

Analysen zur Funktion von Drosha und der durch das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV) kodierten microRNAs während der viralen Latenz



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) am
Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von
Thomas Christalla

Hamburg, Juli 2010

Für meine Eltern

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. T. Dobner
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. B. Fehse
Tag der Disputation: 27. August 2010

Hamburg, den 12. August 2010



A. Temming
Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Familie der Herpesviren.....	1
1.1.1	Replikation der Herpesviren.....	2
1.2	Das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV).....	4
1.2.1	Genomstruktur.....	5
1.2.2	Die Rolle von KSHV in neoplastischen Erkrankungen.....	6
1.2.3	Seroepidemiologie und Übertragungswege des KSHV.....	10
1.3	Molekulare Pathogenese KSHV-assoziiierter Erkrankungen.....	12
1.3.1	Latente Replikation.....	14
1.3.2	Lytische Replikation.....	18
1.4	MicroRNAs.....	23
1.4.1	Biogenese von miRNAs.....	24
1.4.2	Der Mikroprozessor.....	26
1.4.3	Das Dicer Protein.....	28
1.4.4	Mechanismen.....	30
1.4.5	KSHV-kodierte miRNAs.....	32
1.5	Aufgabenstellung.....	35
2	Material und Methoden	36
2.1	Vektoren.....	36
2.2	Methoden der eukaryotischen Zellkultur.....	38
2.2.1	Medien, Zusätze und Lösungen der Zellkultur.....	38
2.2.2	Eukaryotische Zelllinien.....	39
2.2.3	Zellkulturbedingungen.....	40
2.2.4	Initiation einer Kultur.....	40
2.2.5	Langzeitlagerung von Zellen.....	41
2.2.6	Transiente Transfektion von Zellen.....	41
2.2.7	Elektroporation von Zellen.....	43
2.3	Methoden der prokaryotischen Kultur.....	44
2.3.1	Bakterienstamm.....	44
2.3.2	Kulturmedien und Wachstumsbedingungen.....	44
2.3.3	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien.....	44
2.3.4	Transformation kompetenter Bakterienzellen.....	45
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	46
2.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	46
2.4.2	Restriktionsanalysen.....	46
2.4.3	Dephosphorylierung von DNA.....	47
2.4.4	Ligation.....	47

2.4.5	Amplifikation von DNA	47
2.4.6	DNA-Sequenzierung	48
2.4.7	Agarose-Gelelektrophorese	49
2.4.8	Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	50
2.4.9	Isolierung von RNA	50
2.4.10	Reverse Transkription (RT)	51
2.4.11	Semi-quantitative RT-PCR	51
2.4.12	Quantitative Echtzeit-RT-PCR	52
2.4.13	Small RNA Northern Blot	56
2.5	Biochemische und Zellbiologische Techniken	59
2.5.1	KSHV-Virusstock-Präparation	59
2.5.2	Infektion von Zellen mit KSHV	60
2.5.3	Durchflusszytometrie	60
2.5.4	Intrazelluläre FACS-Färbung	60
2.5.5	Immunfluoreszenz-Mikroskopie von adhärennten Zellen	61
2.5.6	Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Suspensionszellen	62
2.5.7	Konfokale Mikroskopie	62
2.5.8	Induktion und Nachweis von Apoptose	63
2.5.9	Herstellung von Zelllysaten	64
2.5.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	65
2.5.11	Immunoblotting	66
2.5.12	Antikörper	69
2.5.13	Herstellung von lentiviralen Vektorüberständen	70
2.5.14	Lentivirale Transduktion von Suspensionszellen	70
2.6	RNA-Interferenz	71
2.7	Genexpressions Array	72
3	Ergebnisse	75
3.1	Generierung von lentiviralen Überständen zur Suppression von Drosha und Dicer mittels shRNA	75
3.1.1	Lentivirale Transduktion von BCBL-1 Zellen	76
3.1.2	Stabile Herunterregulation der RNase III Enzyme Drosha und Dicer	77
3.2	Lentivirale Transduktion einer shRNA gegen Drosha induziert die lytische KSHV Replikation	80
3.2.1	Induktion der lytischen KSHV Replikation in BCBL-1 Zellen nach shRNA-vermittelter Suppression von Drosha	84
3.2.2	Northern Blot Analyse KSHV-kodierter miRNAs nach Suppression von Drosha und Dicer	90

3.2.3	Induktion der lytischen KSHV Replikation in AP3 Zellen nach shRNA-vermittelter Suppression von Drosha.....	92
3.3	Die shRNA-vermittelte Suppression von Dicer führt zu einer erhöhten Apoptoserate in BCBL-1 Zellen	94
3.4	Einfluss einer shRNA-vermittelten Suppression von Drosha auf das zelluläre Genexpressionsprofil in BCBL-1 Zellen	100
3.4.1	Verifizierung der differentiellen PLAU Expression in BCBL-1 Zellen mittels RT-qPCR.....	107
3.4.2	Computerbasierte Analyse von pri-miRNA-ähnlichen Sekundärstrukturen der PLAU und CCL3 mRNA.....	109
3.5	Einfluss einer lentiviralen Überexpression von PLAU und CCL3 auf die Induktion der lytischen KSHV Replikation.....	111
3.6	Differentielle Proteinexpression nach Suppression von Drosha in BCBL-1 Zellen	116
3.6.1	Verifizierung der differentiellen 14-3-3 zeta Expression in BCBL-1 Zellen.....	118
3.7	Identifizierung von zellulären Zieltranskripten KSHV-kodierter miRNAs	120
3.7.1	Generierung von Zellen mit einer stabilen Expression von KSHV-kodierten miRNAs	120
3.7.2	Analyse von KSHV-kodierten miRNAs auf das zelluläre Genexpressionsprofil in BJAB Zellen	124
3.7.3	Computergestützte Analyse einer potentiellen miRNA Bindung an die putativen Zieltranskripte	129
3.7.4	Proteomanalyse von BJAB Zellen mit einer stabilen Expression KSHV-kodierter miRNAs	131
4	Diskussion	135
4.1	Spezifische Suppression der RNase III Enzyme Dicer und Drosha durch shRNAs.....	136
4.2	Induktion der lytischen KSHV Reaktivierung in BCBL-1 und AP3 Zellen nach Suppression von Drosha.....	138
4.3	Identifizierung von zellulären Zieltranskripten KSHV-kodierter miRNAs	153
5	Zusammenfassung.....	162
6	Literaturverzeichnis	164
7	Veröffentlichungen.....	184
8	Danksagung.....	186
9	Abkürzungsverzeichnis	188

1 Einleitung

1.1 Die Familie der Herpesviren

Der Name der Herpesviren leitet sich vom griechischen Wort *herpein* „kriechen“ oder „schleichen“ ab und bezeichnet die bereits im Altertum beschriebene kriechende Ausbreitung des Hautausschlags bei einer Infektion mit dem Vertreter Herpes-simplex. Die Familie der Herpesviren ist in der Natur weit verbreitet und umfasst etwa 100 Spezies, die in der Lage sind, neben dem Menschen auch viele Wirbeltierarten zu infizieren. Die verschiedenen Vertreter dieser Virusfamilie sind trotz der stark variierenden Symptome durch eine einheitliche Partikelmorphologie und bestimmte biologische Eigenschaften definiert. Die pleomorphen Viruspartikel besitzen einen variablen Durchmesser von 150-200 nm und sind von einer der inneren Kernmembran abgeleiteten Lipidhülle umgeben, die zur Verankerung von viralen und zellulären Glykoproteinen dient. Das ikosaedrische Nucleokapsid (~100 nm) im Inneren des Virions, mit 150 hexavalenten und 12 pentavalenten Kapsomeren, umgibt das Virus-Core, eine fibrilläre Proteinmatrix, die vom viralen Genom spiralförmig umgeben ist. Dieses besteht aus einer doppelsträngigen, linearen DNA mit einer Länge von 120-220 Kilobasenpaaren und einem GC-Gehalt von 32-75 %. Zwischen dem Kapsid und der Lipidhülle befindet sich das Tegument, eine unstrukturierte Proteinmatrix, die verschiedene regulatorisch aktive Proteine enthält.

Ein biologisches Charakteristikum der Herpesviren ist der in zwei Phasen geteilte Lebenszyklus, der unter anderem abhängig vom Zelltyp und Differenzierungsstadium der Wirtszelle getrennt oder nacheinander durchlaufen werden kann. Nach der Erstinfektion kann eine persistierende latente Infektionsform entwickelt werden, in der die Produktion von infektiösen Partikeln unterbunden ist. Während dieser Phase verbleibt das virale Genom episomal, das heißt als extrachromosomales zirkuläres DNA-Molekül im Kernplasma und wird als quasi-zelluläre DNA an Chromatin gebunden mit dem Zellkern der Wirtszelle vermehrt. Eine Minimalexpression von bestimmten latenten viralen Proteinen sorgt in dieser Phase des Infektionszyklus für die Aufrechterhaltung

der viralen Latenz. Die Produktion und Freisetzung von reifen, infektiösen Viruspartikeln erfolgt durch eine Aktivierung des lytischen Replikationszyklus. Diese Aktivierung ist nur teilweise verstanden und kann beispielsweise durch eine Immunsuppression des Wirtes ausgelöst werden.

Bis heute lassen sich acht humanpathogene Herpesviren unterscheiden, die auch als humane Herpesviren (HHV) bezeichnet und von 1-8 nummeriert werden. Eine Einteilung in drei Unterfamilien ist nach biologischen Eigenschaften wie Pathogenität, Gewebe- und Zelltropismus sowie Persistenz und Neigung zur lytischen Infektion möglich. Zu den α -Herpesviren zählen das Herpes-simplex-Virus 1 und 2 (HSV-1, HSV-2) sowie das Varizella-Zoster-Virus (VZV, HHV-3). Sie wachsen relativ schnell mit kurzen Replikationszyklen *in vitro* in einer Vielfalt von Gewebearten, welche sie effizient zerstören. Sie persistieren *in vivo* in den Nervenzellen der Ganglien im Zentralnervensystem. Ein weitaus engeres Spektrum an infizierbaren Zellen mit einem relativ langen Vermehrungszyklus *in vitro* zeigen die β -Herpesviren. Zu dieser Unterfamilie gehören das Cytomegalievirus (CMV, HHV-5) und das Roseolovirus (HHV-6 und HHV-7). Für γ -Herpesviren ist das verhältnismäßig enge Wirtszellspektrum charakteristisch. Sie zeigen *in vitro* sowie *in vivo* ein lymphotropes Verhalten und können T- oder B-Lymphozyten latent infizieren. Unter das Genus *Lymphocryptovirus* fällt das Epstein-Barr-Virus (EBV, HHV-4) und unter das Genus *Rhadinovirus* das Kaposi Sarkoma-assoziierte Herpesvirus (KSHV, HHV-8), wobei letzteres in der Lage ist auch Epithel-, Endothel- oder Fibroblastenzellen sowie Makrophagen und Keratinozyten *in vitro* zu infizieren.

1.1.1 Replikation der Herpesviren

Nach der Infektion der Wirtszellen kann das Virus entweder den Weg in die Latenz oder in den lytischen Zyklus beschreiten, der zu einer kaskadenartig organisierten Synthese zahlreicher viraler Proteine führt und in der Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln endet.

Die Infektion der Wirtszelle beginnt mit der spezifischen Bindung an bestimmte Rezeptormoleküle auf der Wirtszellmembran, vermittelt durch die in der Lipidhülle verankerten Glykoproteine. Hauptsächlich erkannt wird Heparansulfat, ein

ubiquitär auf der Zelloberfläche präsenten Proteoglykan. Nach erfolgter Adsorption kommt es zur Fusion der Virushülle mit der Zellmembran und daraus resultierender Freisetzung des Nukleokapsids mit dem umgebenden Tegument in das Zytoplasma der Wirtszelle. Hier lagern sich die Kapside an Mikrotubuli an und werden entlang diesen zu den Kernporen transportiert, durch die das virale Genom in das Nukleoplasma, dem Ort der Transkription und Replikation, entlassen wird. Das virale Genom zirkularisiert und liegt damit als Episom im Kernplasma vor, wo die kaskadenartig organisierte Genexpression eingeleitet wird. Durch die verstärkende Wirkung von Transaktivatoren im Zusammenspiel mit spezifischen Zellfaktoren kommt es zur Transkription der sehr frühen Gene (immediate early).

