.
- Modzelewski, A.J., Holmes, R.J., Hilz, S., Grimson, A., Cohen, P.E., 2012. AGO4 regulates entry into meiosis and influences silencing of sex chromosomes in the male mouse germline. *Developmental cell* 23, 251-264.
- Moretti, F., Thermann, R., Hentze, M.W., 2010. Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. *RNA* 16, 2493-2502.
- Morscio, J., Dierickx, D., Tousseyn, T., 2013. Molecular pathogenesis of B-cell posttransplant lymphoproliferative disorder: what do we know so far? *Clinical & developmental immunology* 2013, 150835.
- Motsch, N., Alles, J., Imig, J., Zhu, J., Barth, S., Reineke, T., Tinguely, M., Cogliatti, S., Dueck, A., Meister, G., Renner, C., Grasser, F.A., 2012. MicroRNA profiling of Epstein-Barr virus-associated NK/T-cell lymphomas by deep sequencing. *PLoS one* 7, e42193.
- Moussian, B., Schoof, H., Haecker, A., Jurgens, G., Laux, T., 1998. Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during Arabidopsis embryogenesis. *The EMBO journal* 17, 1799-1809.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, 263-273.
- Nachmani, D., Stern-Ginossar, N., Sarid, R., Mandelboim, O., 2009. Diverse herpesvirus microRNAs target the stress-induced immune ligand MICB to escape recognition by natural killer cells. *Cell host & microbe* 5, 376-385.
- Nagata, H., Konno, A., Kimura, N., Zhang, Y., Kimura, M., Demachi, A., Sekine, T., Yamamoto, K., Shimizu, N., 2001. Characterization of novel natural killer (NK)-cell and gamma/delta T-cell lines established from primary lesions of nasal T/NK-cell lymphomas associated with the Epstein-Barr virus. *Blood* 97, 708-713.

- Nakano, T., Shimizu, K., Kawashima, O., Kamiyoshihara, M., Kakegawa, S., Sugano, M., Ibe, T., Nagashima, T., Kaira, K., Sunaga, N., Ohtaki, Y., Atsumi, J., Takeyoshi, I., 2012. Establishment of a human lung cancer cell line with high metastatic potential to multiple organs: gene expression associated with metastatic potential in human lung cancer. *Oncology reports* 28, 1727-1735.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R., 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant cell* 2, 279-289.
- Nassar, F.J., El Sabban, M., Zgheib, N.K., Tfayli, A., Boulos, F., Jabbour, M., Saghir, N.S., Talhouk, R., Bazarbachi, A., Calin, G.A., Nasr, R., 2014. miRNA as Potential Biomarkers of Breast Cancer in the Lebanese Population and in Young Women: A Pilot Study. *PloS one* 9, e107566.
- Nemerow, G.R., Mold, C., Schwend, V.K., Tollefson, V., Cooper, N.R., 1987. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *Journal of virology* 61, 1416-1420.
- Ng, S.B., Yan, J., Huang, G., Selvarajan, V., Tay, J.L., Lin, B., Bi, C., Tan, J., Kwong, Y.L., Shimizu, N., Aozasa, K., Chng, W.J., 2011. Dysregulated microRNAs affect pathways and targets of biologic relevance in nasal-type natural killer/T-cell lymphoma. *Blood* 118, 4919-4929.
- Nikolaos, N., Grigorios, P., Konstantinos, K., Savvas, T., Vassiliki, Z., Alexandra, S., Theodoros, P., 2012. Extranodal nasal-type NK/T-cell lymphoma of the palate and paranasal sinuses. *The American journal of case reports* 13, 79-85.
- Nishimura, H., Akiyama, T., Monobe, Y., Matsubara, K., Igarashi, Y., Abe, M., Sugihara, T., Sadahira, Y., 2010. Expression of sphingosine-1-phosphate receptor 1 in mantle cell lymphoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 23, 439-449.
- Nouraei, N., Van Roosbroeck, K., Vasei, M., Semnani, S., Samaei, N.M., Naghshvar, F., Omid, A.A., Calin, G.A., Mowla, S.J., 2013. Expression, tissue distribution and function of miR-21 in esophageal squamous cell carcinoma. *PloS one* 8, e73009.
- Nucifora, G., Begy, C.R., Erickson, P., Drabkin, H.A., Rowley, J.D., 1993. The 3;21 translocation in myelodysplasia results in a fusion transcript between the AML1 gene and the gene for EAP, a highly conserved protein associated with the Epstein-Barr virus small RNA EBER 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7784-7788.
- O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., Mendell, J.T., 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839-843.
- Olive, V., Jiang, I., He, L., 2010. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42, 1348-1354.
- Osawa, S., Shimada, Y., Sekine, S., Okumura, T., Nagata, T., Fukuoka, J., Tsukada, K., 2011. MicroRNA profiling of gastric cancer patients from formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Oncology letters* 2, 613-619.
- Oshimi, K., 2007. Progress in understanding and managing natural killer-cell malignancies. *British journal of haematology* 139, 532-544.

- Ouellet, D.L., Vigneault-Edwards, J., Letourneau, K., Gobeil, L.A., Plante, I., Burnett, J.C., Rossi, J.J., Provost, P., 2013. Regulation of host gene expression by HIV-1 TAR microRNAs. *Retrovirology* 10, 86.
- Ozsolak, F., Poling, L.L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X.S., Roeder, R.G., Zhang, X., Song, J.S., Fisher, D.E., 2008. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & development* 22, 3172-3183.
- Pall, G.S., Hamilton, A.J., 2008. Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nature protocols* 3, 1077-1084.
- Pappu, R., Schwab, S.R., Cornelissen, I., Pereira, J.P., Regard, J.B., Xu, Y., Camerer, E., Zheng, Y.W., Huang, Y., Cyster, J.G., Coughlin, S.R., 2007. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 316, 295-298.
- Parisi, C., Giorgi, C., Batassa, E.M., Braccini, L., Maresca, G., D'Agnano, I., Caputo, V., Salvatore, A., Pietrolati, F., Cogoni, C., Catalanotto, C., 2011. Ago1 and Ago2 differentially affect cell proliferation, motility and apoptosis when overexpressed in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *FEBS letters* 585, 2965-2971.
- Pedersen, I.M., Otero, D., Kao, E., Miletic, A.V., Hother, C., Ralfkiaer, E., Rickert, R.C., Gronbaek, K., David, M., 2009. Onco-miR-155 targets SHIP1 to promote TNFalpha-dependent growth of B cell lymphomas. *EMBO molecular medicine* 1, 288-295.
- Pena-Chilet, M., Martinez, M.T., Perez-Fidalgo, J.A., Peiro-Chova, L., Oltra, S.S., Tormo, E., Alonso-Yuste, E., Martinez-Delgado, B., Eroles, P., Climent, J., Burgues, O., Ferrer-Lozano, J., Bosch, A., Lluch, A., Ribas, G., 2014. MicroRNA profile in very young women with breast cancer. *BMC cancer* 14, 529.
- Peter, M.E., 2009. Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluripotency and cancer progression. *Cell Cycle* 8, 843-852.
- Petroski, M.D., Deshaies, R.J., 2005. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 9-20.
- Pickart, C.M., 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry* 70, 503-533.
- Poirier, S., Ohshima, H., de-The, G., Hubert, A., Bourgade, M.C., Bartsch, H., 1987. Volatile nitrosamine levels in common foods from Tunisia, south China and Greenland, high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma (NPC). *International journal of cancer. Journal international du cancer* 39, 293-296.
- Polikepahad, S., Corry, D.B., 2013. Profiling of T helper cell-derived small RNAs reveals unique antisense transcripts and differential association of miRNAs with argonaute proteins 1 and 2. *Nucleic acids research* 41, 1164-1177.
- Pulvertaft, J.V., 1965. A Study of Malignant Tumours in Nigeria by Short-Term Tissue Culture. *Journal of clinical pathology* 18, 261-273.
- Qiu, J., Thorley-Lawson, D.A., 2014. EBV microRNA BART 18-5p targets MAP3K2 to facilitate persistence in vivo by inhibiting viral replication in B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 11157-11162.

- Rahadiani, N., Takakuwa, T., Tresnasari, K., Morii, E., Aozasa, K., 2008. Latent membrane protein-1 of Epstein-Barr virus induces the expression of B-cell integration cluster, a precursor form of microRNA-155, in B lymphoma cell lines. *Biochemical and biophysical research communications* 377, 579-583.
- Rakheja, D., Chen, K.S., Liu, Y., Shukla, A.A., Schmid, V., Chang, T.C., Khokhar, S., Wickiser, J.E., Karandikar, N.J., Malter, J.S., Mendell, J.T., Amatruda, J.F., 2014. Somatic mutations in DROSHA and DICER1 impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours. *Nature communications* 2, 4802.
- Ramakrishnan, R., Donahue, H., Garcia, D., Tan, J., Shimizu, N., Rice, A.P., Ling, P.D., 2011. Epstein-Barr virus BART9 miRNA modulates LMP1 levels and affects growth rate of nasal NK T cell lymphomas. *PLoS one* 6, e27271.
- Rickinson, A.B., Young, L.S., Rowe, M., 1987. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *Journal of virology* 61, 1310-1317.
- Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L., 2005. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nature structural & molecular biology* 12, 340-349.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., Bradley, A., 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research* 14, 1902-1910.
- Rosa, M.D., Gottlieb, E., Lerner, M.R., Steitz, J.A., 1981. Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Molecular and cellular biology* 1, 785-796.
- Rosato, P., Anastasiadou, E., Garg, N., Lenze, D., Boccellato, F., Vincenti, S., Severa, M., Coccia, E.M., Bigi, R., Cirone, M., Ferretti, E., Campese, A.F., Hummel, M., Frati, L., Presutti, C., Faggioni, A., Trivedi, P., 2012. Differential regulation of miR-21 and miR-146a by Epstein-Barr virus-encoded EBNA2. *Leukemia* 26, 2343-2352.
- Rosen, H., Goetzl, E.J., 2005. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nature reviews. Immunology* 5, 560-570.
- Ruvkun, G., 2001. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294, 797-799.
- Rymo, L., 1979. Identification of transcribed regions of Epstein-Barr virus DNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *Journal of virology* 32, 8-18.
- Sakamoto, N., Naito, Y., Oue, N., Sentani, K., Uraoka, N., Zarni Oo, H., Yanagihara, K., Aoyagi, K., Sasaki, H., Yasui, W., 2014. MicroRNA-148a is downregulated in gastric cancer, targets MMP7, and indicates tumor invasiveness and poor prognosis. *Cancer science* 105, 236-243.
- Samanta, M., Iwakiri, D., Kanda, T., Imaizumi, T., Takada, K., 2006. EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *The EMBO journal* 25, 4207-4214.
- Samanta, M., Iwakiri, D., Takada, K., 2008. Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene* 27, 4150-4160.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning A laboratory manual* : Vol. 2, 2. ed ed. Cold Spring Harbor, [S.I.].

- Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E., Rickinson, A., 1990. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *Journal of virology* 64, 4084-4092.
- Sato, Y., Kamura, T., Shirata, N., Murata, T., Kudoh, A., Iwahori, S., Nakayama, S., Isomura, H., Nishiyama, Y., Tsurumi, T., 2009. Degradation of phosphorylated p53 by viral protein-ECS E3 ligase complex. *PLoS pathogens* 5, e1000530.
- Schaefer, B.C., Strominger, J.L., Speck, S.H., 1995. Redefining the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-1 gene promoter and transcription initiation site in group I Burkitt lymphoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10565-10569.
- Schwab, S.R., Cyster, J.G., 2007. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature immunology* 8, 1295-1301.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P.D., 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
- Sen, C.K., Gordillo, G.M., Khanna, S., Roy, S., 2009. Micromanaging vascular biology: tiny microRNAs play big band. *Journal of vascular research* 46, 527-540.
- Seto, E., Moosmann, A., Gromminger, S., Walz, N., Grundhoff, A., Hammerschmidt, W., 2010. Micro RNAs of Epstein-Barr virus promote cell cycle progression and prevent apoptosis of primary human B cells. *PLoS pathogens* 6, e1001063.
- Sgaramella, V., Van de Sande, J.H., Khorana, H.G., 1970. Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 67, 1468-1475.
- Shah, D.K., Zuniga-Pflucker, J.C., 2014. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol* 192, 4017-4023.
- Shao, C., Dong, A.W., Ma, X., Meng, Y., 2014. Is Argonaute 1 the only effective slicer of small RNA-mediated regulation of gene expression in plants? *Journal of experimental botany*.
- Sharp, T.V., Schwemmler, M., Jeffrey, I., Laing, K., Mellor, H., Proud, C.G., Hilse, K., Clemens, M.J., 1993. Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBNA-1 and EBNA-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic acids research* 21, 4483-4490.
- Shein, H.M., Enders, J.F., Levinthal, J.D., 1962. Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. II. Cell-virus relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48, 1350-1357.
- Shen, L., Liang, A.C., Lu, L., Au, W.Y., Kwong, Y.L., Liang, R.H., Srivastava, G., 2002. Frequent deletion of Fas gene sequences encoding death and transmembrane domains in nasal natural killer/T-cell lymphoma. *The American journal of pathology* 161, 2123-2131.
- Shimizu, N., Tanabe-Tochikura, A., Kuroiwa, Y., Takada, K., 1994. Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV. *Journal of virology* 68, 6069-6073.
- Shin, C., 2008. Cleavage of the star strand facilitates assembly of some microRNAs into Ago2-containing silencing complexes in mammals. *Molecules and cells* 26, 308-313.