Es entstehen gecappte, teilweise gespleißte und polyadenylierte mRNAs. Die nach Translation im Cytoplasma gebildeten regulatorischen sehr frühen (immediate early) Proteine dienen nach ihrem Transport in den Zellkern der Aktivierung der frühen Gene (early genes) auf transkriptioneller Ebene, deren Produkte wie z.B. die DNA-Polymerase, Primase-Helikase, Topoisomerase und DNA-Bindungsproteine für die Replikation des Virusgenoms essentiell sind. Die DNA-Synthese erfolgt nach dem Prinzip des rollenden Rings (rolling circle), der in der Bildung eines DNA-Doppelstrangs resultiert und mehrere Einheiten des viralen Genoms in konkatermerer Anordnung enthält. Als Ausgangspunkt für die DNA-Synthese dienen als Ursprung des lytischen Replikationszyklus bezeichnete Sequenzelemente (origin of lytic replication, Ori_{Lyt}) im viralen Genom. Es binden hier virale Ori_{Lyt}-bindende Proteine, um eine Anlagerung des DNA-Polymerase/Helicase/Primase-Komplexes zu ermöglichen, der einen der DNA-Stränge schneidet. Das auf diese Weise entstehende freie 3'-Ende dient als Primer für die Polymerisationsreaktion. Unter Verwendung des geschlossenen DNA-Stranges als Matrize werden die Nukleotide kontinuierlich ansynthetisiert, wobei das 5'-Ende fortlaufend vom Matrizenstrang gelöst wird. Auf diesem Strang wird mit Hilfe von kurzen RNA-Primern und Okazaki-Fragmenten der Doppelstrang ergänzt.

Mit der DNA-Synthese beginnt zeitgleich die Expression der späten Gene (late genes), die vor allem für Glykoproteine zur Bildung und zum Zusammenbau von

Kapsid, Tegument und Lipidhülle kodieren. Die infektiösen Viruspartikel werden schließlich durch Lyse der infizierten Zellen entlassen.

1.2 Das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV)

Im Jahre 1872 beschrieb der ungarische Dermatologe Moritz Kaposi erstmals ein Phänomen, das er als idiopathisches multiples Pigmentsarkom bezeichnete und das zwanzig Jahre später nach ihm als das Kaposi Sarkom (KS) benannt wurde. Es handelte sich dabei um rötlich bis bläulich gefärbte Läsionen, die zuerst an Händen und Füßen und später an den Extremitäten aufwärts bis zum Rumpf und Kopf auftraten. Seinen Aufzeichnungen zu Folge endete diese Krankheit innerhalb von 2-3 Jahren nach Diagnose der ersten Symptome tödlich. Lange Zeit nach seiner Entdeckung blieb diese sehr seltene Form des klassischen KS jedoch wenig erforscht. Im Zuge der seit Anfang der 80iger Jahre bei jungen HIV-infizierten homosexuellen Männern gehäuft auftretenden epidemischen Variante des KS (Friedman-Kein, 1981) wurde auf eine infektiöse Ursache geschlossen. Bis dahin wurden zwei klinische Formen unterschieden. Zum einen das klassische KS sowie das in Afrika südlich der Sahara vorkommende endemische KS. Unter Verwendung gentechnischer Methoden wie Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und subtraktiven Hybridisierungstechniken (Representational Difference Analysis, RDA) war es Y. Chang und P.S. Moore im Jahre 1994 gelungen zwei herpesvirusähnliche DNA Sequenzen aus KS-Hautläsionen von HIV-positiven Patienten zu isolieren, die eine Homologie zu bereits bekannten γ_2 -Herpesviren zeigten. Es handelte sich hierbei um das Herpesvirus Saimiri (HVS), welches mit T-Zell-Lymphomen assoziiert ist und dessen natürlicher Wirt Totenkopffaffen (Squirrel monkey) darstellen, sowie um das Epstein-Barr-Virus (EBV), den Erreger des Burkitt-Lymphoms beim Menschen (Chang et al., 1994, 1996a). Wie sich später zeigte, waren diese Sequenzen Teile eines kompletten viralen Genoms (Russo et al., 1996), welche in Endothel- und Spindelzellen von KS-Läsionen nachgewiesen werden konnten (Boshoff et al., 1995). Dies war die Entdeckung eines neuen Herpesvirus, das als Kaposi Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSHV) oder humanes Herpesvirus 8 (HHV-8) bezeichnet wird. In nachfolgenden

Untersuchungen war dieses Virus in allen Formen von KS nachweisbar und wurde als das ursächliche Agens mit kausalem Zusammenhang zwischen der Infektion mit KSHV und der Entstehung von KS definiert (Decker et al., 1996; Boshoff und Weiss, 1998). Aufgrund der phylogenetischen Sequenzähnlichkeiten mit dem Herpesvirus Saimiri (HSV) und dem Rhesus Rhadinovirus (RRV) aus Rhesus Makaken (*Macaca mulatta*) (Derosiers et al., 1997) wird das KSHV innerhalb der γ -Herpesviren in das Genus der Rhadinoviren (γ_2 -Herpesviren) eingeordnet (Russo et al., 1996). Bis heute stellt das KSHV das einzige humane Pathogen dieses Genus dar.

1.2.1 Genomstruktur

Der strukturelle Aufbau von KSHV entspricht dem anderer Vertreter aus der Familie der Herpesviren. Das Genom besteht aus einer einzigen langen Region (long unique region, LUR) von ungefähr 140 kb, die für alle identifizierten KSHV Transkripte kodiert und über 90 identifizierte offene Leserahmen (open reading frame, ORF) beinhaltet. Diese Region wird von einer unterschiedlichen Anzahl von Wiederholungseinheiten (terminal repeats, TR) flankiert, welche aus multiplen wiederholten Abschnitten mit einer Länge von 801 bp pro Untereinheit bestehen und einen hohen GC-Gehalt von 85 % aufweisen (Russo et al., 1996). Das virale Genom kann in Anlehnung an die Nomenklatur des Herpesvirus Saimiri, das über große Bereiche zum KSHV homolog ist, in hoch konservierte Bereiche eingeteilt werden, die von einzelnen einmalig vorkommenden Genomregionen unterbrochen werden. Diese spezifisch von KSHV kodierten Gene werden in der Nomenklatur mit dem Präfix K gekennzeichnet und chronologisch nummeriert (K1-K15). Sequenzanalysen der zahlreichen ORFs ermöglichten darüber hinaus die Identifikation von Genomregionen mit Homologie zu zellulären Genen, die an der Modulation von zellulären Signalkaskaden, am Cytokin regulierten Zellwachstum, der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt sind (Ganem et al., 2007; Neipel et al., 1997; Russo et al., 1996).

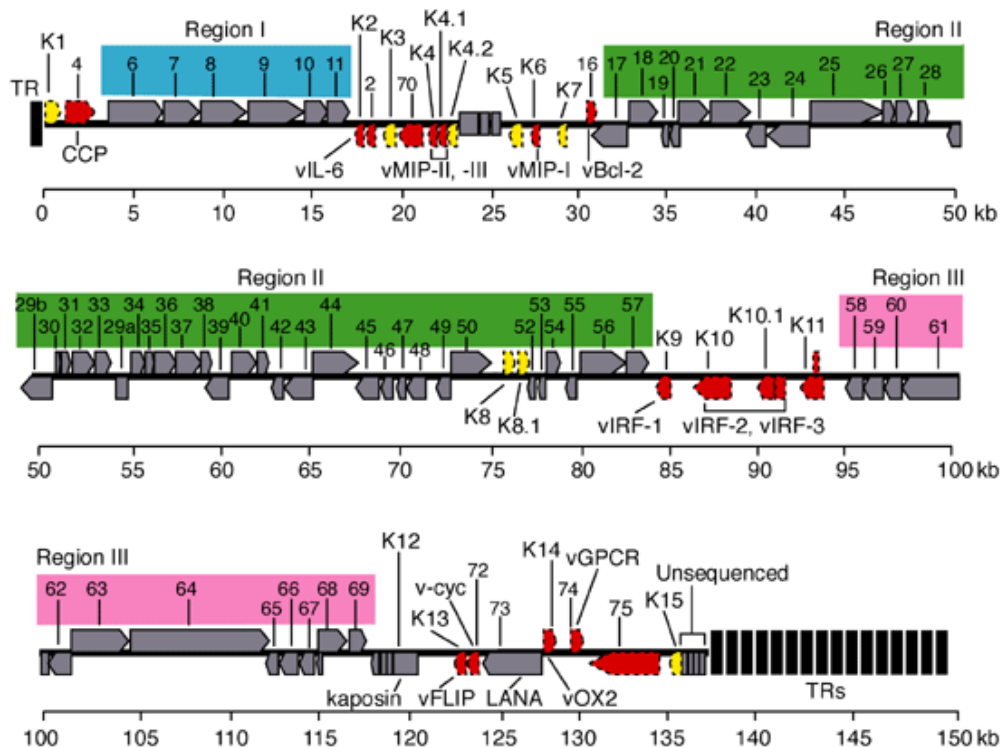


Abbildung 1: Schematische Darstellung des linearen KSHV Genoms. Das aus einer einzigen langen Region von 140 kb bestehende Genom ist von invertierten Einheiten wiederholter Sequenzen (terminal repeats, TR) flankiert und kodiert für über 90 offene Leserahmen (open reading frames, ORF). Die innerhalb der Familie der Herpesviren hoch konservierten Genom-Regionen sind in den von I-III durchnummerierten farbigen Kästchen repräsentiert (blau, grün und rosa). Dazu erfolgt eine Nummerierung der Leserahmen in Genomregionen ohne Homologie in der Reihenfolge ihrer Anordnung. Sie sind durch den vorgestellten Buchstaben K für KSHV gekennzeichnet. Einige der dazwischen liegenden Gene sind einmalig für KSHV und beinhalten die zu zellulären Genen homologen KSHV-Gene (rot mit schwarzem gestricheltem Rand) und jene ohne bekannte Homologie (gelb mit schwarzem gestricheltem Rand) (Foreman, 2001).

1.2.2 Die Rolle von KSHV in neoplastischen Erkrankungen

Das KSHV wird in allen Formen des Kaposi Sarkoms (KS) sowie in einigen lymphoproliferativen Erkrankungen identifiziert, aber auch mit großen regionalen Unterschieden bei gesunden Individuen festgestellt. Derzeit lassen sich vier unterschiedliche klinische Formen des KS als eine maligne von den Gefäßendothelien ausgehende Systemerkrankung unterscheiden.

Kaposi-Sarkom (KS)

Das klassische KS ist ursprünglich als eine sehr seltene, langsam fortschreitende Tumorerkrankung der Haut beschrieben worden, welche in erster Linie bei älteren immunkompetenten Männern mit mediterraner Abstammung auftritt. Der klinische Verlauf dieser Erkrankung ist aufgrund des hohen Erkrankungsalters und der langsamen Tumorprogression in den wenigsten Fällen lebensbedrohlich.

Das endemische KS ist eine aggressivere Variante des KS, die bei HIV-negativen Individuen eine geographische Prävalenz, vor allem in äquatorialen Bereichen von Afrika, zeigt. Betroffen von dieser Form sind nicht nur Männer, sondern auch Frauen und Kinder.

Auch das bei iatrogener Immunsuppression entstehende sowie das epidemische HIV-assoziierte KS liegen einer Infektion mit dem sexuell und durch Speichel übertragbaren KSHV zu Grunde. Die Form des iatrogenen KS wird mit geringer Inzidenz bei immunsupprimierten Patienten beobachtet, meist in Zusammenhang mit Organtransplantationen. Ein geschwächter Immunstatus scheint hierbei für das Auftreten von KS ein wichtiger Kofaktor zu sein, da bei Aufhebung der Immunsuppression eine spontane Rückbildung beobachtet werden kann (Brooks et al., 1986).

Das HIV-assoziierte KS stellt bis heute bei an HIV-erkrankten Individuen die am häufigsten auftretende Tumorerkrankung dar, welche darüber hinaus mit dem aggressivsten Krankheitsverlauf von KS verbunden ist (Arora et al., 2007). Der erste Ort der Manifestation ist überwiegend die Haut, dabei sind häufig die Mundschleimhaut und die Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes betroffen. Der schwere und rasch fortschreitende Krankheitsverlauf scheint in direktem Zusammenhang mit der nach HIV-Infektion bedingten Immundefizienz zu stehen.

Neben den klinischen Unterschieden ist das histologische Erscheinungsbild der verschiedenen KS-Erkrankungen nahezu identisch und mit charakteristischen Veränderungen, welche unterschiedliche Stadien der Tumorentwicklung reflektieren, verbunden. Eine inflammatorische Infiltration von mononukleären Immunzellen, die Formation von unregelmäßigen endothelzellausgekleideten Gefäßspalten sowie extravasale Erythrozyten sind kennzeichnend für ein frühes

Erkrankungsstadium. Im Spätstadium sind die KS-Läsionen durch spindel-förmige Zellen typisiert. Diese von Endothelzellen abgeleiteten Spindelzellen stellen die neoplastischen Zellen des KS dar. Anders als herkömmliche humane Tumore mit monoklonalem Ursprung gehen KS-Läsionen polyklonal mit multifokalen Auswüchsen aus dem vaskulären und lymphatischen Endothel hervor (Rabkin et al., 1997; Dupin et al., 1999). Ein Großteil dieser Zellen trägt das KSHV in seiner latenten Infektionsform, welche durch die Expression von vier viralen Latenz-assoziierten Genen charakterisiert sind: LANA-1/ORF73, v-Cyclin/ ORF72, vFLIP/K13 und Kaposin/K12. Innerhalb dieser Region kodiert das KSHV für einen Cluster aus 12 microRNAs (Pfeffer et al., 2005; Cai et al., 2005; Samols et al., 2005; Grundhoff et al., 2006). Die Genprodukte dieser Latenz-assoziierten Region, die regulierend in die p53-, Rb- und β -Catenin vermittelten Signalwege eingreifen können, sind unter anderem dazu befähigt, das Zellwachstum zu fördern und das Überleben von Zellen auszuweiten (Cesarman et al., 1996; Chang et al., 1996; Li et al., 1997; Friborg et al., 1999, Rivas et al., 2001; Fujimuro et al., 2003). Diese Eigenschaften allein sind allerdings nicht ausreichend, um das tumorigene Potential von KS *in vivo* aufrechtzuerhalten. In einigen wenigen Zellen kann darüber hinaus eine lytische Replikation beobachtet werden (Katano et al., 2000; Staskus et al., 1997; Orenstein et al., 1997; Grundhoff und Ganem, 2004). Die Annahme, dass die lytische Infektionsform zur Entstehung von KS beiträgt, wird durch die Tatsache gestützt, dass einige Genprodukte fördernd auf die Expression von zellulären Zytokinen sowie Proteinen wirken, die an dem Prozess der Angiogenese beteiligt sind. Ein genau untersuchtes Beispiel stellt der virale G-Protein gekoppelte Rezeptor (vGPCR) dar, welcher Liganden-unabhängig konstitutiv aktiv ist. Er ist das virale Homolog zum zellulären Interleukin 8 (IL-8) Rezeptor (Russo et al., 1996) und ist durch seine induzierende Wirkung auf den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) maßgeblich an der Angiogenese beteiligt (Bais et al., 1998). Zudem konnte in vGPCR exprimierenden transgenen Mäusen die Entwicklung von KS-ähnlichen Läsionen beobachtet werden (Yang et al., 2000).

Neben dem KS ist das KSHV an zwei weiteren lymphoproliferativen B-Zell-Erkrankungen kausal beteiligt. Es handelt sich dabei um die Plasmazellvariation

der Multizentrischen Castleman Krankheit (Multicentric Castleman`s disease, MCD) und um das primäre Effusionslymphom (primary effusion lymphoma, PEL) (Soulier et al., 1995; Cesarman et al., 1995).

Primäres Effusionslymphom

Das primäre Effusionslymphom (PEL) ist eine selten auftretende Lymphom-erkrankung mit monoklonalem Ursprung, die überwiegend in AIDS Patienten beobachtet werden kann (Cesarman, 2002). Namensgebend für diese Erkrankung ist der Erguss der Tumorzellen in die Körperhöhlen, in Abwesenheit einer sichtbaren Tumormasse (Carbone et al., 1997; Cesarman, 2002). Das KSHV kann ausnahmslos in diesen Tumorzellen nachgewiesen werden und scheint damit eine essentielle Rolle in der Pathogenese von PEL zu spielen. Die überwiegende Mehrheit der Zellen zeigt ein latentes Expressionsprofil, so dass die Latenz-assoziierten Gene LANA-1, v-Cyclin, vFLIP, Kaposin sowie das B-Zell spezifische latente Genprodukt LANA-2/vIRF-3/K10.5 detektiert werden können (Katano et al., 2000; Parravicini et al., 2000; Rivas et al., 2001). Die durch KSHV kodierten microRNAs konnten ebenfalls in PEL-Zellen nachgewiesen werden (Pfeffer et al., 2005; Cai et al., 2005; Samols et al., 2005; Grundhoff et al., 2006; Umbach et al., 2010). Die Expression von lytischen Genen findet nur in einigen wenigen Zellen statt. Das virale Interleukin 6 (vIL-6), mit Homologie zum zellulären IL-6 wird in 2-5% der Tumorzellen exprimiert und virale lytische Proteine wie das K8/kbZIP oder der virale DNA-Polymerase Prozessierungs-faktor/ORF59 sowie die viralen Interferon-regulierenden Faktoren (vIRF) vIRF-1/K9, vIRF-4/K10 und vIRF-2/K11 sind in weniger als 1% der Tumorzellen nachweisbar (Katano et al., 2000; Parravicini et al., 2000).

Multizentrische Castleman Krankheit

Die Multizentrische Castleman Krankheit (MCD) ist ebenso wie das PEL eine seltene lymphoproliferative Erkrankung und vor allem bei HIV-positiven Individuen zu beobachten. Die erstmals 1956 von dem US-Pathologen Benjamin Castleman beschriebene lokalisierte Hyperplasie des lymphatischen Gewebes (LCD) ist von der KSHV-assoziierten multizentrischen Castleman Krankheit (MCD) mit malignem Charakter zu unterscheiden. Die Pathogenese

von MCD wird oftmals von einer KSHV Infektion begleitet, ist jedoch nicht ausnahmslos mit dieser verbunden (Soulier et al., 1995). In 40-50% der Fälle kann KSHV in HIV-negativen an MCD erkrankten Individuen und in nahezu allen HIV-positiven Individuen mit MCD detektiert werden (Suda et al., 2001). Das KSHV zeigt vergleichend zum PEL dabei ein weniger eingeschränktes Genexpressionsmuster. Neben den latenten Genen können in einer Vielzahl von Zellen lytische Genprodukte nachgewiesen werden (Katano et al., 2000; Parravicini et al., 2000). Zur Expression der lytischen Gene von K9, K10, K8 und ORF59 kann auch die Expression des vIL-6 in den Tumorzellen detektiert werden (Katano et al., 2000; Parravicini et al., 2000), dessen Produktion zur Pathogenese von MCD beitragen könnte (Waterston und Bower, 2004). Das vIL-6 ist ein frühes lytisches Antigen, welches strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zum zellulären Interleukin 6 (IL-6) aufweist und über die gp130 Untereinheit des IL-6 Rezeptorkomplexes stimulierend auf die zellulären IL-6 aktivierten Signalwege wirken kann (Osborne et al., 1999; Molden et al., 1997; Li et al., 2001; Boulanger et al., 2004). Dies kann *in vitro* zu einer Erhöhung der Proliferation von B-Lymphozyten führen.

1.2.3 Seroepidemiologie und Übertragungswege des KSHV

Um den Verbreitungsrad von KSHV zu untersuchen, wurden diagnostische Testsysteme etabliert, die einen Nachweis von Antikörpern gegen KSHV Antigene zulassen. Die ersten serologischen Untersuchungen basierten auf dem Nachweis des Latenz-assoziierten nukleären Antigens 1 (LANA-1) sowie auf ein in der lytischen Phase exprimiertes Strukturprotein (vp19), das vom offenen Leserahmen 65 (ORF65) kodiert wird (Gao et al., 1996; Kedes et al. 1996; Simpson et al., 1996; Goudsmit et al., 2000). Weiterführende Untersuchungen konnten das rekombinante Glykoprotein gp35-37 als diagnostisches Antigen mit hoher Sensitivität und Spezifität identifiziert (Raab et al., 1998). Dieses wird vom offenen Leserahmen K8.1 während des lytischen Replikationszyklus exprimiert und ist in der Lipidhülle des Virions verankert. Auf Grundlage dessen wurden enzymgekoppelte Immunabsorptionstests (ELISA) entwickelt und verbessert, die mittels rekombinanten Proteinen oder Peptiden

zum Nachweis von KSHV eingesetzt werden (Rabb et al., 1998; Mbisa et al., 2010).

Gegenwärtige epidemiologische Daten zeigen, dass KSHV selten in der Bevölkerung der USA sowie West-, Nord- und Mitteleuropa vorkommt. Unter Berücksichtigung von regionalen Unterschieden konnten durchschnittlich bei etwa 3-10% der untersuchten Personen virusspezifische Antikörper gegen das KSHV LANA-1 oder gegen eines der rekombinanten Proteine nachgewiesen werden (Gao et al., 1996; Simpson et al., 1996). Eine ähnliche Situation gilt für Südamerika und Asien. Deutlich höher ist die Seroprävalenz im Mittelmeerraum vor allem in Süd-Italien, mit Sizilien und Sardinien, aber auch in Griechenland und liegt in Abhängigkeit von regionalen Unterschieden zwischen 7-35% (Calabro et al., 1998; Cattani et al., 2003; Serraino et al., 2006; Whitgy et al., 1998; Stratigos et al., 2007). Mit Ausbruch der erworbenen Immunschwächekrankheit AIDS entwickelte KS auf dem afrikanischen Kontinent epidemische Ausmaße. Eine hohe Durchseuchung der Bevölkerung ist hier besonders südlich der Sahara von 40-50% (Gao et al., 1996; Newton et al., 2003) und in Süd-Afrika von 20-30% festzustellen (Malope et al., 2007; Sitas et al., 1999). Somit ist AIDS KS südlich der Sahara die am häufigsten auftretende Tumorerkrankung in Afrika (Hansen et al., 2007), wobei sich die Wahrscheinlichkeit bei Kindern an KS zu erkranken, beispielsweise in Uganda, um das 40-fache erhöht hat (Ziegler und Katongole-Mbidde, 1996; Dourmishev et al., 2003). Diese Region zeigt auch ein vermehrtes Auftreten der endemischen Form von KS.

Ein erhöhtes Risiko für die Infektion mit dem KSHV haben homosexuelle Männer mit einer Seroprävalenz von 20-40%, auch in den USA und Mitteleuropa. Eine Koinfektion mit HIV führte hierbei in 50% der Fälle in einem Zeitraum von fünf bis zehn Jahren zu einer Entwicklung von KS (Renwick et al., 1998; Jacobsen et al., 2000). Obwohl die Inzidenz von KS durch die Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) zur Behandlung von HIV-positiven Individuen (Bower et al., 2006) stark verringert werden konnte, stellt KS nach wie vor die häufigste Tumorerkrankung bei Kindern in Afrika sowie unter Minderheiten und in Entwicklungsländern dar (Martin und Gutkind, 2008). In immunkompetenten Individuen ist demgegenüber eine Erkrankung an KS nur

selten zu beobachten, was die Bedeutung der HIV-Infektion als Kofaktor in der Pathogenese von KS untermauert.

Die Übertragung von KSHV in nicht endemischen Gebieten findet überwiegend im Erwachsenenalter statt und ist unter homosexuellen Männern eindeutig mit einer sexuellen Übertragung verbunden (Dukers et al., 2000; Casper et al., 2002). Verschiedene Risikofaktoren und bestimmte sexuelle Praktiken wie passiver Analverkehr (Melbye und Cook, 1982) sowie häufig wechselnde Sexualpartner (Martin et al., 1998) scheinen in diesem Zusammenhang begünstigend auf die Übertragung zu wirken. Uneinigkeit bezüglich der sexuellen Übertragung unter Heterosexuellen herrscht bis heute. Aufgrund der Tatsache, dass KSHV in Speichel und nasalen Sekreten von infizierten Individuen nachgewiesen werden kann, scheint ein Übertragungsweg über die Speichelflüssigkeit, wie für andere Herpesviren einschließlich EBV ebenso geltend, der am häufigsten auftretende Übertragungsweg zu sein (Koelle et al., 1997; Blackbourn et al., 1998; Ganem, 2006; Pauk et al., 2000). In den endemischen Gebieten von KS, vor allem in Afrika aber auch in Italien, lassen die ebenso bei Kindern auftretenden ähnlich hohen Seroprävalenzen, wie sie bei Erwachsenen beobachtet werden können, auf eine nicht-sexuelle Übertragung des KSHV schließen. Hier findet die Übertragung vermutlich horizontal von der Mutter auf das Kind statt (Mayama et al., 1998; Andreoni et al., 1999). Eine Übertragung von KSHV im Kontext von Organtransplantationen konnte ebenfalls in einigen seltenen Fällen nachgewiesen werden (Luppi et al., 2000; Nocera et al., 1998).