- Sicard, F., Gayral, M., Lulka, H., Buscail, L., Cordelier, P., 2013. Targeting miR-21 for the therapy of pancreatic cancer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 21, 986-994.
- Sims, J.E., Smith, D.E., 2010. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature reviews. Immunology* 10, 89-102.
- Smith, P.R., Griffin, B.E., 1992. Transcription of the Epstein-Barr virus gene EBNA-1 from different promoters in nasopharyngeal carcinoma and B-lymphoblastoid cells. *Journal of virology* 66, 706-714.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L., 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434-1437.
- Sun, Q., Zhao, X., Liu, X., Wang, Y., Huang, J., Jiang, B., Chen, Q., Yu, J., 2014. miR-146a functions as a tumor suppressor in prostate cancer by targeting Rac1. *The Prostate* 74, 1613-1621.
- Suzuki, H., Maruyama, R., Yamamoto, E., Kai, M., 2012. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Molecular oncology* 6, 567-578.
- Suzumiya, J., Takeshita, M., Kimura, N., Kikuchi, M., Uchida, T., Hisano, S., Eura, Y., Kozuru, M., Nomura, Y., Tomita, K., et al., 1994. Expression of adult and fetal natural killer cell markers in sinonasal lymphomas. *Blood* 83, 2255-2260.
- Swaminathan, S., Tomkinson, B., Kieff, E., 1991. Recombinant Epstein-Barr virus with small RNA (EBER) genes deleted transforms lymphocytes and replicates in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 1546-1550.
- Tahbaz, N., Kolb, F.A., Zhang, H., Jaronczyk, K., Filipowicz, W., Hobman, T.C., 2004. Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO reports* 5, 189-194.
- Takuwa, Y., Takuwa, N., Sugimoto, N., 2002. The Edg family G protein-coupled receptors for lysophospholipids: their signaling properties and biological activities. *Journal of biochemistry* 131, 767-771.
- Tam, O.H., Aravin, A.A., Stein, P., Girard, A., Murchison, E.P., Cheloufi, S., Hodges, E., Anger, M., Sachidanandam, R., Schultz, R.M., Hannon, G.J., 2008. Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453, 534-538.
- Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., Kieff, E., 1987. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 50, 203-213.
- Teplova, M., Yuan, Y.R., Phan, A.T., Malinina, L., Ilin, S., Teplov, A., Patel, D.J., 2006. Structural basis for recognition and sequestration of UUU(OH) 3' termini of nascent RNA polymerase III transcripts by La, a rheumatic disease autoantigen. *Molecular cell* 21, 75-85.
- Teramoto, N., Szekely, L., Klein, G., 1998. Differential expression and localization of EBNA-1 and EBNA-2 in Epstein-Barr virus-carrying cells. *Journal of human virology* 1, 307-313.
- Thompson, M.P., Kurzrock, R., 2004. Epstein-Barr virus and cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 803-821.

- Thorley-Lawson, D.A., 2005. EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *The Journal of allergy and clinical immunology* 116, 251-261; quiz 262.
- Tian, G., Yin, X., Luo, H., Xu, X., Bolund, L., Zhang, X., Gan, S.Q., Li, N., 2010. Sequencing bias: comparison of different protocols of microRNA library construction. *BMC biotechnology* 10, 64.
- Toczyski, D.P., Matera, A.G., Ward, D.C., Steitz, J.A., 1994. The Epstein-Barr virus (EBV) small RNA EBER1 binds and relocalizes ribosomal protein L22 in EBV-infected human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 3463-3467.
- Toczyski, D.P., Steitz, J.A., 1991. EAP, a highly conserved cellular protein associated with Epstein-Barr virus small RNAs (EBERs). *The EMBO journal* 10, 459-466.
- Toczyski, D.P., Steitz, J.A., 1993. The cellular RNA-binding protein EAP recognizes a conserved stem-loop in the Epstein-Barr virus small RNA EBER 1. *Molecular and cellular biology* 13, 703-710.
- Tosato, G., Tanner, J., Jones, K.D., Revel, M., Pike, S.E., 1990. Identification of interleukin-6 as an autocrine growth factor for Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Journal of virology* 64, 3033-3041.
- Tsoukas, C.D., Lambris, J.D., 1993. Expression of EBV/C3d receptors on T cells: biological significance. *Immunology today* 14, 56-59.
- Turchinovich, A., Burwinkel, B., 2012. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA biology* 9, 1066-1075.
- van Rietschoten, J.G., Verzijlbergen, K.F., Gringhuis, S.I., van der Pouw Kraan, T.C., Bayley, J.P., Wierenga, E.A., Jones, P.A., Kooter, J.M., Verweij, C.L., 2006. Differentially methylated alleles in a distinct region of the human interleukin-1alpha promoter are associated with allele-specific expression of IL-1alpha in CD4+ T cells. *Blood* 108, 2143-2149.
- van Rooij, E., Olson, E.N., 2012. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. *Nature reviews. Drug discovery* 11, 860-872.
- Vasudevan, S., Tong, Y., Steitz, J.A., 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931-1934.
- Velaithan, R., Kang, J., Hirpara, J.L., Loh, T., Goh, B.C., Le Bras, M., Brenner, C., Clement, M.V., Pervaiz, S., 2011. The small GTPase Rac1 is a novel binding partner of Bcl-2 and stabilizes its antiapoptotic activity. *Blood* 117, 6214-6226.
- Vereide, D.T., Seto, E., Chiu, Y.F., Hayes, M., Tagawa, T., Grundhoff, A., Hammerschmidt, W., Sugden, B., 2014. Epstein-Barr virus maintains lymphomas via its miRNAs. *Oncogene* 33, 1258-1264.
- Vuyisich, M., Spanggord, R.J., Beal, P.A., 2002. The binding site of the RNA-dependent protein kinase (PKR) on EBER1 RNA from Epstein-Barr virus. *EMBO reports* 3, 622-627.
- Wang, M., Tan, L.P., Dijkstra, M.K., van Lom, K., Robertus, J.L., Harms, G., Blokzijl, T., Kooistra, K., van T'Veer M, B., Rosati, S., Visser, L., Jongen-Lavrencic, M., Kluin, P.M., van den Berg, A., 2008. miRNA analysis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: proliferation centres characterized by low miR-150 and high BIC/miR-155 expression. *The Journal of pathology* 215, 13-20.

- Wang, M., Yang, W., Li, M., Li, Y., 2014. Low expression of miR-150 in pediatric intestinal Burkitt lymphoma. *Experimental and molecular pathology* 96, 261-266.
- Watanabe, A., Tagawa, H., Yamashita, J., Teshima, K., Nara, M., Iwamoto, K., Kume, M., Kameoka, Y., Takahashi, N., Nakagawa, T., Shimizu, N., Sawada, K., 2011. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia* 25, 1324-1334.
- Weiss, L.M., Chen, Y.Y., 2013. EBER in situ hybridization for Epstein-Barr virus. *Methods Mol Biol* 999, 223-230.
- Wen, S., Mizugaki, Y., Shinozaki, F., Takada, K., 1997. Epstein-Barr virus (EBV) infection in salivary gland tumors: lytic EBV infection in nonmalignant epithelial cells surrounded by EBV-positive T-lymphoma cells. *Virology* 227, 484-487.
- Wen, S., Shimizu, N., Yoshiyama, H., Mizugaki, Y., Shinozaki, F., Takada, K., 1996. Association of Epstein-Barr virus (EBV) with Sjogren's syndrome: differential EBV expression between epithelial cells and lymphocytes in salivary glands. *The American journal of pathology* 149, 1511-1517.
- White, E., Schlackow, M., Kamieniarz-Gdula, K., Proudfoot, N.J., Gullerova, M., 2014. Human nuclear Dicer restricts the deleterious accumulation of endogenous double-stranded RNA. *Nature structural & molecular biology* 21, 552-559.
- Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.
- Winter, J., Diederichs, S., 2013. Argonaute-3 activates the *let-7a* passenger strand microRNA. *RNA biology* 10, 1631-1643.
- Wittmann, B.M., Wang, N., Montano, M.M., 2003. Identification of a novel inhibitor of breast cell growth that is down-regulated by estrogens and decreased in breast tumors. *Cancer research* 63, 5151-5158.
- Wong, A.M., Kong, K.L., Tsang, J.W., Kwong, D.L., Guan, X.Y., 2012. Profiling of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs in nasopharyngeal carcinoma reveals potential biomarkers and oncomirs. *Cancer* 118, 698-710.
- Wu, L., Cai, C., Wang, X., Liu, M., Li, X., Tang, H., 2011. MicroRNA-142-3p, a new regulator of RAC1, suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *FEBS letters* 585, 1322-1330.
- Wu, T.C., Ling, Y., Kanayama, M.D., Huang, A.Y., Kurman, R.J., 1995. Localization of Epstein-Barr Virus-Encoded Small RNA-1 by in situ Reverse Transcription: Demonstration of cDNA Generation in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Sections. *Journal of biomedical science* 2, 249-255.
- Xu, X., Fan, Z., Kang, L., Han, J., Jiang, C., Zheng, X., Zhu, Z., Jiao, H., Lin, J., Jiang, K., Ding, L., Zhang, H., Cheng, L., Fu, H., Song, Y., Jiang, Y., Liu, J., Wang, R., Du, N., Ye, Q., 2013. Hepatitis B virus X protein represses miRNA-148a to enhance tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation* 123, 630-645.
- Xu, X.M., Wang, X.B., Chen, M.M., Liu, T., Li, Y.X., Jia, W.H., Liu, M., Li, X., Tang, H., 2012. MicroRNA-19a and -19b regulate cervical carcinoma cell proliferation and invasion by targeting CUL5. *Cancer letters* 322, 148-158.

- Yajima, M., Kanda, T., Takada, K., 2005. Critical role of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded RNA in efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation. *Journal of virology* 79, 4298-4307.
- Yamakawa, N., Okuyama, K., Ogata, J., Kanai, A., Helwak, A., Takamatsu, M., Imadome, K., Takakura, K., Chanda, B., Kurosaki, N., Yamamoto, H., Ando, K., Matsui, H., Inaba, T., Kotani, A., 2014. Novel functional small RNAs are selectively loaded onto mammalian Ago1. *Nucleic acids research* 42, 5289-5301.
- Yamamoto, N., Takizawa, T., Iwanaga, Y., Shimizu, N., 2000. Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS letters* 484, 153-158.
- Yamanaka, Y., Tagawa, H., Takahashi, N., Watanabe, A., Guo, Y.M., Iwamoto, K., Yamashita, J., Saitoh, H., Kameoka, Y., Shimizu, N., Ichinohasama, R., Sawada, K., 2009. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood* 114, 3265-3275.
- Yang, G.D., Huang, T.J., Peng, L.X., Yang, C.F., Liu, R.Y., Huang, H.B., Chu, Q.Q., Yang, H.J., Huang, J.L., Zhu, Z.Y., Qian, C.N., Huang, B.J., 2013a. Epstein-Barr Virus_Encoded LMP1 upregulates microRNA-21 to promote the resistance of nasopharyngeal carcinoma cells to cisplatin-induced Apoptosis by suppressing PDCD4 and Fas-L. *PloS one* 8, e78355.
- Yang, H.J., Huang, T.J., Yang, C.F., Peng, L.X., Liu, R.Y., Yang, G.D., Chu, Q.Q., Huang, J.L., Liu, N., Huang, H.B., Zhu, Z.Y., Qian, C.N., Huang, B.J., 2013b. Comprehensive profiling of Epstein-Barr virus-encoded miRNA species associated with specific latency types in tumor cells. *Virology journal* 10, 314.
- Yang, L., Aozasa, K., Oshimi, K., Takada, K., 2004. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA promotes growth of EBV-infected T cells through interleukin-9 induction. *Cancer research* 64, 5332-5337.
- Yao, Q.Y., Tierney, R.J., Croom-Carter, D., Cooper, G.M., Ellis, C.J., Rowe, M., Rickinson, A.B., 1996. Isolation of intertypic recombinants of Epstein-Barr virus from T-cell-immunocompromised individuals. *Journal of virology* 70, 4895-4903.
- Yates, J.L., Warren, N., Sugden, B., 1985. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313, 812-815.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* 17, 3011-3016.
- Yoshida, Y., Nakada, M., Harada, T., Tanaka, S., Furuta, T., Hayashi, Y., Kita, D., Uchiyama, N., Hamada, J., 2010. The expression level of sphingosine-1-phosphate receptor type 1 is related to MIB-1 labeling index and predicts survival of glioblastoma patients. *Journal of neuro-oncology* 98, 41-47.
- Young, L.S., Rickinson, A.B., 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature reviews. Cancer* 4, 757-768.
- Yu, J., Li, Q., Xu, Q., Liu, L., Jiang, B., 2011. MiR-148a inhibits angiogenesis by targeting ERBB3. *Journal of biomedical research* 25, 170-177.
- Yu, X., Wu, Y., Liu, Y., Deng, H., Shen, Z., Xiao, B., Guo, J., 2014. miR-21, miR-106b and miR-375 as Novel Potential Biomarkers for Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Current pharmaceutical biotechnology* 15, 503-508.

- Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., Yu, X.F., 2003. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302, 1056-1060.
- Zeng, Y., Cullen, B.R., 2003. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA* 9, 112-123.
- Zeng, Z., Huang, H., Huang, L., Sun, M., Yan, Q., Song, Y., Wei, F., Bo, H., Gong, Z., Zeng, Y., Li, Q., Zhang, W., Li, X., Xiang, B., Li, Y., Xiong, W., Li, G., 2014. Regulation network and expression profiles of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs and their potential target host genes in nasopharyngeal carcinomas. *Science China. Life sciences* 57, 315-326.
- Zhang, G.J., Xiao, H.X., Tian, H.P., Liu, Z.L., Xia, S.S., Zhou, T., 2013a. Upregulation of microRNA-155 promotes the migration and invasion of colorectal cancer cells through the regulation of claudin-1 expression. *International journal of molecular medicine* 31, 1375-1380.
- Zhang, H., Chen, Y., 2009. New insight into the role of miRNAs in leukemia. *Science in China. Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences* 52, 224-231.
- Zhang, R., Li, M., Zang, W., Chen, X., Wang, Y., Li, P., Du, Y., Zhao, G., Li, L., 2014a. MiR-148a regulates the growth and apoptosis in pancreatic cancer by targeting CCKBR and Bcl-2. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35, 837-844.
- Zhang, X., Li, M., Zuo, K., Li, D., Ye, M., Ding, L., Cai, H., Fu, D., Fan, Y., Lv, Z., 2013b. Upregulated miR-155 in papillary thyroid carcinoma promotes tumor growth by targeting APC and activating Wnt/beta-catenin signaling. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98, E1305-1313.
- Zhang, Y., Nagata, H., Ikeuchi, T., Mukai, H., Oyoshi, M.K., Demachi, A., Morio, T., Wakiguchi, H., Kimura, N., Shimizu, N., Yamamoto, K., 2003. Common cytological and cytogenetic features of Epstein-Barr virus (EBV)-positive natural killer (NK) cells and cell lines derived from patients with nasal T/NK-cell lymphomas, chronic active EBV infection and hydroa vacciniforme-like eruptions. *British journal of haematology* 121, 805-814.
- Zhang, Y., Wei, W., Cheng, N., Wang, K., Li, B., Jiang, X., Sun, S., 2012. Hepatitis C virus-induced up-regulation of microRNA-155 promotes hepatocarcinogenesis by activating Wnt signaling. *Hepatology* 56, 1631-1640.
- Zhang, Z., Zheng, W., Hai, J., 2014b. MicroRNA-148b expression is decreased in hepatocellular carcinoma and associated with prognosis. *Med Oncol* 31, 984.
- Zhao, H., Dong, T., Zhou, H., Wang, L., Huang, A., Feng, B., Quan, Y., Jin, R., Zhang, W., Sun, J., Zhang, D., Zheng, M., 2014. miR-320a suppresses colorectal cancer progression by targeting Rac1. *Carcinogenesis* 35, 886-895.
- Zhou, H., Rigoutsos, I., 2014. MiR-103a-3p targets the 5' UTR of GPRC5A in pancreatic cells. *RNA* 20, 1431-1439.
- Zhou, H.C., Fang, J.H., Luo, X., Zhang, L., Yang, J., Zhang, C., Zhuang, S.M., 2014. Downregulation of microRNA-100 enhances the ICMT-Rac1 signaling and promotes metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*.
- Zhou, J., Ng, S.B., Chng, W.J., 2013. LIN28/LIN28B: an emerging oncogenic driver in cancer stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 973-978.

Zhu, J.Y., Pfuhl, T., Motsch, N., Barth, S., Nicholls, J., Grasser, F., Meister, G., 2009. Identification of novel Epstein-Barr virus microRNA genes from nasopharyngeal carcinomas. *Journal of virology* 83, 3333-3341.

Zhu, X., Wang, Y., Sun, Y., Zheng, J., Zhu, D., 2014. MiR-155 up-regulation by LMP1 DNA contributes to increased nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and migration. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 271, 1939-1945.

Zhu, Y., Lu, Y., Zhang, Q., Liu, J.J., Li, T.J., Yang, J.R., Zeng, C., Zhuang, S.M., 2012. MicroRNA-26a/b and their host genes cooperate to inhibit the G1/S transition by activating the pRb protein. *Nucleic acids research* 40, 4615-4625.

Zimber, U., Adldinger, H.K., Lenoir, G.M., Vuillaume, M., Knebel-Doeberitz, M.V., Laux, G., Desgranges, C., Wittmann, P., Freese, U.K., Schneider, U., et al., 1986. Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology* 154, 56-66.

Ziyan, W., Shuhua, Y., Xiufang, W., Xiaoyun, L., 2011. MicroRNA-21 is involved in osteosarcoma cell invasion and migration. *Med Oncol* 28, 1469-1474.

Zur Hausen, H., 1967. Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *Journal of virology* 1, 1174-1185.

9 Anhang

9.1 Anhang 1: Gesamtübersicht der Illumina-Hochdurchsatz-Sequenzierung

9.1.1 Sequenzdaten aller humanen miRNAs

Tabelle 30: Rohdaten der Illumina-Hochdurchsatzsequenzierung für humane miRNAs

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads:	5.393.355	Valide Gesamt-reads:	2.327.119	Valide Gesamt-reads:	5.674.444
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-let-7a-3p	510	0,09	293	0,13	526	0,09
hsa-let-7a-5p	27.725	5,14	12.168	5,23	12.625	2,22
hsa-let-7a-5p, hsa-let-7a-3p					1	0,00
hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p	1.299	0,24	1.312	0,56	309	0,05
hsa-let-7a-5p, hsa-let-7f-5p	8	0,00			1	0,00
hsa-let-7a-5p, hsa-let-7g-5p	3	0,00				
hsa-let-7a-5p, hsa-miR-150-5p	3	0,00				
hsa-let-7a-5p, hsa-miR-19a-3p					1	0,00
hsa-let-7a-5p, hsa-miR-30c-5p	2	0,00				
hsa-let-7a-5p, hsa-miR-92a-3p					1	0,00
hsa-let-7b-3p	14	0,00	2	0,00	1	0,00
hsa-let-7b-5p	2.213	0,41	673	0,29	214	0,04
hsa-let-7b-5p, hsa-let-7f-5p	1	0,00				
hsa-let-7b-5p, hsa-let-7g-5p	1	0,00				
hsa-let-7c-3p	1	0,00				
hsa-let-7c-5p	116	0,02	19	0,01	90	0,02
hsa-let-7d-3p	443	0,08	232	0,10	192	0,03
hsa-let-7d-5p	2.716	0,50	4.497	1,93	3.318	0,58
hsa-let-7d-5p, hsa-miR-21-5p					1	0,00
hsa-let-7e-3p	2	0,00			1	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-let-7e-5p	164	0,03	4	0,00	7	0,00
hsa-let-7f-1-3p	12	0,00	7	0,00	18	0,00
hsa-let-7f-2-3p	27	0,01	14	0,01	31	0,01
hsa-let-7f-5p	57.412	10,64	39.363	16,91	56.967	10,04
hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p	11	0,00			1	0,00
hsa-let-7f-5p, hsa-miR-146b-5p					2	0,00
hsa-let-7f-5p, hsa-miR-150-5p	1	0,00				
hsa-let-7f-5p, hsa-miR-155-5p					3	0,00
hsa-let-7f-5p, hsa-miR-21-5p					3	0,00
hsa-let-7f-5p, hsa-miR-26a-5p	1	0,00				
hsa-let-7f-5p, hsa-miR-34a-5p					1	0,00
hsa-let-7f-5p, hsa-miR-4284					1	0,00
hsa-let-7f-5p, hsa-miR-532-5p					1	0,00
hsa-let-7f-5p, hsa-miR-92a-3p					1	0,00
hsa-let-7g-3p	11	0,00			5	0,00
hsa-let-7g-5p	119.180	22,10	16.491	7,09	19.252	3,39
hsa-let-7g-5p, hsa-miR-361-5p	1	0,00				
hsa-let-7g-5p, hsa-miR-454-3p	1	0,00				
hsa-let-7i-3p	79	0,01	29	0,01	48	0,01
hsa-let-7i-5p	41.008	7,60	24.490	10,52	31.423	5,54
hsa-let-7i-5p, hsa-miR-155-5p					2	0,00
hsa-let-7i-5p, hsa-miR-30e-3p					1	0,00
hsa-let-7i-5p, hsa-miR-342-3p	1	0,00				
hsa-miR-1	6	0,00	6	0,00	4	0,00
hsa-miR-100-5p	213	0,04	3	0,00	3	0,00
hsa-miR-101-3p	20.281	3,76	1.755	0,75	3.862	0,68
hsa-miR-101-3p, hsa-miR-27b-3p					1	0,00
hsa-miR-101-5p	2	0,00				
hsa-miR-103a-2-5p	8	0,00	2	0,00	2	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-103a-3p	4.850	0,90	2.631	1,13	6.700	1,18
hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-107	209	0,04	176	0,08	269	0,05
hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-146b-5p	1	0,00				
hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-150-5p	3	0,00				
hsa-miR-106a-5p	21	0,00	1	0,00	6	0,00
hsa-miR-106b-3p	373	0,07	416	0,18	423	0,07
hsa-miR-106b-5p	210	0,04	240	0,10	345	0,06
hsa-miR-107	34	0,01	34	0,01	125	0,02
hsa-miR-10a-3p	7	0,00				
hsa-miR-10a-5p	1.614	0,30	75	0,03	302	0,05
hsa-miR-10b-5p	5	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-1179	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-1180-3p	4	0,00	23	0,01	75	0,01
hsa-miR-122-5p			1	0,00		
hsa-miR-1225-3p	2	0,00			2	0,00
hsa-miR-1226-3p	9	0,00	3	0,00	14	0,00
hsa-miR-1227-3p	5	0,00	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-1229-3p	1	0,00	1	0,00		
hsa-miR-1233-3p	1	0,00				
hsa-miR-1234-3p	2	0,00				
hsa-miR-1236-3p					1	0,00
hsa-miR-1237-3p	1	0,00				
hsa-miR-124-5p	2	0,00				
hsa-miR-1243					1	0,00
hsa-miR-1245b-3p			1	0,00	1	0,00
hsa-miR-1246	245	0,05	824	0,35	1.528	0,27
hsa-miR-1248	436	0,08	37	0,02	116	0,02
hsa-miR-1249	7	0,00	1	0,00		
hsa-miR-1252-5p					2	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-1254	2	0,00	25	0,01	6	0,00
hsa-miR-1255a	11	0,00	4	0,00	2	0,00
hsa-miR-1255b-5p					1	0,00
hsa-miR-1257			2	0,00		
hsa-miR-125a-3p	5	0,00				
hsa-miR-125a-5p	4.403	0,82			4	0,00
hsa-miR-125b-2-3p					1	0,00
hsa-miR-125b-5p	62	0,01	3	0,00	28	0,00
hsa-miR-126-3p	611	0,11			37	0,01
hsa-miR-126-5p	66	0,01			6	0,00
hsa-miR-1260b	148	0,03	7	0,00	9	0,00
hsa-miR-1268a, hsa-miR-1268b	12	0,00	14	0,01	11	0,00
hsa-miR-127-3p	40	0,01				
hsa-miR-1270	1	0,00				
hsa-miR-1271-3p					1	0,00
hsa-miR-1271-5p	44	0,01	1	0,00	15	0,00
hsa-miR-1273a					1	0,00
hsa-miR-1273c	5	0,00	1	0,00		
hsa-miR-1273f	2	0,00				
hsa-miR-1273g-3p					3	0,00
hsa-miR-1273h-3p	48	0,01	3	0,00	32	0,01
hsa-miR-1273h-5p	27	0,01	3	0,00	9	0,00
hsa-miR-1275	136	0,03	3	0,00	1	0,00
hsa-miR-1275, hsa-miR-6724-5p	2	0,00				
hsa-miR-1276	4	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-1277-3p	7	0,00			5	0,00
hsa-miR-1277-5p	6	0,00	1	0,00	7	0,00
hsa-miR-1278	34	0,01	5	0,00	33	0,01
hsa-miR-128-1-5p	3	0,00	1	0,00	2	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-128-3p	4.285	0,79	1.799	0,77	1.755	0,31
hsa-miR-1284	10	0,00	1	0,00		
hsa-miR-1285-3p	21	0,00	14	0,01	13	0,00
hsa-miR-1285-5p	4	0,00			1	0,00
hsa-miR-1287-5p	40	0,01			2	0,00
hsa-miR-129-5p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-1290			1	0,00		
hsa-miR-1291	67	0,01	66	0,03	637	0,11
hsa-miR-1292-5p	6	0,00	8	0,00	9	0,00
hsa-miR-1293			1	0,00	1	0,00
hsa-miR-1294	6	0,00	4	0,00	3	0,00
hsa-miR-1295a	3	0,00				
hsa-miR-1296-5p	3	0,00	5	0,00	4	0,00
hsa-miR-1297					1	0,00
hsa-miR-1298-5p	3	0,00				
hsa-miR-1299	4	0,00				
hsa-miR-1301-3p	72	0,01	24	0,01	20	0,00
hsa-miR-1303	2	0,00				
hsa-miR-1304-3p			7	0,00		
hsa-miR-1304-5p	2	0,00	1	0,00	5	0,00
hsa-miR-1305					3	0,00
hsa-miR-1306-3p	2	0,00	2	0,00		
hsa-miR-1306-5p	7	0,00	3	0,00	2	0,00
hsa-miR-1307-3p	887	0,16	260	0,11	647	0,11
hsa-miR-1307-5p	80	0,01	11	0,00	130	0,02
hsa-miR-1307-5p, hsa-miR-1307-3p					1	0,00
hsa-miR-130a-3p	8	0,00				
hsa-miR-130b-3p	9	0,00	31	0,01	39	0,01
hsa-miR-130b-5p	454	0,08	591	0,25	328	0,06