1.3 Molekulare Pathogenese KSHV-assoziiertes Erkrankungen

Das KSHV exprimiert sowohl während der Latenz als auch während seiner lytischen Infektionsform Gene, die unter anderem an der Modulation von zellulären Signalkaskaden, am Cytokin regulierten Zellwachstum, an der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt sind und somit maßgeblich zur Pathogenese KSHV-assoziiertes Erkrankungen beitragen (Dourmishev et al., 2003). Die meisten Informationen über die latente Infektionsform des KSHV auf molekularer Ebene beruhen nicht auf Analysen von KS Tumoren sondern

vielmehr auf Analysen der viralen Genexpression von kultivierten B-Zelllinien des primären Effusionslymphoms (PEL), wie beispielsweise der Zelllinie BCBL-1 (body-cavity-based lymphoma). In diesen Zellen weist das KSHV eine persistierende virale Infektion auf und exprimiert in nahezu allen Zellen latente Transkripte und Proteine. Die Klassifizierung eines viralen Gens als latent oder lytisch allein durch Analysen der RNA Expression einer PEL-Zellkultur gestaltete sich schwierig, da ein charakteristischer kleiner Anteil der Zellen eine spontane lytische Replikation aufzeigt (Zhong et al., 1996; Renne et al., 1996). Um dieses Problem zu umgehen wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt und zudem die überwiegende Mehrheit der anhand von PEL Zellen identifizierten Transkripte in KS Tumoren nachgewiesen.

Die Erforschung des kompletten Lebenszyklus des KSHV, die Phasen Eintritt, Latenz, produktive Replikation und Freisetzung einschließend, wurde demgegenüber lange Zeit durch das Fehlen eines effizienten und permissiven lytischen Zellkulturmodells erschwert. *In vitro* kann das KSHV verschiedene Zelltypen einschließlich einer Vielzahl von humanen Zellen wie epitheliale und endotheliale Zelllinien sowie Fibroblasten und primäre Keratinocyten infizieren (Vieira et al., 2001, 2004; Bechtel et al., 2003). Die meisten Zelllinien exprimieren allerdings nur Gene der Latenz oder zeigen eine merkliche Instabilität des latenten Phänotyps durch den Verlust des viralen Episoms während der Zellteilung (Grundhoff und Ganem, 2004). Dies trifft *in vitro* ebenso auf primäre Kulturen zu, die aus KS Gewebe gewonnen wurden.

Seit der Klonierung des kompletten KSHV Genoms in das künstliche Bakterienchromosom (bacterial artificial chromosome, BAC) (Zhou et al., 2002) ist es jedoch möglich, anhand gezielter Stilllegung von Genen sowie mittels Virus-Mutanten die Beteiligung bestimmter viraler Gene in der aktiven Replikation zu untersuchen. Die erst unlängst geglückte KSHV Infektion von aktivierten B-Zellen aus peripheren Blutzellen sowie aus Tonsillen über den DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin) Rezeptor könnte in diesem Zusammenhang ein viel versprechendes Zellkulturmodell darstellen und zur Aufklärung verschiedener biologischer Fragestellungen des KSHV beitragen (Rappocciolo et al., 2008). In diesen Zellen konnte die Expression von latenten und lytischen Proteinen sowie eine

produktive KSHV Replikation mit Produktion von infektiösen Viruspartikeln beobachtet werden (Rappocciolo et al., 2008).

Ein zufrieden stellendes Tiermodell, um die Pathogenese KSHV-assoziiierter Erkrankungen zu untersuchen, gibt es bisher nicht. Das murine γ -Herpesvirus 68 (MHV-68), welches in die Unterfamilie der γ -Herpesviren eingeordnet wird und dort zusammen mit dem KSHV unter das Genus Rhadinovirus fällt (Blaskovic et al., 1980), kann als Tiermodell genutzt werden. Vor kurzem konnten zudem Vorläuferendothelzellen aus Mäuseknochenmark erfolgreich mit einem bakteriellen künstlichen KSHV-Chromosom transfiziert werden (Mutlu et al., 2007). Wurden diese Zellen in Mäuse injiziert, erkrankten diese an einer KS-ähnlichen proliferativen Erkrankung, die sich durch das Vorliegen von KSHV-infizierten Spindelzellen und angiogenetischen Markern auszeichnete (Mutlu et al., 2007). Inwieweit diese Tiermodelle zur Erforschung der Biologie von KSHV beitragen können, bleibt noch abzuwarten.

Die nachfolgenden Kapitel werden einige KSHV Proteine und ihre Beteiligung an der latenten und lytischen Infektion, der Angiogenese und der Apoptose näher beleuchten.

1.3.1 Latente Replikation

Wie bei allen Herpesviren persistiert das KSHV Genom als kovalent geschlossenes zirkuläres Episom im Zellkern der Wirtszelle. Während dieser latenten Infektionsform findet keine die Produktion von Virionen statt und eine auf nur wenige Proteine beschränkte Expression zur Aufrechterhaltung der Latenz ist nachzuweisen (Dittmer et al., 1998; Kedes et al., 1997).

Bisher konnten fünf virale Proteine und ein viraler microRNA Cluster aus Untersuchungen mit diesen Zelllinien identifiziert werden. Es handelt sich dabei um das Latenz-assoziierte nukleäre Antigen 1 (LANA-1/ORF73), um das virale Homolog eines zellulären D-Typ Cyclins (v-Cyclin/ORF72), um das Homolog des zellulären Inhibitors des FLICE (Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme) Apoptose Komplexes (viral FLICE inhibitory protein, vFLIP/ORF71,K13) sowie um eine Gruppe kleiner membranassoziierter Proteine namens Kaposin A, B und C (ORF K12). Darüber hinaus wurde in

infizierten B-Zellen *in vivo* und *in vitro* die Expression eines zum Interferon Regulatorfaktor (IRF) homologen Proteins namens LANA-2 (vIRF3/K10.5) beschrieben.

Die Proteine LANA-1, v-Cyclin und v-Flip werden durch einen konstitutiv aktiven Promotor von einer 6 kb großen tricistronischen mRNA (LT_c1, latent transcript) kodiert (siehe Abbildung 3). Das v-Flip sowie das v-Cyclin können zudem von einer gespleißten 2 kb großen bicistronischen mRNA (LT_c2) transkribiert werden (Dittmer et al., 1998), wobei die Translation des v-Flips von einer internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) in der 3'-Region des v-Cyclins reguliert wird (Grundhoff und Ganem, 2001; Low et al., 2001). Innerhalb dieser Latenz-assoziierten Region kodiert KSHV für 12 microRNAs (miRNA) (KSHV miR-K12-1-12), die konstitutiv während der latenten Phase des viralen Lebenszyklus exprimiert werden (Pfeffer et al., 2005; Cai et al., 2005; Samols et al., 2005; Grundhoff et al., 2006). Dabei befinden sich 10 der von KSHV kodierten miRNAs (miR-K12-1-9, einschließlich miR-K12-11) in einem Intron, während die miR-K12-10 im ORF K12, welcher für Kaposin kodiert, lokalisiert ist (LT_c3 und LT_d). Die KSHV miR-K12-12 liegt innerhalb der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) dieses Transkripts (Grundhoff und Ganem, 2006).

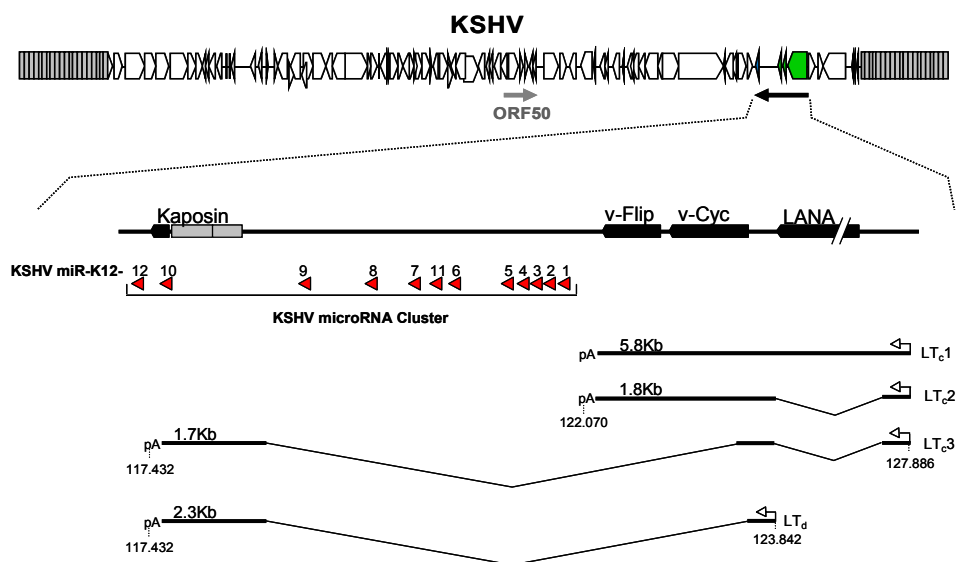


Abbildung 2: Transkription und Spleißmuster der Latenz-assoziierten Region des KSHV. Die KSHV Latenz-assoziierte Region kodiert für vier virale Proteine (schwarze Boxen) sowie für 12 miRNAs (rote Pfeile). Die Proteine LANA-1, v-Cyclin und v-Flip werden von einer tri- bzw. bicistronischen, polyadenylierten mRNA kodiert (Latente Transkripte LT_c1 und LT_c2). Das

Überlesen des relativ schwachen Polyadenylierungssignals führt sowohl zur Expression der viralen miRNAs als auch zur Expression von Kaposin (LT_{c3} und LT_d). Die wichtigsten Latenz-assoziierten Transkripte sind repräsentativ dargestellt. Die Lage der Latenz-assoziierten Region sowie des als Regulator der transkriptionellen Aktivierung (RTA) bezeichnete Genprodukt des ORF50 (siehe Kapitel 1.1.2) im schematisch dargestellten KSHV Genom (oben) sind zur Orientierung angegeben.

Das durch ORF73 kodierte LANA-1 ist eines in der Latenz exprimierten Proteine, das in allen von KSHV infizierten Zellen nachgewiesen werden kann (Rainbow et al., 1997) und ubiquitär in allen mit KSHV-assoziierten Tumorerkrankungen exprimiert wird (Rainbow et al., 1997; Kellam et al., 1997; Kedes et al., 1996; Dupin et al., 2000). LANA-1 ist für die Persistenz des im Zellkern episomal vorliegenden KSHV Genoms essentiell (Ballestas et al., 1999; Hu et al., 2002). Dabei bindet LANA-1 mit seiner N-terminalen Region während der Mitose an Chromosomen (Ballestas et al., 1999; Cotter et al., 2001; Szekely et al., 1999) und mit seiner C-terminalen Domäne an die Terminalen Wiederholungseinheiten (TR) des KSHV Genoms (Ballestas et al., 2001; Garber et al., 2002). Dadurch kann eine Kopplung des viralen Genoms an die Wirtschromosomen auch während der Zellteilung erfolgen (Ballestas et al., 1999; Szekely et al., 1999). Dies gewährleistet die Weitergabe des KSHV Genoms an die Tochterzellen. Darüber hinaus ist LANA-1 für die Replikation der persistierenden episomalen DNA von Bedeutung (Grundhoff und Ganem, 2003). LANA-1 kann sowohl seinen eigenen Promotor positiv regulieren (Krithivas et al., 2000; Renne et al., 2001; Jeong et al., 2004) als auch als Transaktivator und Repressor auf zelluläre und virale Promotoren wirken (Cotter et al., 2001; Friborg et al., 1999). Für LANA-1 konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es durch seine Bindung an p53 dessen Apoptose-vermittelnde Funktion blockieren (Friborg et al., 1999) und dadurch zur Entstehung von KS beitragen könnte. Dazu besitzt es transformierende Eigenschaften, in dem es durch Bindung an das Retinoblastom (Rb) Protein die Aktivierung von E2F-abhängigen Genen induzieren kann (Radkov et al., 2000).