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-132-3p	142	0,03	20	0,01	35	0,01
hsa-miR-132-5p	34	0,01	4	0,00	19	0,00
hsa-miR-132-5p, hsa-miR-132-3p			1	0,00		
hsa-miR-133a-3p					1	0,00
hsa-miR-134-5p	4	0,00				
hsa-miR-1343-3p	1	0,00				
hsa-miR-135b-5p	45	0,01	1	0,00	63	0,01
hsa-miR-136-3p	3	0,00				
hsa-miR-138-5p	2	0,00			1	0,00
hsa-miR-139-3p			3	0,00	2	0,00
hsa-miR-139-5p	14	0,00	4	0,00	3	0,00
hsa-miR-140-3p	5.887	1,09	453	0,19	526	0,09
hsa-miR-140-3p, hsa-miR-146b-5p	1	0,00				
hsa-miR-140-5p	1.243	0,23	167	0,07	329	0,06
hsa-miR-140-5p, hsa-miR-140-3p					2	0,00
hsa-miR-141-3p	12	0,00			1	0,00
hsa-miR-142-3p	7.573	1,40	1.975	0,85	5.067	0,89
hsa-miR-142-5p	4.210	0,78	584	0,25	3.273	0,58
hsa-miR-142-5p, hsa-miR-142-3p			1	0,00		
hsa-miR-142-5p, hsa-miR-155-5p					1	0,00
hsa-miR-143-3p	100	0,02			43	0,01
hsa-miR-143-5p	1	0,00				
hsa-miR-144-3p	4	0,00			1	0,00
hsa-miR-144-5p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-145-5p	7	0,00			1	0,00
hsa-miR-1468-5p	17	0,00	12	0,01	15	0,00
hsa-miR-146a-3p	3	0,00	3	0,00	11	0,00
hsa-miR-146a-5p	1.876	0,35	97	0,04	590	0,10
hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-150-5p	1	0,00				

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-146b-3p	187	0,03	151	0,06	259	0,05
hsa-miR-146b-5p	66.958	12,41	39.091	16,80	127.326	22,44
hsa-miR-147b	6	0,00	1	0,00		
hsa-miR-148a-3p	11.945	2,21	34	0,01	56	0,01
hsa-miR-148a-5p	37	0,01				
hsa-miR-148b-3p	3.315	0,61	623	0,27	2.358	0,42
hsa-miR-148b-5p	46	0,01	15	0,01	38	0,01
hsa-miR-149-5p	1	0,00	6	0,00	10	0,00
hsa-miR-150-3p	154	0,03				
hsa-miR-150-5p	42.286	7,84	3	0,00	46	0,01
hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1246	1	0,00				
hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1275	1	0,00				
hsa-miR-150-5p, hsa-miR-361-5p	1	0,00				
hsa-miR-151a-3p	973	0,18			3	0,00
hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-151b	26	0,00				
hsa-miR-151b	8	0,00				
hsa-miR-152-3p	535	0,10	87	0,04	71	0,01
hsa-miR-152-5p	1	0,00	2	0,00	1	0,00
hsa-miR-153-3p			1	0,00	1	0,00
hsa-miR-153-5p	1	0,00				
hsa-miR-1537-3p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-155-3p			13	0,01	13	0,00
hsa-miR-155-5p	4.133	0,77	180.381	77,51	161.761	28,51
hsa-miR-155-5p, hsa-miR-1246					1	0,00
hsa-miR-155-5p, hsa-miR-4284					11	0,00
hsa-miR-155-5p, hsa-miR-484					1	0,00
hsa-miR-155-5p, hsa-miR-625-3p					1	0,00
hsa-miR-155-5p, hsa-miR-625-5p					1	0,00
hsa-miR-15a-3p					1	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-15a-5p	103	0,02	14	0,01	54	0,01
hsa-miR-15b-3p	62	0,01	105	0,05	148	0,03
hsa-miR-15b-5p	205	0,04	91	0,04	159	0,03
hsa-miR-16-1-3p	8	0,00	2	0,00	6	0,00
hsa-miR-16-2-3p	311	0,06	574	0,25	288	0,05
hsa-miR-16-5p	1.608	0,30	681	0,29	1.071	0,19
hsa-miR-16-5p, hsa-miR-155-5p					1	0,00
hsa-miR-16-5p, hsa-miR-98-5p	1	0,00				
hsa-miR-17-3p	30	0,01	180	0,08	99	0,02
hsa-miR-17-5p	947	0,18	4.228	1,82	3.027	0,53
hsa-miR-17-5p, hsa-miR-106a-5p	2	0,00	7	0,00	4	0,00
hsa-miR-17-5p, hsa-miR-92a-3p					1	0,00
hsa-miR-181a-2-3p	161	0,03	2	0,00		
hsa-miR-181a-3p	139	0,03	492	0,21	235	0,04
hsa-miR-181a-5p	7.183	1,33	8.624	3,71	5.868	1,03
hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-142-3p					1	0,00
hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-146b-5p	1	0,00				
hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-155-5p					1	0,00
hsa-miR-181b-3p	1	0,00	4	0,00	9	0,00
hsa-miR-181b-5p	1.158	0,21	2.224	0,96	1.252	0,22
hsa-miR-181c-3p	18	0,00	14	0,01	12	0,00
hsa-miR-181c-5p	95	0,02	12	0,01	11	0,00
hsa-miR-181d-5p	110	0,02	65	0,03	46	0,01
hsa-miR-182-5p	17	0,00			574	0,10
hsa-miR-183-3p					1	0,00
hsa-miR-183-5p	10	0,00			561	0,10
hsa-miR-184			1	0,00	7	0,00
hsa-miR-185-3p	30	0,01	4	0,00	7	0,00
hsa-miR-185-5p	908	0,17	258	0,11	562	0,10

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-186-5p	6.670	1,24	661	0,28	978	0,17
hsa-miR-188-5p	6	0,00	1	0,00	3	0,00
hsa-miR-18a-3p	9	0,00	126	0,05	37	0,01
hsa-miR-18a-5p	36	0,01	504	0,22	167	0,03
hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-18b-5p	1	0,00				
hsa-miR-18b-5p					1	0,00
hsa-miR-1908-5p	1	0,00	22	0,01	3	0,00
hsa-miR-190a-5p			1	0,00	1	0,00
hsa-miR-190b	11	0,00	1	0,00	5	0,00
hsa-miR-191-3p	5	0,00	6	0,00	10	0,00
hsa-miR-191-5p	10.781	2,00	3.370	1,45	10.885	1,92
hsa-miR-191-5p, hsa-miR-454-3p					1	0,00
hsa-miR-1914-5p	1	0,00				
hsa-miR-192-5p	2.143	0,40	531	0,23	164	0,03
hsa-miR-192-5p, hsa-miR-215-5p	2	0,00				
hsa-miR-193a-5p	15	0,00				
hsa-miR-193b-3p					39	0,01
hsa-miR-193b-5p					1	0,00
hsa-miR-194-3p	3	0,00	1	0,00		
hsa-miR-194-5p	379	0,07	79	0,03	45	0,01
hsa-miR-195-3p	8	0,00	1	0,00	4	0,00
hsa-miR-195-5p	3	0,00	1	0,00	4	0,00
hsa-miR-196a-3p					17	0,00
hsa-miR-196a-5p	2	0,00	63	0,03	423	0,07
hsa-miR-196b-3p	1	0,00				
hsa-miR-196b-5p	59	0,01	20	0,01		
hsa-miR-197-3p	334	0,06	54	0,02	16	0,00
hsa-miR-1973					6	0,00
hsa-miR-1973, hsa-miR-4485	1	0,00	1	0,00	9	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-1976	16	0,00	3	0,00	6	0,00
hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199b-3p	101	0,02				
hsa-miR-199a-5p	77	0,01			1	0,00
hsa-miR-199b-5p	88	0,02				
hsa-miR-19a-3p	76	0,01	394	0,17	186	0,03
hsa-miR-19b-3p	433	0,08	1.054	0,45	751	0,13
hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-1246					1	0,00
hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-92a-3p					1	0,00
hsa-miR-200a-3p	69	0,01	43	0,02	3	0,00
hsa-miR-200a-5p	3	0,00	2	0,00		
hsa-miR-200b-3p	91	0,02	147	0,06	3	0,00
hsa-miR-200b-5p	2	0,00	2	0,00		
hsa-miR-200c-3p	252	0,05	3	0,00	13	0,00
hsa-miR-200c-5p	1	0,00				
hsa-miR-203a	68	0,01	3	0,00	5	0,00
hsa-miR-204-5p					1	0,00
hsa-miR-205-5p	7	0,00			1.828	0,32
hsa-miR-20a-3p	9	0,00	6	0,00	10	0,00
hsa-miR-20a-5p	2.652	0,49	15.846	6,81	8.776	1,55
hsa-miR-20b-5p	66	0,01			10	0,00
hsa-miR-21-3p	142	0,03	506	0,22	639	0,11
hsa-miR-21-5p	165.001	30,59	410.832	176,54	549.001	96,75
hsa-miR-21-5p, hsa-let-7i-5p					2	0,00
hsa-miR-21-5p, hsa-miR-146b-5p					10	0,00
hsa-miR-21-5p, hsa-miR-150-5p	1	0,00				
hsa-miR-21-5p, hsa-miR-155-5p	1	0,00			21	0,00
hsa-miR-21-5p, hsa-miR-181a-5p					1	0,00
hsa-miR-21-5p, hsa-miR-191-5p					2	0,00
hsa-miR-21-5p, hsa-miR-22-3p	13	0,00			43	0,01

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-21-5p, hsa-miR-24-3p					1	0,00
hsa-miR-21-5p, hsa-miR-30c-5p					1	0,00
hsa-miR-21-5p, hsa-miR-330-5p					1	0,00
hsa-miR-21-5p, hsa-miR-342-3p					1	0,00
hsa-miR-21-5p, hsa-miR-92a-3p					1	0,00
hsa-miR-210-3p	46	0,01	856	0,37	2.656	0,47
hsa-miR-210-5p			7	0,00	10	0,00
hsa-miR-2110	59	0,01	18	0,01	5	0,00
hsa-miR-2116-3p	1	0,00				
hsa-miR-212-3p	4	0,00	2	0,00	5	0,00
hsa-miR-212-5p	20	0,00	2	0,00	9	0,00
hsa-miR-215-3p					1	0,00
hsa-miR-215-5p	11	0,00			112	0,02
hsa-miR-216a-5p					1	0,00
hsa-miR-216b-5p					6	0,00
hsa-miR-217					2	0,00
hsa-miR-218-5p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-219a-1-3p	4	0,00	4	0,00	2	0,00
hsa-miR-219a-5p	3	0,00			3	0,00
hsa-miR-219b-3p	1	0,00				
hsa-miR-219b-5p					2	0,00
hsa-miR-22-3p	7.436	1,38	335	0,14	2.414	0,43
hsa-miR-22-5p	89	0,02	1	0,00	6	0,00
hsa-miR-221-3p	1.071	0,20	1.162	0,50	2.088	0,37
hsa-miR-221-5p	255	0,05	148	0,06	161	0,03
hsa-miR-222-3p	2.927	0,54	5.031	2,16	1.872	0,33
hsa-miR-222-3p, hsa-miR-150-5p	2	0,00				
hsa-miR-222-3p, hsa-miR-155-5p					1	0,00
hsa-miR-222-3p, hsa-miR-423-3p	1	0,00			1	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-222-5p	3	0,00	2	0,00		
hsa-miR-223-3p	276	0,05	3	0,00	1	0,00
hsa-miR-223-3p, hsa-miR-146a-5p	1	0,00				
hsa-miR-223-5p	260	0,05	3	0,00	1	0,00
hsa-miR-224-5p	18	0,00				
hsa-miR-2277-3p	2	0,00			3	0,00
hsa-miR-2277-5p	7	0,00	4	0,00	2	0,00
hsa-miR-2355-3p	4	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-2355-5p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-23a-3p	4.497	0,83	508	0,22	766	0,13
hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-183-5p					1	0,00
hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p	1.506	0,28	29	0,01	184	0,03
hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-34a-5p					1	0,00
hsa-miR-23a-5p	3	0,00	6	0,00		
hsa-miR-23b-3p	299	0,06	36	0,02	1.460	0,26
hsa-miR-23b-5p	2	0,00	1	0,00	10	0,00
hsa-miR-24-1-5p					9	0,00
hsa-miR-24-2-5p	77	0,01	36	0,02	51	0,01
hsa-miR-24-3p	9.888	1,83	2.915	1,25	7.158	1,26
hsa-miR-24-3p, hsa-let-7i-5p	1	0,00				
hsa-miR-24-3p, hsa-miR-146b-5p	1	0,00				
hsa-miR-24-3p, hsa-miR-4291					1	0,00
hsa-miR-2467-5p	1	0,00	1	0,00	3	0,00
hsa-miR-25-3p	3.822	0,71	2.353	1,01	1.740	0,31
hsa-miR-25-5p	32	0,01	124	0,05	1	0,00
hsa-miR-26a-2-3p	17	0,00	4	0,00	8	0,00
hsa-miR-26a-5p	122.785	22,77	3.859	1,66	12.455	2,19
hsa-miR-26a-5p, hsa-let-7g-5p	1	0,00				
hsa-miR-26a-5p, hsa-let-7i-5p	1	0,00				