Das v-Cyclin wird durch den Leserahmen ORF72 kodiert und weist Homologie zu zellulären Cyclin D2 Genen auf. Es bildet einen Komplex mit der cyclinabhängigen Kinase 6 (CDK6) und phosphoryliert neben dem

Retinoblastom (Rb) unter anderem auch das Histon H1 Protein und p27 (Chang et al., 1996b; Godden-Kent et al., 1997; Li et al., 1997; Swanton et al., 1997). Durch die Hyperphosphorylierung des Rb-Proteins und dessen damit verbundener Inaktivierung wird unter anderem der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt und funktionell aktiv. Aus diesem Grunde könnte das v-Cyclin zur Tumorgenese beitragen, da es den Eintritt von ruhenden Zellen in die S-Phase fördert und ebenso durch seine inhibierende Wirkung auf STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) das Wachstum der Zellen begünstigt (Lundquist et al., 2003).

Das v-FLIP wird im Leserahmen ORF K13 kodiert und besitzt zwei Todeseffektor-Domänen (death effector domain, DED), die es ihm erlauben, an Adaptor-Proteine des Fas/TNFR (tumor necrosis factor receptor) Signalwegs zu binden (Thome et al., 1997) und die Fas-induzierte Apoptose zu blockieren (Bertin et al., 1997; Thome et al., 1997). Das v-FLIP kann daneben die klassische Aktivierungskaskade (canonical pathway), welche zur Translokation von NF- κ B (nuclear factor- κ B) in den Zellkern führt, aktivieren (Chaudhary et al., 1999; Liu et al., 2002). Eine Aktivierung von NF- κ B wirkt in diesem Zusammenhang inhibierend auf die Expression der viralen lytischen Gene (Brown et al., 2003). Wird die Aktivierung von NF- κ B blockiert, führt dies in Abhängigkeit des zellulären Kontextes zur Induktion der lytischen Genexpression (Grossmann und Ganem, 2008). Aus diesem Grunde könnte v-FLIP zur Aufrechterhaltung der latenten Infektionsform beitragen (Ye et al., 2008). In primären Endothelzellen führte die alleinige Expression von v-FLIP über die Induktion von NF- κ B zur Ausbildung eines Spindelzell-ähnlichen Phänotyps, während alle weiteren latent exprimierten Proteine dazu nicht in der Lage waren (Grossmann et al., 2006). Neuere Studien belegen zudem, dass v-FLIP im Zusammenspiel mit NF- κ B auf die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen sowie auf Interferon-stimulierte Gene aktivierend wirkt (Sakakibarta et al., 2009).

Der offene Leserahmen K12 sowie die unmittelbar davor liegende Wiederholungsregion (repeat region) kodieren für Kaposin A, B und C. Obwohl diese während der Latenz exprimiert werden, ist ihre Expression in der frühen Phase der lytischen Reaktivierung stark erhöht (Jenner et al., 2001; Nakamura

et al., 2003). Das Kaposin A ist ein Typ II Transmembranprotein. Es besitzt transformierende Eigenschaften in Maus-Fibroblasten (Muralidhar et al., 1998) und kann in latent infizierten Spindelzellen des KS (Staskus et al., 1997), in PEL-Zellen (Stürzl et al., 1997) sowie in transformierten und von Tumoren abgeleiteten Zelllinien nachgewiesen werden (Ganem, 2006). Außer dem Kaposin A werden vom Leserahmen K12 unter Verwendung alternativer Initiationskodone die Proteine Kaposin B und C gebildet (Sadler et al., 1999). Das Kaposin B ist in der Lage, an die zelluläre p38/MK2 (MAPK-aktivierte Proteinkinase 2) zu binden und diese direkt zu aktivieren (McCormick und Ganem, 2005). Hierdurch vermittelt könnte es zur Stabilisierung von mRNAs mit AU-reichen Elementen in ihrer 3'-UTR kommen, von denen einige, wie IL-8 oder TNF- α , im Verdacht stehen, zur Pathogenese von KS beizutragen (McCormick und Ganem, 2005; Martin und Gutkind, 2008).

Eine Hemmung der Transaktivatorfunktion des NF- κ B wird dem LANA-2/vIRF-3 zugeschrieben (Burysek et al., 1999; Seo et al., 2004), das darüber hinaus die p53-vermittelte Transaktivierung und Apoptose inhibieren kann (Rivas et al., 2001, Seo et al., 2001). Die Expression von LANA-2 ist nicht in KS-Läsionen nachweisbar, sondern B-Zell spezifisch (Rivas et al., 2001).

1.3.2 Lytische Replikation

Neben der latenten Infektionsform, die in den meisten infizierten Zellen vorherrscht, kann eine Aktivierung des lytischen Replikationszyklus hin zur Produktion und Freisetzung reifer, infektiöser Viruspartikel erfolgen (Sun et al., 1998). Diese Phase der Infektion führt normalerweise zum Tod der infizierten Zellen. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass bestimmte während des lytischen Lebenszyklus exprimierte Gene mit autokriner und parakriner Wirkung an der Entstehung der mit KSHV verbundenen Erkrankungen beteiligt sind und das Potential besitzen, die Tumorgenese zu fördern, die zur Entwicklung des KS beitragen (Grundhoff und Ganem, 2004).

Obwohl die physiologischen Signale, welche den Übergang von der Latenz in die lytische Replikation vermitteln nur teilweise verstanden sind, kann eine produktive KSHV Replikation *in vitro* durch die Behandlung von latent infizierten

PEL-Zelllinien mit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) oder Natriumbutyrat eingeleitet werden (Yu et al., 1999; Miller et al., 1997). Das TPA, welches auch als Aktivator der Protein Kinase C bekannt ist, vermittelt die Reaktivierung von KSHV, indem es induzierend in den ERK (extracellular signal-regulated kinase)/MAPK (mitogen-activated protein kinase) Signalweg eingreift (Ford et al., 2006). Spezifische Inhibitoren dieses Signalwegs blockierten in mit TPA behandelten PEL-Zellen die Expression von ORF50 und anderen lytischen Genen (Cohen et al., 2006). Das Natriumbutyrat wirkt inhibierend auf Histon-Deacetylasen (HDAC), so dass die daraus resultierende Umordnung des Chromatins den ORF50 Promotor aktivieren kann (Lu et al., 2003). Eine Induktion der lytischen KSHV Replikation kann darüber hinaus auch durch inflammatorische Zytokine (Monini et al., 1999) sowie durch XBP-1 (transcription factor X-box binding protein 1) in PEL-Zellen eingeleitet werden (Dalton-Griffin et al., 2009).

Eine Reaktivierung der Latenz von KSHV in den lytischen Zyklus erfolgt durch das Protein RTA (Regulator der transkriptionellen Aktivierung), welches durch ORF 50 kodiert wird. Diese führt zur Initiation einer zeitlich geordnet ablaufenden Expressionskaskade der lytischen Gene, in deren Verlauf zunächst die sehr frühen Gene exprimiert werden, die als Transkriptions-Aktivatorproteine die Transkription der frühen und der späten Gene einleiten. Das von KSHV-kodierte Genprodukt des RTA/ORF50 gehört zu den sehr frühen Genen und wird von einer 3,6 kb großen multicistronischen mRNA kodiert, die zudem die Information für zwei weitere Proteine namens K8 und K8.1 beinhaltet (Sun et al., 1998). Das K8 Protein zeigt Homologie zum EBV ZEBRA Protein, welches eine wichtige Rolle in der Replikation und der Reaktivierung von EBV spielt (Lin et al., 1999). Der gB/K8.1 ORF kodiert für ein strukturelles Hüllprotein (Glykoprotein B, gB) der KSHV Virionen (Luna et al., 2004).

Die Expression von RTA ist für die Reaktivierung von KSHV sowohl notwendig als auch ausreichend und spielt eine Schlüsselfunktion. Durch die ektopische Expression von RTA in latent infizierten PEL-Zellen kann die latente Phase unterbrochen und die kaskadenartig organisierte Genexpression eingeleitet werden, die zur Produktion und zur Freisetzung von viralen Partikeln führt (Sun

et al., 1998; Lukac et al., 1998; Gradoville et al., 2000). Demgegenüber führt das gezielte Ausschalten des ORF50 Gens in einem bakteriellen künstlichen KSHV-Chromosom nach TPA Behandlung zu keiner Produktion von infektiösen Partikeln (Xu et al., 2005). Der Wildtyp-Phänotyp kann durch eine ektopische Expression des ORF50 Proteins in trans allerdings wieder hergestellt werden (Xu et al., 2005). Des Weiteren führte eine dominant-negative ORF50 Mutante nach chemischer Induktion des lytischen Zyklus zu einer signifikanten Reduktion der viralen Reaktivierung (Lukac et al., 1999).

Durch Bindung an spezifische DNA Sequenzen und Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren kann RTA neben seinem eigenen Promotor auch zelluläre und frühe lytische virale Gene aktivieren (Deng et al., 2000, Chang et al., 2002, Gwack et al., 2002, Byun et al., 2002, Wang et al., 2003a). Untersuchungen zeigten, dass eine ektopische Expression von ORF50 zur Aktivierung von endogenen RTA Transkripten führt, was in Reporter Analysen mit einer erhöhten Promotoraktivität von ORF50 einherging (Deng et al., 2000; Gradoville et al., 2000). Diese autoregulierende Funktion könnte zur Verstärkung von schwachen Signalen dienen, um eine effektive lytische Replikation einleiten zu können. In diesem Kontext scheinen drei Gruppen von wichtigen cis-Elementen innerhalb des ORF50 Promotors, inklusive der Bindestellen für Oct-1 (octamer-binding protein 1), C/EBP α (CCAAT enhancer binding protein α) und RBP-J κ (recombinant signal binding protein-J κ), die Autoregulation zu vermitteln (Liang und Ganem, 2003; Sakakibara et al., 2001; Wang et al., 2003b). So führte eine Deletion der putativen RBP-J κ Bindestelle im ORF50 Promotor zu einer Reduzierung der autoregulierenden Aktivität (Chang et al., 2005c).

Transiente Expressionsexperimente zeigten zudem, dass RTA in der Lage ist, durch direkte Bindung an spezifische Sequenzmotive innerhalb von lytischen viralen Promotoren aktivierend auf diese zu wirken. Die meisten dieser frühen viralen Gene spielen eine essentielle Rolle in der viralen DNA Replikation, in der Regulation der viralen und zellulären Genexpression sowie in der Pathogenese von KSHV-assoziierten Erkrankungen. Unter diesen sind beispielsweise Kaposin/K12, vGPCR/ORF74 sowie vIL6/K2 zu finden (Chang et al., 2002; Chen et al., 2000; Deng et al., 2002; Jeong et al., 2001). Erst unlängst

konnten 19 RTA Bindestellen sowie ein generelles RTA Konsensus-Bindemotiv im KSHV Genom in der aus PEL-Zellen gewonnen und latent infizierten Zelllinie BCBL-1 identifiziert werden (Chen et al., 2009). Diese Bindestellen sind in Promotor-Regionen, Introns oder Exons von unter anderem Kaposin/ORF12, vFLIP/K13, v-Cyclin/ORF72, gB/ORFK8.1, RTA/ORF50 selbst sowie von ORF59/PF-8 lokalisiert. Der ORF59 kodiert für einen wichtigen DNA-Polymerase Prozessierungsfaktor (PF-8), der zu den frühen Genen zählt und im Zellkern von KSHV-infizierten Zellen lokalisiert ist (Chan et al., 1998). Untersuchungen zeigten, dass PF-8 mit der viralen DNA Polymerase (Pol-8/ORF9) *in vitro* interagiert und diese in der DNA Syntheseaktivität stimulieren kann (Chan und Chandran, 2000; Lin et al., 1998).