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-103a-3p	1	0,00				
hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-146a-5p	1	0,00				
hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-146b-5p	2	0,00				
hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-15b-5p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-28-3p	1	0,00				
hsa-miR-26b-3p	78	0,01	19	0,01	30	0,01
hsa-miR-26b-5p	25.217	4,68	1.151	0,49	2.677	0,47
hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-26b-3p					1	0,00
hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-92a-3p	1	0,00				
hsa-miR-27a-3p	20.575	3,81	5.538	2,38	6.902	1,22
hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-27b-3p	539	0,10	378	0,16	365	0,06
hsa-miR-27a-5p	509	0,09	182	0,08	169	0,03
hsa-miR-27b-3p	2.440	0,45	602	0,26	33.710	5,94
hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-142-3p					1	0,00
hsa-miR-27b-5p	4	0,00	1	0,00	95	0,02
hsa-miR-28-3p	2.026	0,38	244	0,10	200	0,04
hsa-miR-28-3p, hsa-miR-146b-5p	5	0,00				
hsa-miR-28-5p	1.861	0,35	102	0,04	181	0,03
hsa-miR-28-5p, hsa-miR-146b-5p					1	0,00
hsa-miR-296-3p	8	0,00	30	0,01	30	0,01
hsa-miR-296-5p	7	0,00	23	0,01	27	0,00
hsa-miR-29a-3p	9.884	1,83	4.049	1,74	5.492	0,97
hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-155-5p					2	0,00
hsa-miR-29a-5p	5	0,00	2	0,00	12	0,00
hsa-miR-29b-1-5p	4	0,00	11	0,00	7	0,00
hsa-miR-29b-2-5p	16	0,00	1	0,00	5	0,00
hsa-miR-29b-3p	1.358	0,25	104	0,04	300	0,05
hsa-miR-29c-3p	220	0,04	3	0,00	27	0,00
hsa-miR-29c-5p	37	0,01	1	0,00	6	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-301a-3p	3	0,00	3	0,00	30	0,01
hsa-miR-301a-5p	11	0,00	12	0,01	30	0,01
hsa-miR-301b	4	0,00	10	0,00	33	0,01
hsa-miR-302d-3p					1	0,00
hsa-miR-3064-5p	2	0,00				
hsa-miR-3065-3p	1	0,00				
hsa-miR-3065-5p					1	0,00
hsa-miR-3074-5p	1	0,00	3	0,00		
hsa-miR-30a-3p	5	0,00	1	0,00		
hsa-miR-30a-5p	79	0,01	16	0,01	40	0,01
hsa-miR-30b-3p	20	0,00	2	0,00		
hsa-miR-30b-5p	757	0,14	33	0,01	93	0,02
hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-155-5p					1	0,00
hsa-miR-30c-1-3p	16	0,00	14	0,01	10	0,00
hsa-miR-30c-5p	4.119	0,76	2.565	1,10	2.999	0,53
hsa-miR-30c-5p, hsa-let-7g-5p	2	0,00				
hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-23b-3p					1	0,00
hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30b-5p	14	0,00	3	0,00	1	0,00
hsa-miR-30d-3p	73	0,01	5	0,00	13	0,00
hsa-miR-30d-5p	22.209	4,12	4.464	1,92	5.351	0,94
hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-150-5p	2	0,00				
hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-155-5p					2	0,00
hsa-miR-30e-3p	1.202	0,22	450	0,19	411	0,07
hsa-miR-30e-5p	11.583	2,15	9.135	3,93	12.113	2,13
hsa-miR-31-5p	70	0,01	43	0,02	2	0,00
hsa-miR-31-5p, hsa-miR-146b-5p	1	0,00				
hsa-miR-3116	1	0,00				
hsa-miR-3121-3p			1	0,00		
hsa-miR-3124-5p			3	0,00		

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-3127-3p	1	0,00	1	0,00		
hsa-miR-3127-5p	1	0,00	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-3130-5p	1	0,00				
hsa-miR-3133			1	0,00		
hsa-miR-3134	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-3135a	1	0,00	1	0,00		
hsa-miR-3136-5p					2	0,00
hsa-miR-3138					1	0,00
hsa-miR-3140-3p	2	0,00			2	0,00
hsa-miR-3143	1	0,00	5	0,00	10	0,00
hsa-miR-3146					1	0,00
hsa-miR-3149	1	0,00			2	0,00
hsa-miR-3150a-5p	1	0,00	1	0,00		
hsa-miR-3150b-3p	2	0,00				
hsa-miR-3157-3p	4	0,00	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-3157-5p	1	0,00			2	0,00
hsa-miR-3158-3p	8	0,00	2	0,00	8	0,00
hsa-miR-3159	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-3165	1	0,00				
hsa-miR-3168	1	0,00	1	0,00		
hsa-miR-3173-5p	6	0,00	5	0,00	1	0,00
hsa-miR-3174	2	0,00				
hsa-miR-3176	4	0,00			4	0,00
hsa-miR-3177-3p	4	0,00	3	0,00	3	0,00
hsa-miR-3179	2	0,00	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-3180			9	0,00		
hsa-miR-3180-3p, hsa-miR-3180			9	0,00	1	0,00
hsa-miR-3180-5p			2	0,00		
hsa-miR-3187-3p			1	0,00	3	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-3187-5p					1	0,00
hsa-miR-3188	1	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-3191-3p			1	0,00		
hsa-miR-3194-5p	3	0,00			2	0,00
hsa-miR-3195	1	0,00				
hsa-miR-3198	1	0,00				
hsa-miR-3199			1	0,00		
hsa-miR-32-3p	43	0,01	5	0,00	3	0,00
hsa-miR-32-5p	270	0,05	31	0,01	215	0,04
hsa-miR-3200-3p	3	0,00			21	0,00
hsa-miR-3200-5p					1	0,00
hsa-miR-3202	1	0,00				
hsa-miR-320a	2.330	0,43	1.588	0,68	1.811	0,32
hsa-miR-320a, hsa-miR-320b	66	0,01	77	0,03	37	0,01
hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c	6	0,00	17	0,01	4	0,00
hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-320d	16	0,00	23	0,01	24	0,00
hsa-miR-320b	46	0,01	24	0,01	17	0,00
hsa-miR-320c	28	0,01	22	0,01	20	0,00
hsa-miR-320d	10	0,00	2	0,00	4	0,00
hsa-miR-320e	2	0,00	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-324-3p	67	0,01	21	0,01	42	0,01
hsa-miR-324-5p	30	0,01	2	0,00	37	0,01
hsa-miR-326	47	0,01			16	0,00
hsa-miR-328-3p	116	0,02	67	0,03	61	0,01
hsa-miR-329-3p	3	0,00				
hsa-miR-330-3p	137	0,03	90	0,04	229	0,04
hsa-miR-330-5p	97	0,02	63	0,03	238	0,04

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-331-3p	63	0,01	17	0,01	92	0,02
hsa-miR-331-5p	8	0,00	2	0,00	7	0,00
hsa-miR-335-3p	73	0,01				
hsa-miR-335-5p	36	0,01				
hsa-miR-338-3p	6	0,00				
hsa-miR-338-5p	15	0,00				
hsa-miR-339-3p	354	0,07	31	0,01	94	0,02
hsa-miR-339-5p	518	0,10	62	0,03	257	0,05
hsa-miR-33a-3p	3	0,00			2	0,00
hsa-miR-33a-5p	16	0,00	8	0,00	44	0,01
hsa-miR-33b-3p	7	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-33b-5p			1	0,00	1	0,00
hsa-miR-340-3p	169	0,03	24	0,01		
hsa-miR-340-5p	2.341	0,43	340	0,15	1	0,00
hsa-miR-342-3p	2.732	0,51	38	0,02	599	0,11
hsa-miR-342-5p	553	0,10	25	0,01	37	0,01
hsa-miR-345-3p					1	0,00
hsa-miR-345-5p	148	0,03	54	0,02	189	0,03
hsa-miR-34a-3p					2	0,00
hsa-miR-34a-5p	14	0,00	5	0,00	814	0,14
hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-23b-3p					1	0,00
hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-4284					1	0,00
hsa-miR-34c-3p	1	0,00				
hsa-miR-34c-5p	6	0,00	6	0,00	15	0,00
hsa-miR-3591-3p			2	0,00		
hsa-miR-3605-3p	7	0,00	3	0,00	1	0,00
hsa-miR-3605-5p			1	0,00	4	0,00
hsa-miR-3607-3p	2.686	0,50	130	0,06	475	0,08
hsa-miR-3607-5p	117	0,02	8	0,00	28	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-3607-5p, hsa-miR-3607-3p	236	0,04	7	0,00	63	0,01
hsa-miR-3609	13	0,00	5	0,00	2	0,00
hsa-miR-361-3p	1.535	0,28	242	0,10	533	0,09
hsa-miR-361-5p	358	0,07	110	0,05	135	0,02
hsa-miR-3610			1	0,00	1	0,00
hsa-miR-3611	3	0,00			1	0,00
hsa-miR-3613-3p			1	0,00		
hsa-miR-3613-5p	160	0,03	5	0,00	39	0,01
hsa-miR-3614-3p	1	0,00				
hsa-miR-3614-5p	3	0,00				
hsa-miR-3615	649	0,12	406	0,17	880	0,16
hsa-miR-362-3p					1	0,00
hsa-miR-362-5p	65	0,01	27	0,01	87	0,02
hsa-miR-3620-3p					3	0,00
hsa-miR-3620-5p					1	0,00
hsa-miR-363-3p	877	0,16	1	0,00	54	0,01
hsa-miR-363-5p	2	0,00				
hsa-miR-3651	40	0,01	22	0,01	36	0,01
hsa-miR-3653	1.830	0,34	45	0,02	217	0,04
hsa-miR-3656	5	0,00	2	0,00		
hsa-miR-365a-3p, hsa-miR-365b-3p	1	0,00			26	0,00
hsa-miR-365a-5p	1	0,00			6	0,00
hsa-miR-3661			2	0,00	1	0,00
hsa-miR-3662	1	0,00			2	0,00
hsa-miR-3667-3p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-3667-5p	2	0,00				
hsa-miR-3677-3p					3	0,00
hsa-miR-3678-5p			1	0,00	1	0,00
hsa-miR-3679-3p					1	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-3679-5p	2	0,00				
hsa-miR-3680-5p			1	0,00		
hsa-miR-3681-5p					3	0,00
hsa-miR-3687	20	0,00	1	0,00		
hsa-miR-3688-3p	1	0,00	1	0,00	4	0,00
hsa-miR-369-3p	4	0,00				
hsa-miR-3690	6	0,00				
hsa-miR-3691-3p			1	0,00		
hsa-miR-3691-5p			3	0,00		
hsa-miR-370-3p	24	0,00				
hsa-miR-374a-3p	269	0,05	16	0,01	63	0,01
hsa-miR-374a-5p	266	0,05	22	0,01	62	0,01
hsa-miR-374b-3p	41	0,01	2	0,00	9	0,00
hsa-miR-374b-5p	899	0,17	115	0,05	527	0,09
hsa-miR-374b-5p, hsa-miR-374c-5p	1	0,00			3	0,00
hsa-miR-375					3	0,00
hsa-miR-376a-3p	1	0,00				
hsa-miR-378a-3p	5.310	0,98	1.490	0,64	3.454	0,61
hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-378c	145	0,03	79	0,03	139	0,02
hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-378d, hsa-miR-378c	179	0,03	134	0,06	96	0,02
hsa-miR-378a-5p	38	0,01	6	0,00	33	0,01
hsa-miR-378b	3	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-378c	82	0,02	20	0,01	94	0,02
hsa-miR-378d	13	0,00	7	0,00	14	0,00
hsa-miR-378e	24	0,00	5	0,00	25	0,00
hsa-miR-378f	30	0,01	4	0,00	18	0,00
hsa-miR-378g	32	0,01	8	0,00	17	0,00
hsa-miR-378i	2	0,00	1	0,00	4	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-379-5p	17	0,00				
hsa-miR-381-3p	12	0,00				
hsa-miR-382-5p	1	0,00				
hsa-miR-3909	9	0,00	5	0,00	14	0,00
hsa-miR-3910	2	0,00				
hsa-miR-3911	1	0,00				
hsa-miR-3912-3p	28	0,01	10	0,00	16	0,00
hsa-miR-3913-5p	5	0,00	4	0,00	2	0,00
hsa-miR-3916	2	0,00	3	0,00	3	0,00
hsa-miR-3917			2	0,00		
hsa-miR-3918	1	0,00				
hsa-miR-3928-3p	4	0,00	6	0,00	1	0,00
hsa-miR-3934-5p	29	0,01	12	0,01	11	0,00
hsa-miR-3938					9	0,00
hsa-miR-3939	1	0,00				
hsa-miR-3940-3p	8	0,00	23	0,01	7	0,00
hsa-miR-3940-5p			1	0,00	3	0,00
hsa-miR-3944-3p			1	0,00	1	0,00
hsa-miR-409-3p	11	0,00				
hsa-miR-410-3p	1	0,00				
hsa-miR-411-3p	3	0,00				
hsa-miR-411-5p	6	0,00				
hsa-miR-421	35	0,01	12	0,01	55	0,01
hsa-miR-423-3p	11.013	2,04	8.038	3,45	6.766	1,19
hsa-miR-423-5p	2.651	0,49	3.544	1,52	815	0,14
hsa-miR-424-3p	32	0,01	110	0,05	40	0,01
hsa-miR-424-5p	11	0,00	16	0,01	46	0,01
hsa-miR-425-3p	27	0,01	1	0,00	33	0,01
hsa-miR-425-5p	534	0,10	256	0,11	1.500	0,26

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-4284	380	0,07	558	0,24	1.237	0,22
hsa-miR-4286	27	0,01			18	0,00
hsa-miR-429	7	0,00	8	0,00	1	0,00
hsa-miR-4306	1	0,00				
hsa-miR-4318	1	0,00				
hsa-miR-432-5p	1	0,00				
hsa-miR-4323	31	0,01	3	0,00	4	0,00
hsa-miR-4326	10	0,00	22	0,01	59	0,01
hsa-miR-433-3p	2	0,00				
hsa-miR-4417					1	0,00
hsa-miR-4423-5p					2	0,00
hsa-miR-4425			18	0,01	25	0,00
hsa-miR-4426	7	0,00	1	0,00		
hsa-miR-4430			1	0,00		
hsa-miR-4431					39	0,01
hsa-miR-4433b-5p	6	0,00				
hsa-miR-4434					1	0,00
hsa-miR-4435			1	0,00	1	0,00
hsa-miR-4437			2	0,00		
hsa-miR-4440	1	0,00	3	0,00		
hsa-miR-4443	51	0,01	16	0,01	4	0,00
hsa-miR-4444	3	0,00	3	0,00		
hsa-miR-4446-3p	3	0,00	1	0,00		
hsa-miR-4448	10	0,00				
hsa-miR-4449			1	0,00	8	0,00
hsa-miR-4454					12	0,00
hsa-miR-4461	1	0,00	11	0,00	15	0,00
hsa-miR-4463	1	0,00	6	0,00		
hsa-miR-4465			1	0,00		

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-4466			1	0,00	5	0,00
hsa-miR-4467	3	0,00	1	0,00		
hsa-miR-4470					1	0,00
hsa-miR-4473	8	0,00	7	0,00	27	0,00
hsa-miR-4474-3p	3	0,00	1	0,00	7	0,00
hsa-miR-4475			1	0,00		
hsa-miR-4476			2	0,00		
hsa-miR-4477b	1	0,00			6	0,00
hsa-miR-4478					1	0,00
hsa-miR-4479	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-4482-3p	3	0,00			1	0,00
hsa-miR-4482-5p	1	0,00				
hsa-miR-4484	2	0,00				
hsa-miR-4485	4	0,00	3	0,00	29	0,01
hsa-miR-4488	258	0,05	12	0,01	9	0,00
hsa-miR-4492			2	0,00		
hsa-miR-4492, hsa-miR-4508			3	0,00	1	0,00
hsa-miR-4493			18	0,01	12	0,00
hsa-miR-4497	1	0,00				
hsa-miR-4498			2	0,00	2	0,00
hsa-miR-449a			4	0,00	9	0,00
hsa-miR-449b-5p			2	0,00	1	0,00
hsa-miR-449c-5p			3	0,00	13	0,00
hsa-miR-4504	2	0,00			1	0,00
hsa-miR-4508	1	0,00	1	0,00		
hsa-miR-450a-2-3p			2	0,00	1	0,00
hsa-miR-450a-5p	43	0,01	116	0,05	127	0,02
hsa-miR-450b-5p	14	0,00	27	0,01	71	0,01
hsa-miR-4511	3	0,00	1	0,00	2	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-4512	1	0,00				
hsa-miR-4515			1	0,00		
hsa-miR-4516	9	0,00				
hsa-miR-4517	1	0,00	6	0,00		
hsa-miR-4518			6	0,00	4	0,00
hsa-miR-451a	20	0,00			1	0,00
hsa-miR-4521	14	0,00	64	0,03	112	0,02
hsa-miR-4532	7	0,00	5	0,00		
hsa-miR-4536-5p	1	0,00				
hsa-miR-454-3p	84	0,02	50	0,02	138	0,02
hsa-miR-454-3p, hsa-miR-4284					1	0,00
hsa-miR-454-5p	11	0,00	17	0,01	21	0,00
hsa-miR-455-3p	1	0,00			4	0,00
hsa-miR-455-5p	2	0,00	1	0,00	35	0,01
hsa-miR-4632-3p					1	0,00
hsa-miR-4638-3p					2	0,00
hsa-miR-4638-5p	2	0,00				
hsa-miR-4639-3p					1	0,00
hsa-miR-4639-5p					4	0,00
hsa-miR-4645-3p	1	0,00	2	0,00		
hsa-miR-4646-3p			1	0,00		
hsa-miR-4659a-3p	1	0,00	1	0,00		
hsa-miR-4659a-5p	1	0,00				
hsa-miR-4660	1	0,00				
hsa-miR-4661-5p	2	0,00	2	0,00		
hsa-miR-4662a-3p			1	0,00		
hsa-miR-4662a-5p	1	0,00	12	0,01	1	0,00
hsa-miR-4664-3p	1	0,00				
hsa-miR-4665-5p	2	0,00				

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-4666a-5p					1	0,00
hsa-miR-4667-3p	1	0,00				
hsa-miR-4668-5p	1	0,00				
hsa-miR-4670-5p			11	0,00	1	0,00
hsa-miR-4671-3p			12	0,01	47	0,01
hsa-miR-4671-5p			3	0,00	16	0,00
hsa-miR-4673			1	0,00		
hsa-miR-4674	1	0,00				
hsa-miR-4676-3p			1	0,00		
hsa-miR-4677-3p	7	0,00	7	0,00	4	0,00
hsa-miR-4680-5p	1	0,00				
hsa-miR-4685-3p	4	0,00			1	0,00
hsa-miR-4687-3p			1	0,00	1	0,00
hsa-miR-4688					1	0,00
hsa-miR-4690-3p	2	0,00			5	0,00
hsa-miR-4707-5p					1	0,00
hsa-miR-4709-5p	3	0,00				
hsa-miR-4714-3p	1	0,00				
hsa-miR-4717-3p	1	0,00				
hsa-miR-4719			1	0,00		
hsa-miR-4721	1	0,00				
hsa-miR-4723-3p					1	0,00
hsa-miR-4726-5p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-4727-3p	1	0,00				
hsa-miR-4732-3p	1	0,00				
hsa-miR-4734					1	0,00
hsa-miR-4738-3p	1	0,00				
hsa-miR-4742-3p	1	0,00	2	0,00	2	0,00
hsa-miR-4746-5p	7	0,00	7	0,00	6	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-4747-5p			3	0,00		
hsa-miR-4748			1	0,00		
hsa-miR-4749-5p	1	0,00				
hsa-miR-4753-3p	1	0,00				
hsa-miR-4755-5p	4	0,00				
hsa-miR-4757-3p	1	0,00				
hsa-miR-4761-5p					1	0,00
hsa-miR-4762-3p					2	0,00
hsa-miR-4765	1	0,00				
hsa-miR-4772-3p	72	0,01				
hsa-miR-4772-5p	66	0,01			2	0,00
hsa-miR-4775	2	0,00				
hsa-miR-4777-3p	2	0,00				
hsa-miR-4781-3p	3	0,00			1	0,00
hsa-miR-4787-3p	2	0,00			1	0,00
hsa-miR-4791	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-4795-3p	3	0,00				
hsa-miR-4795-5p	1	0,00				
hsa-miR-4796-3p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-4796-5p	5	0,00				
hsa-miR-4797-3p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-4797-5p			1	0,00		
hsa-miR-4800-3p	1	0,00				
hsa-miR-484	1.179	0,22	409	0,18	736	0,13
hsa-miR-485-3p	5	0,00				
hsa-miR-485-5p	1	0,00				
hsa-miR-486-3p	11	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-486-5p	190	0,04	4	0,00	15	0,00
hsa-miR-487b-3p	3	0,00				

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-490-3p					1	0,00
hsa-miR-491-5p	1	0,00				
hsa-miR-493-3p	6	0,00				
hsa-miR-493-5p	9	0,00				
hsa-miR-494-3p	8	0,00				
hsa-miR-495-3p	3	0,00				
hsa-miR-4999-3p			1	0,00		
hsa-miR-4999-5p	4	0,00	4	0,00		
hsa-miR-499a-5p	72	0,01	22	0,01	19	0,00
hsa-miR-5000-3p	3	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-5001-3p	5	0,00	2	0,00	6	0,00
hsa-miR-5001-5p	2	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-5006-3p	2	0,00				
hsa-miR-5009-5p					1	0,00
hsa-miR-500a-3p	52	0,01	12	0,01	43	0,01
hsa-miR-500a-3p, hsa-miR-502-3p	3	0,00	3	0,00	5	0,00
hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-500b-5p	11	0,00	2	0,00	11	0,00
hsa-miR-500b-3p	2	0,00			1	0,00
hsa-miR-500b-5p			1	0,00	1	0,00
hsa-miR-501-3p	90	0,02	35	0,02	39	0,01
hsa-miR-501-5p	10	0,00	3	0,00	10	0,00
hsa-miR-5010-3p	1	0,00	18	0,01	42	0,01
hsa-miR-502-3p	54	0,01	33	0,01	57	0,01
hsa-miR-502-5p	4	0,00	1	0,00	6	0,00
hsa-miR-503-3p			1	0,00		
hsa-miR-503-5p	10	0,00	31	0,01	65	0,01
hsa-miR-505-3p	49	0,01	13	0,01	40	0,01
hsa-miR-505-5p	11	0,00	9	0,00	5	0,00
hsa-miR-506-3p					1	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-508-3p	19	0,00			3	0,00
hsa-miR-509-3-5p	22	0,00			4	0,00
hsa-miR-509-3p	8	0,00				
hsa-miR-509-5p	4	0,00			2	0,00
hsa-miR-5090					1	0,00
hsa-miR-5091			1	0,00	2	0,00
hsa-miR-5094					2	0,00
hsa-miR-5096					1	0,00
hsa-miR-511-3p	1	0,00				
hsa-miR-511-5p	5	0,00				
hsa-miR-513a-5p	2	0,00	5	0,00		
hsa-miR-513b-5p	1	0,00				
hsa-miR-513c-5p	2	0,00	34	0,01		
hsa-miR-514a-3p	76	0,01			14	0,00
hsa-miR-514a-5p	2	0,00			2	0,00
hsa-miR-5188	1	0,00				
hsa-miR-5189-3p	1	0,00				
hsa-miR-5189-5p			1	0,00		
hsa-miR-5193	1	0,00				
hsa-miR-5196-3p	5	0,00	5	0,00		
hsa-miR-532-3p	12	0,00	6	0,00	32	0,01
hsa-miR-532-5p	2.046	0,38	470	0,20	1.641	0,29
hsa-miR-539-3p	1	0,00				
hsa-miR-542-3p	4	0,00	10	0,00	48	0,01
hsa-miR-542-5p					1	0,00
hsa-miR-543	7	0,00				
hsa-miR-544b					3	0,00
hsa-miR-548a-3p	2	0,00	1	0,00	7	0,00
hsa-miR-548ab					1	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-548ac	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-548ag	1	0,00				
hsa-miR-548ah-3p, hsa-miR-548am-3p					1	0,00
hsa-miR-548ah-3p, hsa-miR-548av-3p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-548ak					1	0,00
hsa-miR-548al	1	0,00				
hsa-miR-548am-3p					1	0,00
hsa-miR-548an	2	0,00				
hsa-miR-548ap-3p			1	0,00		
hsa-miR-548ap-5p	3	0,00	1	0,00		
hsa-miR-548aq-3p	1	0,00			5	0,00
hsa-miR-548ar-3p	3	0,00				
hsa-miR-548av-3p			1	0,00		
hsa-miR-548av-5p	8	0,00	10	0,00	24	0,00
hsa-miR-548ay-3p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-548ay-5p	1	0,00	1	0,00		
hsa-miR-548b-3p	1	0,00				
hsa-miR-548c-5p, hsa-miR-548o-5p, hsa-miR-548am-5p, hsa-miR-548au-5p	2	0,00				
hsa-miR-548d-5p, hsa-miR-548ay-5p			2	0,00	2	0,00
hsa-miR-548e-3p	31	0,01	10	0,00	10	0,00
hsa-miR-548f-3p	5	0,00	3	0,00	3	0,00
hsa-miR-548h-3p, hsa-miR-548z			1	0,00	1	0,00
hsa-miR-548h-5p					1	0,00
hsa-miR-548j-5p, hsa-miR-548ap-5p	15	0,00	4	0,00		
hsa-miR-548k, hsa-miR-548av-5p	39	0,01	15	0,01	37	0,01
hsa-miR-548l					1	0,00
hsa-miR-548n	2	0,00	3	0,00		
hsa-miR-548o-3p	36	0,01	5	0,00	12	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads:	5.393.355	Valide Gesamt-reads:	2.327.119	Valide Gesamt-reads:	5.674.444
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-548o-3p, hsa-miR-548av-3p	21	0,00	6	0,00	12	0,00
hsa-miR-548q	1	0,00				
hsa-miR-548t-3p, hsa-miR-548aa, hsa-miR-548ap-3p			2	0,00		
hsa-miR-548t-5p	1	0,00				
hsa-miR-548u	2	0,00	2	0,00	9	0,00
hsa-miR-548w	3	0,00				
hsa-miR-548x-3p					2	0,00
hsa-miR-550a-3-5p			3	0,00	1	0,00
hsa-miR-550a-3p	1	0,00	1	0,00		
hsa-miR-550a-5p	3	0,00				
hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-550a-3-5p	1	0,00	3	0,00		
hsa-miR-551b-3p	1	0,00			2	0,00
hsa-miR-551b-5p					2	0,00
hsa-miR-5581-3p	1	0,00				
hsa-miR-5582-3p					1	0,00
hsa-miR-5585-3p	1	0,00				
hsa-miR-5588-3p	2	0,00				
hsa-miR-5588-5p	1	0,00				
hsa-miR-5683			1	0,00		
hsa-miR-5690	3	0,00				
hsa-miR-5695			1	0,00		
hsa-miR-5696			1	0,00		
hsa-miR-570-3p					1	0,00
hsa-miR-5701	10	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-573			1	0,00		
hsa-miR-574-3p	14	0,00				
hsa-miR-574-5p	8	0,00				
hsa-miR-576-3p	46	0,01	11	0,00	36	0,01