Durch die Assoziation mit DNA bindenden Proteinen, zellulären Transkriptionsfaktoren sowie viralen Proteinen ist RTA zudem in der Lage indirekt auf die Expression verschiedener anderer Gene zu wirken. Die Interaktion von RTA mit RBP-J κ ist am besten untersucht und wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems identifiziert (Liang et al., 2002). Das RBP-J κ ist ein sequenzspezifisches, DNA-bindendes Protein und Teil des Signalübertragungsweges des Zelloberflächenrezeptors Notch. Unter normalen Bedingungen wirkt RBP-J κ über die Bindung an Zielgene als transkriptioneller Repressor. Die Interaktion von RTA mit RBP-J κ führt zu einer Notch-unabhängigen Aktivierung von lytischen Genen mit RBP-J κ Bindestellen (Liang et al., 2002). Dies führt unter anderem zur transkriptionellen Aktivierung von vGPCR/ORF74, LANA-1/ORF73 und von RTA/ORF50 selbst (Liang und Ganem, 2004; Lan et al., 2005; Wang et al., 2010). Zusätzlich konnten jüngst über 260 putative RBP-J κ Bindestellen im KSHV Genom identifiziert werden, von denen viele in bereits bekannten oder mutmaßlichen lytischen Promotoren liegen (Persson und Wilson, 2010). Neben RBP-J κ kann RTA mit vielen weiteren Transkriptionsfaktoren, inklusive c-Jun, Oct-1, C/EBP α und STAT3 interagieren und somit deren Aktivität stimulieren sowie virale und zelluläre Promotoren aktivieren (Gwack et al., 2002; Wang et al., 2003c, 2004; Sakakibara et al., 2001).

Die Transaktivator-Funktion von RTA kann jedoch durch eine Vielzahl von viralen und zellulären Faktoren inhibiert werden, was die Initiation der lytischen Reaktivierung hemmt und damit eine latente Infektion begünstigt. Die Funktion

von RTA kann beispielsweise durch IRF7, den PI3K-Akt Signalweg (phosphatidylinositol 3-kinase-Akt), NF- κ B sowie durch LANA-1/ORF73 unterdrückt werden (Brown et al., 2003; Gwack et al., 2001; Lan et al., 2004; Wang et al., 2005; Yang und Wood, 2007; Peng et al., 2010). Das LANA-1 Protein ist in allen mit KSHV-infizierten Zellen nachzuweisen und reprimiert die Expression und Transaktivator-Funktion von RTA während der Latenz durch direkte Bindung an dessen Promotor sowie durch indirekte Bindung an den Transkriptionsfaktor RBP-J κ (Lan et al., 2005; Lu et al., 2006). Eine LANA-1 Deletionsmutante in einem bakteriellem künstlichen KSHV-Chromosom führte zu einer Induktion der Expressionskaskade der lytischen Gene sowie zur Produktion von infektiösen Virionen (Li et al., 2008). Um jedoch eine effiziente Transaktivierung und Reaktivierung der viralen lytischen Replikation einleiten zu können, kann RTA die Proteasom-vermittelte Degradation einiger Repressoren einleiten (Yang et al., 2008). Untersuchungen zeigten, dass RTA induzierend auf die Degradation von IRF7 wirken kann, was ferner zur Umgehung der durch IRF7 vermittelten angeborenen Immunantwort beitrug (Yu et al., 2005). Interessanterweise kann RTA zum einen LANA-1 post-translational durch proteasomale Degradation negativ regulieren und zum anderen seine Expression während der viralen Replikation transkriptionell aktivieren (Lan et al., 2005; Yang et al., 2008). Vermutlich dienen diese durch RTA vermittelten Mechanismen in Abhängigkeit des viralen Lebenszyklus zur Aufrechterhaltung unterschiedlicher Proteinmengen von LANA-1.

Zusammenfassend scheint eine Balance zwischen der Inhibierung von RTA durch virale und zelluläre Repressoren und der durch RTA vermittelten Degradation dieser Repressoren mit darüber zu entscheiden, ob KSHV den Weg der Latenz oder der lytischen Replikation beschreitet. Die genauen Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung dieser Balance beitragen sind bisher noch ungeklärt.

1.4 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine (~21-25 Nukleotide), nicht-kodierende RNA-Moleküle, welche eine wichtige Rolle in der post-transkriptionellen Genregulation spielen. (Ambros et al., 2003). Sie sind in der Lage, durch Bindung an komplementäre Sequenzen ihre Ziel-mRNAs sowohl in der Translation als auch in der Stabilität zu beeinflussen. MiRNAs werden von beinahe allen Eukaryoten endogen exprimiert (Bartel, 2009) und scheinen auf Grund der evolutionären Konservierung vieler miRNA Gene zudem von biologischer Relevanz zu sein (Ibanez-Ventoso et al., 2008). Im Menschen sind gegenwärtig über 700 unterschiedliche miRNAs identifiziert (Griffiths-Jones et al., 2008) und einige bereits als essentielle Regulatoren und Modulatoren in zellulären Prozessen, wie Apoptose, Zellwachstum und Proliferation sowie Entwicklungsprozessen beschrieben worden.

Die erstmalige Entdeckung von miRNAs erfolgte anhand von genetischen Analysen an *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) und geht auf das Jahr 1993 zurück (Lee et al., 1993). Die Forschergruppe um Ambros beschrieb die Funktion des Gens für eine kleine nicht-kodierende RNA namens lin-4. Ihnen fiel auf, dass das lin-4 Gen nicht für ein Protein sondern für ein 22 Nukleotide langes RNA-Molekül kodierte. Dieses war in der Lage, sequenz-spezifisch an multiple Bereiche in der 3'- untranslatierten Region (3'-UTR) der lin-14 mRNA zu binden und die Translation in Proteine zu unterdrücken, die den zeitlichen Verlauf der embryonalen Entwicklung von *C. elegans* regulierten.

MiRNAs stellen gegenwärtig zusammen mit einer Reihe weiterer RNAs, wie Piwi-interagierende RNAs (Aravin et al., 2007) und siRNAs (small interfering RNAs) (Reinhart und Bartel, 2002; Ambros et al., 2003) eine neue Klasse regulatorischer RNA-Moleküle dar. Mit etwa 1% der exprimierten Gene höherer Eukaryoten gehören miRNAs zu einer der größten Genfamilien (Bartel, 2004). Die Konservierung von miRNA Bindestellen weist darauf hin, dass mindestens 30-60% der Gene potentiell durch miRNAs reguliert werden (Lewis et al., 2005; Krek et al., 2005; Friedman et al., 2009).

1.4.1 Biogenese von miRNAs

Die meisten miRNAs sind in intergenischen Regionen des Genoms kodiert, wo sie eigenständige Transkriptionseinheiten bilden und einzeln oder als Gruppe (Cluster) aus mehreren miRNAs transkribiert werden. Einige können zudem in Introns von Protein-kodierenden Genen, aber auch in Exons lokalisiert sein (Rodriguez et al., 2004). Die Transkription von miRNAs erfolgt vornehmlich durch die RNA Polymerase II als lange, mehrere tausend Basen umfassende primary miRNAs (pri-miRNAs) (Lee et al., 2002). Diese Primärabschriften enthalten, wie alle Polymerase II Transkripte, am 5'-Ende eine CAP-Struktur und sind am 3'-Ende polyadenyliert (Kim et al., 2005). Innerhalb der pri-miRNA liegen einzelne miRNAs als 60-80 Nukleotide lange Haarnadelstrukturen vor. Diese werden im Zellkern durch den sogenannten Mikroprozessor, bestehend aus dem Enzym Drosha und seinem Kofaktor DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) (siehe Kapitel 1.4.2), erkannt und zu precursor miRNAs (pre-miRNAs) prozessiert (Kim et al., 2005; Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Landthaler et al., 2004; Han et al., 2004). Die pre-miRNA wird anschließend durch Exportin-5 und dem Kofaktor Ran-GTP in einem aktiven Prozess aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert (Yi et al., 2003; Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004). Der nächste Schritt in der miRNA-Reifung wird von dem Enzym Dicer (siehe Kapitel 1.4.3) im Komplex mit den Kofaktoren TRBP (TAR RNA binding protein) und PACT (PKR activation protein), welche die Affinität von Dicer zu RNAs erhöhen, ausgeführt (Chendrimada et al., 2005; Forstemann et al., 2005; Liu et al., 2007). Durch Abspaltung der terminalen Haarnadelschleife entstehen ca. 21-24 Nukleotide lange miRNA-Duplexe (Bernstein et al., 2001; Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001; Liu et al., 2007). Im weiteren Verlauf beginnt sich ein Effektor-Komplex namens RISC (RNA-induced silencing complex) auszubilden. Zunächst bindet das Protein TRBP an die miRNA-Duplex und rekrutiert dadurch die Kernkomponenten des RISC, die Argonaut Proteine (Ago1 bis 4) (Meister und Tuschel, 2004; Gregory et al., 2005). Die Ago Proteine sind elementare Bestandteile des Effektorkomplexes und sind durch PAZ- (piwi-argonaut-zwille) und PIWI-Domänen gekennzeichnet (Carmell et al., 2002). Die PAZ-Domäne bindet selektiv an das 3'-Ende der miRNA, während die PIWI-

Domäne, als ein Homolog der RNase H, an der durch miRNAs vermittelten endonukleolytischen Spaltung der Ziel-mRNA beteiligt ist (Parker et al., 2004, 2005; Song et al., 2003, 2004; Hall, 2005). Bisher lassen sich Ago Proteine in zahlreichen Organismen finden. Allein in *C. elegans* existieren 27 Argonaut-Homologe, bei Säugern sind 8 bekannt (Carthew und Sontheimer, 2009). Dicer kann hierbei im gleichen Komplex mit Ago Proteinen gefunden werden (Chendrimada et al., 2005; Gregory et al., 2005) und ist nicht nur an der Prozessierung von dsRNA beteiligt, sondern auch an dem Prozess der RISC Ausbildung (Carthew und Sontheimer, 2009). Die miRNA-Duplex wird im weiteren Verlauf entwunden und die reife einzelsträngige miRNA in dem Komplex gebunden. Obwohl beide Stränge in der Lage sind stabil mit Ago Proteinen zu assoziieren wird vornehmlich der Strang eingebaut, welcher an dem 5'-Ende eine schwächere Hybridierungsstruktur ausbildet (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Der Gegenstrang, als miRNA* bezeichnet, wird durch Nukleasen abgebaut (Schwarz et al., 2003). Dabei sind nicht alle miRNA* Spezies instabil und können, wie neue Studien zeigen, ähnlich wie reife miRNAs wirken (Okamura et al., 2008).

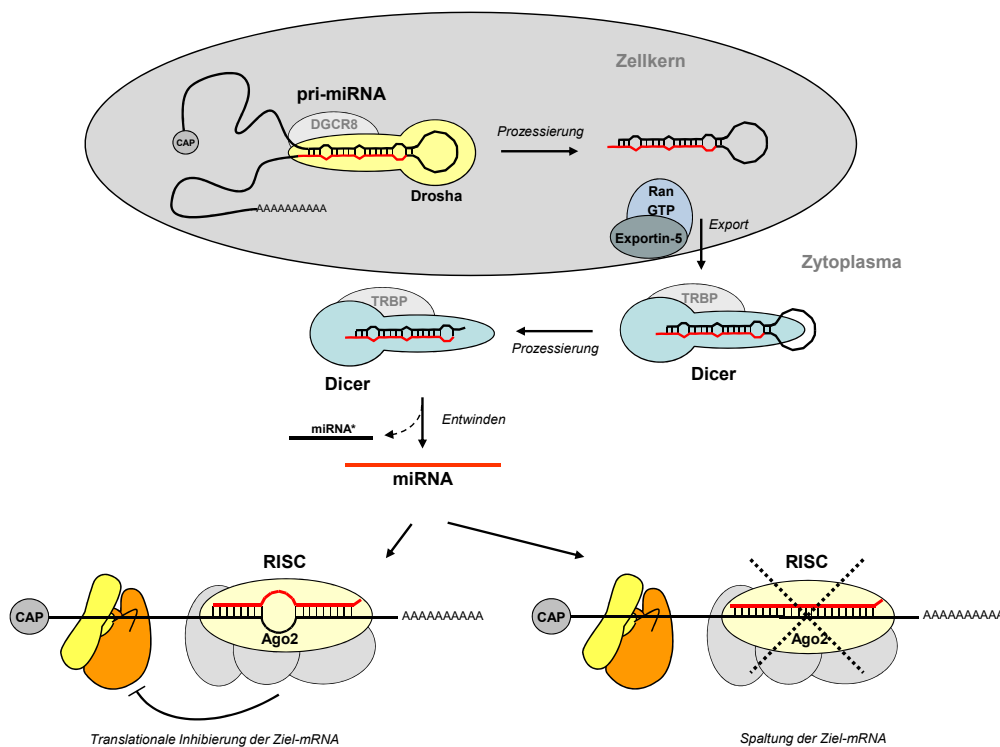


Abbildung 3: Schema der Biogenese und Funktion von miRNAs. Im Zellkern erfolgt die Transkription zum Primärtranskript (pri-miRNA). Durch den Mikroprozessor, bestehend aus

Drosha und DGCR8, entsteht die Vorläufer-miRNA (pre-miRNA). Der Transport ins Zytoplasma wird durch Exportin-5 vermittelt. Dort wird durch den Enzymkomplex Dicer die terminale Haarnadelschleife entfernt und es entsteht eine miRNA Duplexstruktur, die aus der reifen miRNA und dem Gegenstrang miRNA* besteht. Die reife miRNA wird in den RISC-Komplex inkorporiert, der das RNA-Silencing vermittelt. Ist die Zielsequenz vollständig komplementär, so kommt es zur Spaltung der Ziel-mRNA, bei einer partiellen Komplementarität zur translationellen Inhibition.