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-576-5p	69	0,01	5	0,00	18	0,00
hsa-miR-577	1	0,00				
hsa-miR-579-3p	2	0,00	3	0,00	1	0,00
hsa-miR-579-5p	4	0,00	5	0,00		
hsa-miR-580-3p	6	0,00	4	0,00		
hsa-miR-580-5p					1	0,00
hsa-miR-582-3p	4	0,00			50	0,01
hsa-miR-582-5p	2	0,00			2	0,00
hsa-miR-584-5p	13	0,00				
hsa-miR-589-3p	1	0,00				
hsa-miR-589-5p	71	0,01	46	0,02	39	0,01
hsa-miR-590-3p	102	0,02	11	0,00	49	0,01
hsa-miR-597-5p	1	0,00	2	0,00		
hsa-miR-598-3p	111	0,02	1	0,00	35	0,01
hsa-miR-6087	43	0,01	18	0,01	54	0,01
hsa-miR-612	1	0,00				
hsa-miR-615-3p	3	0,00	5	0,00	69	0,01
hsa-miR-616-3p	1	0,00	1	0,00		
hsa-miR-616-5p	2	0,00				
hsa-miR-618	1	0,00				
hsa-miR-619-5p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-624-5p					5	0,00
hsa-miR-625-3p	73	0,01	176	0,08	309	0,05
hsa-miR-625-5p	15	0,00	26	0,01	29	0,01
hsa-miR-627-3p	3	0,00			2	0,00
hsa-miR-627-5p	2	0,00	1	0,00		
hsa-miR-628-3p	5	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-628-5p	8	0,00	5	0,00	6	0,00
hsa-miR-629-3p	2	0,00	1	0,00	2	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-629-5p	300	0,06	217	0,09	97	0,02
hsa-miR-641	6	0,00	9	0,00	13	0,00
hsa-miR-642a-3p	16	0,00	2	0,00	8	0,00
hsa-miR-642a-3p, hsa-miR-642b-3p			1	0,00		
hsa-miR-642a-5p	42	0,01	3	0,00	1	0,00
hsa-miR-6501-3p	1	0,00				
hsa-miR-6501-5p	20	0,00	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-6503-3p	13	0,00				
hsa-miR-6503-5p	1	0,00				
hsa-miR-6505-3p			1	0,00	7	0,00
hsa-miR-6505-5p					2	0,00
hsa-miR-6509-5p					1	0,00
hsa-miR-651-5p	87	0,02				
hsa-miR-6511a-3p			1	0,00		
hsa-miR-6511a-5p					1	0,00
hsa-miR-6511b-3p					2	0,00
hsa-miR-6513-3p	12	0,00			1	0,00
hsa-miR-6513-5p	1	0,00				
hsa-miR-6514-3p					1	0,00
hsa-miR-6514-5p			1	0,00		
hsa-miR-6515-3p			4	0,00	6	0,00
hsa-miR-6515-5p	4	0,00	2	0,00	2	0,00
hsa-miR-6516-3p	5	0,00	4	0,00	33	0,01
hsa-miR-6516-5p					24	0,00
hsa-miR-6516-5p, hsa-miR-6516-3p			2	0,00	34	0,01
hsa-miR-652-3p	490	0,09	103	0,04	286	0,05
hsa-miR-652-3p, hsa-miR-6087					1	0,00
hsa-miR-652-5p	1	0,00	1	0,00		
hsa-miR-654-3p	11	0,00				

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-654-5p	1	0,00				
hsa-miR-656-3p	1	0,00				
hsa-miR-659-5p	2	0,00	2	0,00	7	0,00
hsa-miR-660-3p					3	0,00
hsa-miR-660-5p	286	0,05	66	0,03	262	0,05
hsa-miR-663b	2	0,00	1	0,00		
hsa-miR-664a-3p	41	0,01	11	0,00	27	0,00
hsa-miR-664a-5p	34	0,01	7	0,00	15	0,00
hsa-miR-664a-5p, hsa-miR-664a-3p	4	0,00	2	0,00	3	0,00
hsa-miR-664b-3p	11	0,00	1	0,00	14	0,00
hsa-miR-664b-5p	4	0,00			2	0,00
hsa-miR-664b-5p, hsa-miR-664b-3p	41	0,01	2	0,00	11	0,00
hsa-miR-671-3p	85	0,02	40	0,02	51	0,01
hsa-miR-671-5p	119	0,02	55	0,02	319	0,06
hsa-miR-6715b-3p	1	0,00				
hsa-miR-6718-5p	5	0,00				
hsa-miR-6721-5p	1	0,00	2	0,00		
hsa-miR-6724-5p	11	0,00				
hsa-miR-6726-3p	1	0,00				
hsa-miR-6726-5p	1	0,00				
hsa-miR-6727-3p					1	0,00
hsa-miR-6729-3p					3	0,00
hsa-miR-6729-5p					3	0,00
hsa-miR-6731-3p	8	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-6731-5p	1	0,00				
hsa-miR-6733-3p	1	0,00				
hsa-miR-6733-5p			1	0,00		
hsa-miR-6734-3p	1	0,00			2	0,00
hsa-miR-6737-3p					2	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-6738-3p			1	0,00		
hsa-miR-6739-3p	1	0,00	3	0,00	6	0,00
hsa-miR-6740-3p	2	0,00			1	0,00
hsa-miR-6741-3p	4	0,00			2	0,00
hsa-miR-6741-5p			1	0,00		
hsa-miR-6742-3p					1	0,00
hsa-miR-6747-3p	9	0,00	19	0,01	6	0,00
hsa-miR-6748-3p	2	0,00			1	0,00
hsa-miR-6750-5p					1	0,00
hsa-miR-6751-3p					1	0,00
hsa-miR-6752-3p			1	0,00		
hsa-miR-6753-3p					2	0,00
hsa-miR-6754-3p			1	0,00		
hsa-miR-6755-5p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-6758-3p			1	0,00	2	0,00
hsa-miR-676-3p	2	0,00				
hsa-miR-6762-5p	1	0,00	1	0,00		
hsa-miR-6763-3p	1	0,00				
hsa-miR-6763-5p	1	0,00				
hsa-miR-6764-5p			1	0,00		
hsa-miR-6766-3p					1	0,00
hsa-miR-6767-5p	1	0,00	1	0,00		
hsa-miR-6769a-5p					1	0,00
hsa-miR-6769b-3p	3	0,00			2	0,00
hsa-miR-6770-3p	1	0,00				
hsa-miR-6771-5p	1	0,00				
hsa-miR-6774-3p	8	0,00				
hsa-miR-6774-5p	3	0,00				
hsa-miR-6777-3p			2	0,00	1	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-6780a-3p	1	0,00				
hsa-miR-6780a-5p, hsa-miR-6780a-3p					1	0,00
hsa-miR-6780b-3p	7	0,00			5	0,00
hsa-miR-6782-3p	3	0,00				
hsa-miR-6783-3p					2	0,00
hsa-miR-6786-3p	1	0,00				
hsa-miR-6789-3p			1	0,00	1	0,00
hsa-miR-6791-3p	1	0,00			2	0,00
hsa-miR-6796-3p					1	0,00
hsa-miR-6797-3p			1	0,00	1	0,00
hsa-miR-6797-5p					1	0,00
hsa-miR-6798-3p			2	0,00	4	0,00
hsa-miR-6802-3p	4	0,00			1	0,00
hsa-miR-6803-3p	7	0,00			4	0,00
hsa-miR-6804-3p					1	0,00
hsa-miR-6805-3p					1	0,00
hsa-miR-6805-5p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-6806-3p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-6807-3p					1	0,00
hsa-miR-6807-5p			1	0,00		
hsa-miR-6808-3p	1	0,00				
hsa-miR-6812-3p	1	0,00			2	0,00
hsa-miR-6813-5p	1	0,00				
hsa-miR-6817-3p					1	0,00
hsa-miR-6818-3p	1	0,00			2	0,00
hsa-miR-6819-3p	1	0,00	1	0,00		
hsa-miR-6821-5p			1	0,00		
hsa-miR-6824-3p					1	0,00
hsa-miR-6826-3p			1	0,00		

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-6832-3p					2	0,00
hsa-miR-6833-3p	8	0,00	3	0,00		
hsa-miR-6834-5p					1	0,00
hsa-miR-6837-3p	2	0,00				
hsa-miR-6837-5p	1	0,00				
hsa-miR-6838-5p	1	0,00				
hsa-miR-6839-5p					1	0,00
hsa-miR-6842-3p	57	0,01	6	0,00	20	0,00
hsa-miR-6842-5p	2	0,00				
hsa-miR-6844					1	0,00
hsa-miR-6847-5p					1	0,00
hsa-miR-6850-5p					1	0,00
hsa-miR-6851-3p	1	0,00				
hsa-miR-6852-3p					1	0,00
hsa-miR-6852-5p	2	0,00			1	0,00
hsa-miR-6853-3p	1	0,00			2	0,00
hsa-miR-6855-3p	3	0,00			1	0,00
hsa-miR-6857-3p					1	0,00
hsa-miR-6858-5p	1	0,00				
hsa-miR-6859-5p					3	0,00
hsa-miR-6861-3p					1	0,00
hsa-miR-6864-5p					1	0,00
hsa-miR-6866-3p					1	0,00
hsa-miR-6866-5p	6	0,00	3	0,00	1	0,00
hsa-miR-6868-3p	3	0,00	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-6871-3p					1	0,00
hsa-miR-6873-3p	5	0,00			1	0,00
hsa-miR-6878-5p					1	0,00
hsa-miR-6880-5p					1	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-6882-5p	2	0,00			1	0,00
hsa-miR-6883-3p					2	0,00
hsa-miR-6884-5p	1	0,00				
hsa-miR-6892-3p					1	0,00
hsa-miR-6892-5p			2	0,00	1	0,00
hsa-miR-6894-3p	4	0,00	1	0,00		
hsa-miR-6895-3p					1	0,00
hsa-miR-7-1-3p	23	0,00	5	0,00	13	0,00
hsa-miR-7-5p	4.227	0,78	4395	1,89	4381	0,77
hsa-miR-708-3p	8	0,00				
hsa-miR-708-5p	6	0,00				
hsa-miR-7109-5p					1	0,00
hsa-miR-7110-3p	1	0,00				
hsa-miR-7111-3p					1	0,00
hsa-miR-7112-3p			2	0,00		
hsa-miR-7113-3p			1	0,00		
hsa-miR-7114-5p					1	0,00
hsa-miR-7161-3p	1	0,00				
hsa-miR-744-3p					6	0,00
hsa-miR-744-5p	696	0,13	275	0,12	948	0,17
hsa-miR-758-3p	1	0,00				
hsa-miR-760	14	0,00	7	0,00	2	0,00
hsa-miR-7641	17	0,00	6	0,00	53	0,01
hsa-miR-765			1	0,00		
hsa-miR-766-3p	77	0,01	10	0,00	34	0,01
hsa-miR-766-5p	10	0,00	3	0,00	6	0,00
hsa-miR-766-5p, hsa-miR-766-3p	1	0,00				
hsa-miR-769-3p	2	0,00	1	0,00	2	0,00
hsa-miR-769-5p	430	0,08	407	0,17	558	0,10

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-7704			1	0,00	4	0,00
hsa-miR-7705	4	0,00			2	0,00
hsa-miR-7706	16	0,00	5	0,00	27	0,00
hsa-miR-7846-3p	1	0,00	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-7848-3p	3	0,00				
hsa-miR-7851-3p	2	0,00			1	0,00
hsa-miR-7854-3p	2	0,00				
hsa-miR-7974	4	0,00	12	0,01	9	0,00
hsa-miR-7976	12	0,00	3	0,00	3	0,00
hsa-miR-7977					1	0,00
hsa-miR-873-3p					1	0,00
hsa-miR-873-5p	7	0,00				
hsa-miR-874-3p	112	0,02	93	0,04	50	0,01
hsa-miR-874-5p	1	0,00				
hsa-miR-877-3p	2	0,00	7	0,00	29	0,01
hsa-miR-877-5p	4	0,00	3	0,00	8	0,00
hsa-miR-885-5p	1	0,00				
hsa-miR-887-3p					20	0,00
hsa-miR-887-5p					2	0,00
hsa-miR-888-5p					25	0,00
hsa-miR-889-3p	3	0,00				
hsa-miR-891a-5p			2	0,00	80	0,01
hsa-miR-891b					2	0,00
hsa-miR-892a					27	0,00
hsa-miR-892b					10	0,00
hsa-miR-892c-3p					3	0,00
hsa-miR-9-3p	8	0,00	21	0,01	1	0,00
hsa-miR-9-5p	345	0,06	329	0,14	113	0,02
hsa-miR-92a-1-5p	25	0,00	132	0,06	8	0,00