1.4.2 Der Mikroprozessor

Die Biogenese von miRNAs ist ein schrittweise ablaufender Prozess, der in zwei zellulären Kompartimenten stattfindet. Der erste Schritt besteht in der Spaltung der langen pri-miRNA Transkripte im Zellkern durch das Enzym Drosha. Dies führt zur Entlassung der ~70 Nukleotide langen pre-miRNAs.

Drosha ist ein konserviertes, nukleäres RNase III Enzym mit Homologen sowohl in Mensch und Maus als auch in *D. melanogaster* und *C. elegans* (Filippov et al., 2000; Fortin et al., 2002; Wu et al., 2000). Aufgrund seiner einzelnen doppelsträngigen RNA-Bindedomäne (dsRBD) ist Drosha jedoch nicht in der Lage die pri-miRNA als Substrat zu erkennen. Es bildet deshalb mit dem DGCR8 Protein (DiGeorge syndrome critical region gene 8) einen funktionalen Komplex, welcher auch als Mikroprozessor bezeichnet wird (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Landthaler et al., 2004; Han et al., 2004). Das DGCR8 Protein besitzt im Gegensatz zu Drosha eine WW-Domäne sowie zwei dsRBDs, die es ihm dadurch vermittelt erlauben, die Substraterkennung zu ersetzen. Im Zusammenspiel mit Drosha erkennt das DGCR8 zunächst die terminale Haarnadelschleife der pri-mRNA und leitet Drosha an seinen Funktionsort, an dem es die Spaltung der pri-mRNA katalysiert (siehe Abbildung 6) (Zheng et al., 2005). Die Effizienz der Spaltung durch Drosha ist dabei sowohl von der Haarnadelstruktur selbst wie auch von den flankierenden Sequenzen der pri-miRNA abhängig (Lee et al., 2003; Zheng und Cullen, 2003; Han et al., 2006). Nach erfolgter Bindung des Drosha/DGCR8-Komplexes bilden die beiden RNase III Domänen (RIIIda und RIIIdb) von Drosha ein intramolekulares Dimer und schneiden die beiden Stränge ~22 Nukleotide von der terminalen Haarnadelschleife entfernt (Zheng et al., 2005; Zhang et al., 2004). Die pri-miRNA wird dabei am 3'-Strang von RIIIda und der 5'-Strang von RIIIdb

gespalten (Han et al., 2006). Die dadurch erzeugte pre-miRNA besitzt einen für RNase III Spaltungen charakteristischen 3'-Überhang von 2 Nukleotiden (Lee et al., 2002) und wird anschließend aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert.

Obwohl der Mechanismus der Mikroprozessors-Aktivität intensiv erforscht wurde, war relativ wenig darüber bekannt, wie seine Komponenten reguliert werden. Einen ersten Hinweis darauf erbrachten komparative Genomanalysen, die eine Reihe von hoch konservierten Haarnadelstrukturen, ähnlich denen zu pri-miRNAs, in der DGCR8 mRNA identifizieren konnten (Pederson et al., 2006). Infolgedessen wurde vermutet, dass diese Strukturen an der Autoregulation von DGCR8 beteiligt sein könnten (Pederson et al., 2006). Erst kürzlich wurde diese Hypothese bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass der Drosha/DGCR8-Komplex in der Lage ist, die Haarnadelstrukturen in der DGCR8 mRNA zu schneiden, was zu einer Destabilisierung dieser führte (Han et al., 2009). Zusätzlich kann das DGCR8 Protein Drosha durch Protein-Protein Interaktion stabilisieren und dadurch eine Rückkopplungsschleife erzeugen (Han et al., 2009). Das Drosha Protein ist somit neben seiner Rolle in der miRNA-Prozessierung zudem an dem Prozess der post-transkriptionellen Regulierung durch direkte Destabilisierung von mRNAs beteiligt (siehe Abbildung 5). Über 10% der gegenwärtig nachgewiesenen miRNAs sind in Exons von Protein-kodierenden oder nicht-kodierenden Transkripten lokalisiert (Kim und Kim, 2007; Morin et al., 2008; Rodriguez et al., 2004). Folglich könnten diese miRNA Haarnadelstrukturen sowohl als RNA-Instabilitäts Elemente als auch als pre-miRNAs dienen. Es wäre damit einhergehend von großem Interesse, weitere mRNAs zu finden, die direkt durch Drosha kontrolliert sein könnten.

Die Aktivität des Mikroprozessors ist essentieller Bestandteil der miRNA Biogenese. Die gezielte Suppression von DGCR8 in embryonalen Stammzellen der Maus führte zu einer starken Beeinträchtigung der miRNA-Reifung und hatte Proliferations- und Differenzierungsdefekte in diesen Zellen zur Folge (Wang et al., 2007). Aufgrund der Tatsache, dass in einer Vielzahl von humanen Tumoren die miRNA Expression generell unterdrückt zu sein scheint (Lu et al., 2005), könnte eine präzise Kontrolle der miRNA-Biogenese

maßgeblich an der Aufrechterhaltung normaler zellulärer Funktionen beteiligt sein. Aus diesem Grunde wurde angenommen, dass die Drosha vermittelte Prozessierung einiger miRNAs in Tumorzellen und undifferenzierten Zellen gestört sein kann (Thomson et al., 2006).

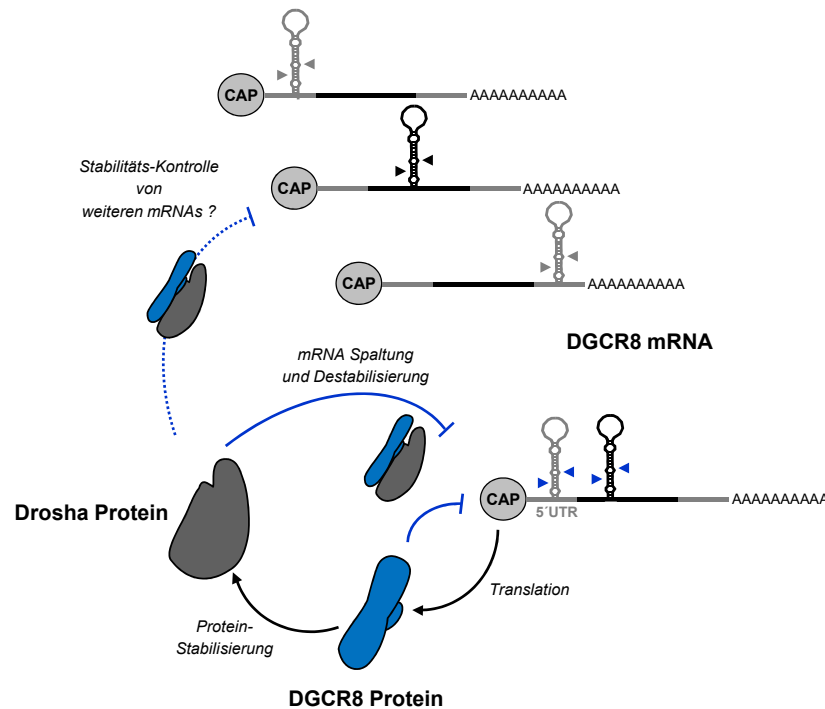


Abbildung 4: Modell zur Regulation des Mikroprozessor-Komplexes. Das Drosha Protein schneidet hoch konservierte Haarnadelstrukturen in der 5'-UTR sowie in der kodierenden Region der DGCR8 mRNA und destabilisiert diese. Daraus resultierend ist das DGCR8 Protein nicht mehr in der Lage Drosha durch Protein-Protein-Wechselwirkung positiv zu regulieren, was eine verringerte Mikroprozessor-Aktivität und damit einhergehend eine verminderte miRNA-Biogenese zur Folge hat. Darüber hinaus könnte Drosha die Stabilität von weiteren mRNAs direkt kontrollieren und somit eine elementare Rolle in der post-transkriptionellen Regulation spielen.

1.4.3 Das Dicer Protein

Nachdem durch Exportin-5 vermittelten Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003; Bohnsack et al., 2004) erfolgt die Prozessierung der pre-miRNA in die ~22 Nukleotide umfassende, reife miRNA durch das Enzym Dicer. Dicer ist ebenso wie Drosha ein RNase III Enzym und in den meisten Eukaryoten konserviert (Bernstein et al., 2001). Einige Organismen, einschließlich Säuger und Nematoden, besitzen ein Dicer Protein während andere multiple Homologe aufweisen, die an verschiedenen

enzymatischen Prozessen beteiligt sind. Im Organismus von *D. melanogaster* werden zwei distinkte Dicer Proteine kodiert. Das Dicer-1 ist an der miRNA Prozessierung beteiligt, während das Dicer-2 eine Funktion im siRNA Signalweg übernimmt (Lee et al., 2004). Neben seinen beiden katalytischen RNase III Domänen und dualen dsRBD enthält Dicer eine DExD/H ATPase Domäne, eine DUF283-Domäne mit unbekannter Funktion sowie eine PAZ-Domäne. An der spezifischen Erkennung der dsRNA-Enden spielt die PAZ-Domäne sowie die RNase III Domänen zentrale Rollen (Zhang et al., 2004; Macrae et al., 2006). Das innerhalb der PAZ-Domäne enthaltene Oligonukleotidbindemotiv ist zusammen mit einer hydrophoben Bindetasche an der selektiven Interaktion mit dem 3'-Überhang von 2 Nukleotiden beteiligt, wie sie bei der Prozessierung durch Drosha entstehen (Song et al., 2003; Ma et al., 2004; Lingel et al., 2004). Durch diese Interaktion vermittelt wird Dicer an der Stamm-Struktur der pre-miRNA positioniert (Carmell et al., 2004). In Analogie zu Drosha bilden die dualen RNase III Domänen durch intramolekulare Dimerisierung ein katalytisches Zentrum und schneiden die Stamm-Struktur der dsRNA ~20 bp vor seinem Ende (Han et al., 2004; Zhang et al., 2004). Daraus resultiert eine ~22 Nukleotide umfassende dsRNA mit einem 5'-Phosphat-Ende und einem 3'-Überhang von 2 Nukleotiden (Zhang et al., 2004). Diese kurzlebige dsRNA wird schließlich entwunden und die einzelsträngige, reife miRNA in das spezifische Protein-Komplex RISC inkorporiert.

Die Funktion der DUF283-Domäne ist bis heute noch unklar, sie scheint aber eine Rolle in der dsRNA Bindung zu spielen (Dlakic et al., 2006). Unklarheit herrscht ebenso über die Funktion der Helikase/ATPase Domäne, welche nur in Klasse III RNase III Enzymen existent ist. Neue Untersuchungen zeigen, dass diese Domäne einen autoinhibierenden Effekt auf die dsRNA Prozessierung zu haben scheint, indem es die katalytische Effizienz vermindert (Ma et al., 2008).