<u>Annotation</u>	<u>NK/T</u>		<u>SNK6</u>		<u>SNT16</u>	
	Valide Gesamt-reads: 5.393.355		Valide Gesamt-reads: 2.327.119		Valide Gesamt-reads: 5.674.444	
	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads	Reads	%o valider Gesamt-reads
hsa-miR-92a-3p	18.676	3,46	71605	30,77	24358	4,29
hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-106b-5p	1	0,00			2	0,00
hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-146b-5p	1	0,00			1	0,00
hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-150-5p	3	0,00				
hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-155-5p					1	0,00
hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-454-3p	1	0,00				
hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-93-5p					1	0,00
hsa-miR-92b-3p	61	0,01	310	0,13	219	0,04
hsa-miR-92b-5p			25	0,01	11	0,00
hsa-miR-93-3p	9	0,00	14	0,01	39	0,01
hsa-miR-93-5p	632	0,12	824	0,35	1586	0,28
hsa-miR-933	2	0,00			1	0,00
hsa-miR-937-3p	2	0,00			6	0,00
hsa-miR-939-5p	1	0,00				
hsa-miR-940					3	0,00
hsa-miR-941	293	0,05	31	0,01	131	0,02
hsa-miR-942-3p	1	0,00	4	0,00	2	0,00
hsa-miR-942-5p	20	0,00	54	0,02	22	0,00
hsa-miR-944	2	0,00			11	0,00
hsa-miR-95-3p	275	0,05	5	0,00	5	0,00
hsa-miR-95-5p	1	0,00				
hsa-miR-96-5p	1	0,00			62	0,01
hsa-miR-98-3p			3	0,00	15	0,00
hsa-miR-98-5p	465	0,09	624	0,27	2002	0,35
hsa-miR-99a-5p	374	0,07	9	0,00	221	0,04
hsa-miR-99b-3p	26	0,00				
hsa-miR-99b-5p	1.523	0,28			15	0,00

9.1.2 Sequenzdaten der EB-viralen miRNAs

Tabelle 31: Rohdaten der Illumina-Hochdurchsatzsequenzierung für EBV-miRNAs

<u>Annotation</u>	<u>SNK6</u>			<u>SNT16</u>		
	Valide Gesamtreads:		2.327.119	Valide Gesamtreads:		5.674.444
	Valide EBV Reads:		160.747	Valide EBV Reads:		549.055
	Reads	% EBV Reads	‰ Valider Gesamtreads	Reads	% EBV Reads	‰ Valider Gesamtreads
ebv-miR-BHRF1-1	1	0,00	0,00		0,00	
ebv-miR-BHRF1-2-3p		0,00		1	0,00	0,00
ebv-miR-BHRF1-3		0,00		1	0,00	0,00
ebv-miR-BART3-5p	882	0,55	0,38	4.458	0,81	0,79
ebv-miR-BART3-3p	83	0,05	0,04	885	0,16	0,16
ebv-miR-BART4-5p	1.607	1,00	0,69	3.909	0,71	0,69
ebv-miR-BART4-3p	94	0,06	0,04	230	0,04	0,04
ebv-miR-BART1-5p	16.867	10,49	7,25	49.005	8,93	8,64
ebv-miR-BART1-3p	2.414	1,50	1,04	11.729	2,14	2,07
ebv-miR-BART15	26	0,02	0,01	83	0,02	0,01
ebv-miR-BART5-5p	179	0,11	0,08	1243	0,23	0,22
ebv-miR-BART5-3p	38	0,02	0,02	114	0,02	0,02
ebv-miR-BART16	4.998	3,11	2,15	21.610	3,94	3,81
ebv-miR-BART17-5p	11.619	7,23	4,99	6.307	1,15	1,11
ebv-miR-BART17-3p	2.141	1,33	0,92	3.839	0,70	0,68
ebv-miR-BART6-5p	530	0,33	0,23	2970	0,54	0,52
ebv-miR-BART6-3p	4611	2,87	1,98	14468	2,64	2,55
ebv-miR-BART21-5p	104	0,06	0,04	464	0,08	0,08
ebv-miR-BART21-3p	69	0,04	0,03	197	0,04	0,03
ebv-miR-BART18-5p	605	0,38	0,26	2.485	0,45	0,44
ebv-miR-BART18-3p	1.530	0,95	0,66	7.282	1,33	1,28
ebv-miR-BART7-5p	656	0,41	0,28	815	0,15	0,14
ebv-miR-BART7-3p	1236	0,77	0,53	5917	1,08	1,04
ebv-miR-BART8-5p	15893	9,89	6,83	58645	10,68	10,33
ebv-miR-BART8-3p	6480	4,03	2,78	18716	3,41	3,30
ebv-miR-BART9-5p	1354	0,84	0,58	5072	0,92	0,89
ebv-miR-BART9-3p	5461	3,40	2,35	10255	1,87	1,81
ebv-miR-BART22	20.816	12,95	8,94	91.020	16,58	16,04

<u>Annotation</u>	<u>SNK6</u>			<u>SNT16</u>		
	Valide Gesamtreads:		2.327.119	Valide Gesamtreads:		5.674.444
	Valide EBV Reads:		160.747	Valide EBV Reads:		549.055
	Reads	% EBV Reads	‰ Valider Gesamtreads	Reads	% EBV Reads	‰ Valider Gesamtreads
ebv-miR-BART10-5p	17	0,01	0,01	64	0,01	0,01
ebv-miR-BART10-3p	25.581	15,91	10,99	145.029	26,41	25,56
ebv-miR-BART11-5p	1.210	0,75	0,52	2.906	0,53	0,51
ebv-miR-BART11-3p	836	0,52	0,36	2.849	0,52	0,50
ebv-miR-BART12	644	0,40	0,28	600	0,11	0,11
ebv-miR-BART19-5p	323	0,20	0,14	685	0,12	0,12
ebv-miR-BART19-3p	16.991	10,57	7,30	43.273	7,88	7,63
ebv-miR-BART20-5p	4	0,00	0,00	53	0,01	0,01
ebv-miR-BART20-3p	32	0,02	0,01	73	0,01	0,01
ebv-miR-BART13-5p	7.380	4,59	3,17	15.539	2,83	2,74
ebv-miR-BART13-3p	2.811	1,75	1,21	5.835	1,06	1,03
ebv-miR-BART14-5p	468	0,29	0,20	484	0,09	0,09
ebv-miR-BART14-3p	2.858	1,78	1,23	5.204	0,95	0,92
ebv-miR-BART2-5p	1.054	0,66	0,45	4.584	0,83	0,81
ebv-miR-BART2-3p	245	0,15	0,11	159	0,03	0,03

9.2 Anhang 2: Effekt von EBER1/2 und miR-148a auf die CUL5-3'UTR

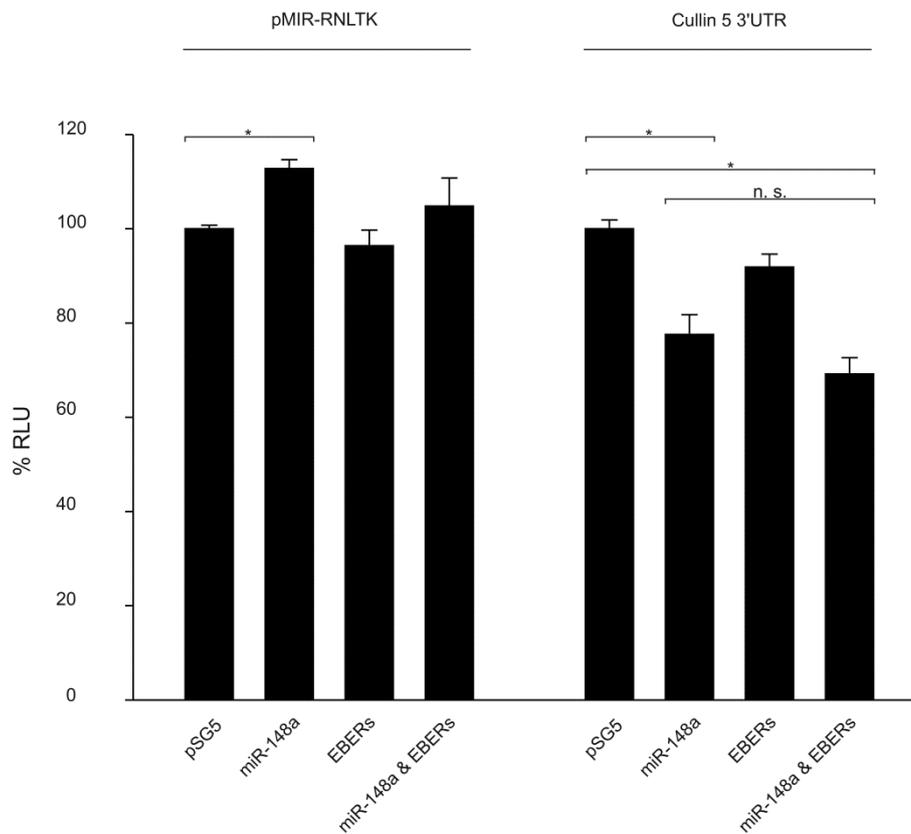


Abbildung 45: Einfluss der EBER1/2-RNAs auf die CUL5 3'UTR

HEK-293T-Zellen wurden mit je 0,2µg Reporterplasmid und 0,8µg Effektorplasmiden transfiziert. In Ansätzen mit der Kombination aus zwei Effektorplasmiden wurde von jeder DNA 0,4µg eingesetzt. Ansätze, die nur mit einem Effektorplasmid transfiziert wurden, wurden zusätzlich mit 0,4µg pSG5-Leervektor transfiziert. 48h nach Transfektion erfolgte die Zellyse und die Messung der Luciferaseaktivität. Das Experiment wurde vierfach in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind mittlere Luciferaseaktivitäten mit Standardfehlern. Transfektion von miR-148a alleine führte zu einer Reduktion der Luciferaseaktivität. Die Kombination von miR-148a und EBER1/2 reduzierte die Luciferaseaktivität nicht stärker als die beiden Effektorplasmide alleine.

9.3 Publikationen

Motsch N, **Alles J**, Imig J, Zhu J, Barth S, et al. (2012) MicroRNA Profiling of Epstein-Barr Virus-Associated NK/T-Cell Lymphomas by Deep Sequencing. PLoS ONE 7(8): e42193. doi:10.1371/journal.pone.0042193

Kwanhian, W.*, Lenze, D.*, **Alles, J.***, Motsch, N., Barth, S., Döll, C., Imig, J., Hummel, M., Tinguely, M., Trivedi, P., Lulitanond, V., Meister, G., Renner, C. and Grässer, F. A. (2012), MicroRNA-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma. CANCER MEDICINE, 1: 141–155.

Alles J, Hasler D, Kazmi SMA, Tesson M, Hamilton A, Borchard H, Schlegel L, Marx S, Hart M, Motsch N, Wolff M, Eichner N, Reinhardt R, Wilson JB, Meister G, Grässer F (2015) Epstein-Barr virus EBER transcripts are processed to small RNA fragments that are associated with the lupus antigen (La) and affect miRNA-mediated regulation of distinct mRNA targets. PloS ONE (eingereicht, im Review).

* diese Autoren trugen gleichermaßen zur Publikation bei

9.4 Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Friedrich Grässer danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung des interessanten Themas. Mein besonderer Dank gilt seiner Diskussionsbereitschaft, Hilfestellung und Vertrauen hinsichtlich der eigenverantwortlichen Durchführung von Projekten.

Herrn Prof. Dr. Eckart Meese möchte ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Gunter Meister und Herrn Norbert Eichner danke ich für die Zusammenarbeit und ihre Diskussionsbereitschaft.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Herrn M. Sc. Hannes Borchardt und Frau Dipl. Biologin Linda Schlegel für ihre gute Mitarbeit in diesem Projekt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Henrik Groß und Dr. Martin Hart für ihre wertvollen Ratschläge, ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Freundschaft im und außerhalb des Labors, was den Alltag sehr angenehm gestaltete.

Ganz herzlich danken möchte ich Frau Ruth Nord, Frau Barbara Best und Frau Marlies Sauter für ihre tatkräftige Unterstützung, stete Hilfsbereitschaft und wertvollen Ratschläge im Laboralltag.

Meinen Freunden, insbesondere Frau Jennifer Detzler, danke ich für ihre stete Motivation und Ablenkung, gerade in schwierigen Zeiten.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und vor allem meinem Vater, der mich stets unterstützt hat, für seine Geduld und sein Mitfreuen und Mitleiden während des gesamten Studiums und der Promotion.

9.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Stefanie Alles
Geburtsdatum/-ort: 10. 01. 1986 in Völklingen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1992 – 1996 Besuch der Pater Eberschweiler Grundschule Püttlingen
1996 – 2005 Besuch des Albert Einstein Gymnasiums, ehemals Realgymnasium Völklingen
(Abschluss: allgemeine Hochschulreife)

Hochschulstudium

10/2005 – 12/2011 Studium des Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes
Abschluss: Diplom, Note: Mit Auszeichnung (1,1)
Hauptfach: Virologie und Immunologie
Nebenfächer: Zellbiologie, Molekularbiologie
Diplomarbeit: Vergleich zweier Sequenzierungen von Epstein-Barr Virus assoziierten NK/T-Zell-Lymphomen zur Erstellung eines microRNA Profils
Seit 01/2012 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotion am Institut für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes

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

Saarbrücken, März 2015

(Julia Alles)