Die Aktivität von Dicer ist wie die des Mikroprozessors essentiell für die miRNA-Biogenese. Eine gezielte Deaktivierung des Dicer Gens in Mäusen führte früh in der Entwicklung zu einer embryonalen Letalität (Bernstein et al., 2003) und während der Embryogenese zu einer Hypoplasie der Skelettmuskeln (O'Rourke et al., 2007). Bei diesen Versuchen wurde vor allem die Bedeutung der miRNA Expression für die Stammzellentwicklung deutlich. Zudem scheint Dicer auch

eine wichtige Rolle im Kardiovaskulären System (Zhao et al., 2007) sowie in der Entwicklung von Zebrafischen zu spielen. Die Stilllegung von Dicer führte bei letzterem zu einem Wachstumsarrest (Wienholds et al., 2003). Eine durch siRNA transiente Reduktion von Dicer führte in Endothelzellen zu einer Beeinträchtigung der Angiogenese *in vitro* und *in vivo* und resultierte in einer verringerten Proliferation und Migration (Kuehbacher et al., 2007).

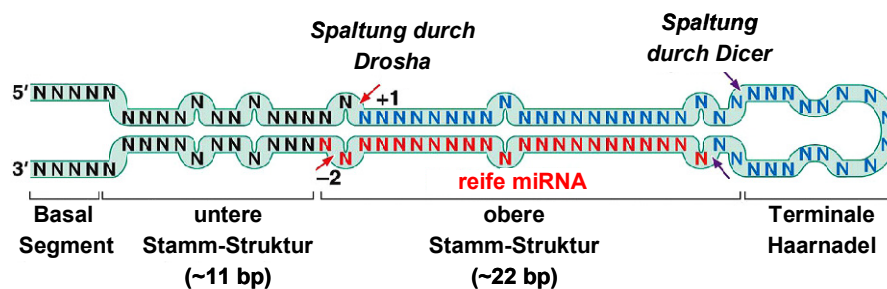


Abbildung 5: Modell zum Spaltungs-Mechanismus der RNase III Enzyme Drosha und Dicer. Der Mikroprozessor, bestehend aus dem RNase III Enzym Drosha und dem Kofaktor DGCR8, bindet an der terminalen Haarnadelschleife der pri-miRNA und interagiert mit der ~33 Nukleotide entfernten liegenden unteren Stamm-Struktur. Das DGCR8 Protein funktioniert wie eine molekulare Schieblehre und misst die Distanz von ~22 Nukleotiden, ausgehend von der terminalen Haarnadelschleife, an der die dualen RNase III Domänen von Drosha einen intramolekularen Dimer ausbilden und jede Domäne einen Strang der pri-miRNA schneiden. Die entstehende pre-miRNA besitzt einen charakteristischen 3'-Überhang von zwei Nucleotiden und wird im Zytoplasma von der PAZ-Domäne des RNase III Enzyms Dicer erkannt. Das Dicer Protein schneidet, in Analogie zu Drosha, die Stamm-Struktur ~20 Nucleotide vor seinem Ende. Es entsteht ein miRNA:miRNA* Duplex (Pearson, 2008).

1.4.4 Mechanismen

MiRNAs spielen eine zentrale Rolle in der Steuerung zellulärer Prozesse. Durch Bindung an komplementäre Bereiche ihrer Ziel-mRNA sind sie zu einer post-transkriptionellen Regulation der Genexpression befähigt. Die Inhibition der Translation kann dabei bereits beim Schritt der Initiation (Mathonnet et al., 2007) oder aber während der Elongation erfolgen (Petersen et al., 2006). Die Zielsequenzen von miRNAs liegen innerhalb der 3'-UTR von mRNAs, die partiell oder vollständig komplementär zur miRNA sein können. Ihre reprimierende Funktion kann in einigen Fällen auch an Bindestellen in kodierenden Bereichen und in 5'-UTRs nachgewiesen werden (Lytle et al., 2007; Kloosterman et al., 2004; Orom et al., 2008; Rigoutsos, 2009; Gu et al.,

2009). Im Falle einer vollständigen Komplementarität, die überwiegend bei Pflanzen beobachtet werden kann, kommt es zu einer Spaltung der Ziel-mRNA. Im Gegensatz dazu interagieren tierische miRNAs hauptsächlich mit unvollständig komplementären Bereichen der 3'-UTR ihrer Ziel-mRNA und unterbinden die Proteinproduktion durch Unterdrückung der Translation (Bartel, 2009). Gleichzeitig führt dieser Mechanismus häufig zu einer Destabilisierung der mRNA (Bartel, 2009). Wie experimentelle sowie computergestützte Analysen offenbart haben, ist eine perfekte Komplementarität nach Watson-Crick von 6-7 Nukleotiden für die mRNA Zielerkennung notwendig (Lewis et al., 2003; Brennecke et al., 2005; Krek et al., 2005). Dieser als seed-Sequenz bezeichnete Abschnitt umfasst minimal die Nukleotide 2-7 am 5'-Ende der miRNA (Lewis et al., 2003; Bartel, 2009). Systematische Mutationen in dieser, aber auch in anderen Bereichen der miRNA Zielsequenz führten zu dem Ergebnis, dass die seed-Sequenz für eine Repression der Proteinbiosynthese ausreichen kann und dass eine Bindung über diese hinaus einen verstärkenden Effekt aufzeigt (Brennecke et al., 2005). Multiple Bindungsstellen für miRNAs innerhalb einer 3'-UTR können sich zudem verstärkend auf die Effizienz der negativen Regulation auswirken (Doench et al., 2003). Neben der Zielsequenz spielen aber auch strukturelle Faktoren, wie beispielsweise die Zugänglichkeit an diese, eine Rolle bei der Erkennung von miRNA-Zielen (Long et al., 2007).

Um potentielle Ziel-mRNAs von zellulären aber auch viralen miRNAs zu identifizieren, sind eine Reihe von Algorithmen entwickelt worden, welche nach konservierten Bereichen innerhalb der 3'-UTR in orthologen Genen mehrerer Spezies suchen, vor allem in der seed-Sequenz und teilweise unter Berücksichtigung von energetisch günstigen Strukturen. Anders als bei Pflanzen, bei denen miRNAs überwiegend eine vollständige Komplementaritäten zu ihrer Ziel-mRNA aufweisen, gestaltet sich die computerbasierte Methode der Zielfindung bei Tieren aufgrund partieller Homologien zu ihren Ziel-mRNAs als schwierig.

Neben bioinformatischen Methoden zur Vorhersage können auch verschiedene experimentelle Ansätze zum Nachweis von Ziel-mRNAs eingesetzt werden. Mittels Überexpression oder funktioneller Inhibierung bestimmter miRNAs kann die daraus resultierende Veränderung des gesamten mRNA Expressionprofils

einer Zelle durch Microarrays analysiert werden. Dieser Ansatz beruht auf der Tatsache, dass miRNAs nicht nur die Proteinmenge, sondern auch die Stabilität der korrespondierenden Transkripte beeinflussen können (Lim et al., 2005; Bagga et al., 2005). Ein weiterer Ansatz zur Identifikation von Ziel-mRNAs ist die Verwendung von quantitativen Proteomik-Techniken, wie beispielsweise mit zweidimensionalen Gelen oder massenspektrometrischen Quantifizierungstechniken.

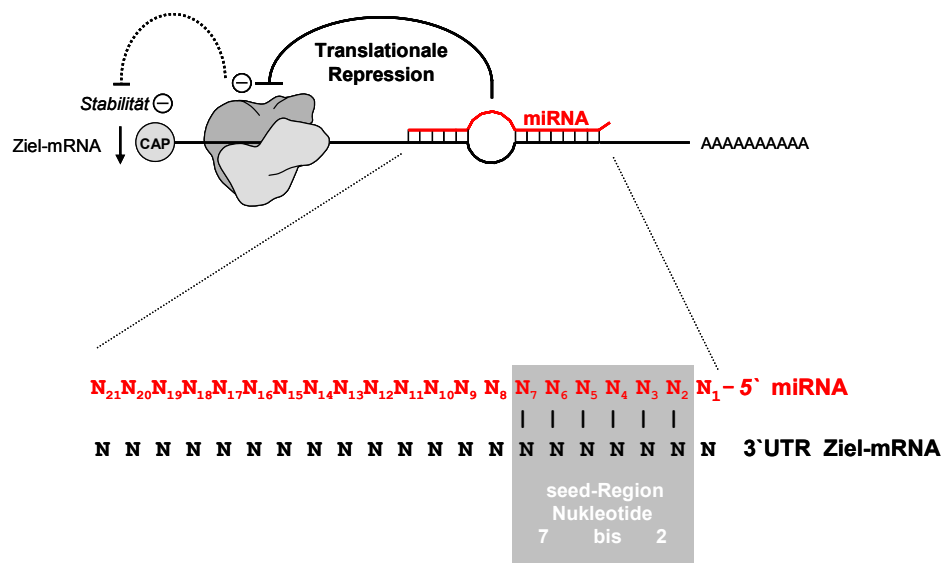


Abbildung 6: MiRNA-mRNA seed-Sequenz Interaktion. MiRNAs üben ihre Wirkung durch die Bindung an komplementäre Bereiche ihrer Ziel-mRNAs aus. Dies führt sowohl zu einer translationalen Repression als auch zu einer Destabilisierung der Ziel-mRNA. Notwendig für die mRNA Zielerkennung ist die sogenannte seed-Sequenz, welche die Nukleotide 2-7 am 5'-Ende der reifen miRNA umfasst (modifiziert nach Grundhoff).

1.4.5 KSHV-kodierte miRNAs

Der erstmalige Nachweis, dass auch Viren für miRNAs kodieren, konnte im Jahr 2004 anhand des zu den γ -Herpesviren gehörenden EBV erbracht werden (Pfeffer et al., 2004). Darauf folgend zeigte sich, dass beinahe alle bisher untersuchten Herpesviren sowohl während der latenten als auch während der produktiven Infektionsform virale miRNAs exprimieren (Umbach und Cullen, 2010). Dies lässt die Vermutung zu, dass virale miRNAs eine bedeutende Rolle in der Interaktion mit ihrem Wirt, aber auch in der Regulation des herpesviralen Lebenszyklus zu spielen scheinen. Vermutlich können virale miRNAs zur

Aufrechterhaltung der Latenz beitragen, indem sie die Expression von lytischen Genen unterbinden.

Durch Klonierung und computerbasierten Vorhersagen konnten 12 KSHV-kodierte miRNAs identifiziert werden (Cai et al., 2005; Grundhoff et al., 2006; Pfeffer et al., 2005; Samols et al., 2005). Diese werden alle innerhalb der Latenz-assoziierten Region von KSHV kodiert (siehe Kapitel 1.3.2) und sind durch partielle Komplementarität in der Lage die Translation von einigen zellulären Transkripten zu inhibieren.

In diesem Zusammenhang konnte die Thrombospondin-1 (THBS-1) Expression durch mehrere KSHV-kodierten miRNAs nach ektopischer Expression in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293) reduziert werden (Samols et al., 2007). Das THBS1 besitzt anti-proliferative sowie anti-angiogenetische Aktivitäten und ist in KS Tumoren reprimiert. Aus diesem Grunde könnte eine negative Regulation durch KSHV-kodierte miRNAs zur KS Entwicklung *in vivo* beitragen. Interessantweise konnte gezeigt werden, dass die KSHV miR-K12-11 ein Ortholog zur zellulären miR-155 darstellt und damit das Potential besitzt in das Netzwerk von Transkripten einzugreifen, die von der zellulären miR-155 reguliert werden (Gottwein et al., 2007; Skalsky et al., 2007). Die miR-155 ist eine multifunktionale miRNA und in einer Vielzahl von humanen B-Zell Lymphomen in seiner Expression erhöht (Eis et al., 2005). Seine Fehlregulation führte in einem transgenen Mausmodell zu malignen B-Zell Tumoren (Costinean et al., 2006). Zudem konnte der miR-155 eine Rolle in der adaptiven Immunantwort nachgewiesen werden, möglicherweise durch die Kontrolle der Zytokin Produktion (Thai et al., 2007). Aufgrund einer identischen seed-Sequenz ist es der miR-K12-11 und der humanen miR-155 möglich, eine überlappende Anzahl von Transkripten zu regulieren, die an der Entstehung von KSHV-assoziierten Erkrankungen beteiligt sein könnten (Nair und Zavolan, 2006). Als gemeinsame Zielmoleküle konnten FOS und BACH-1 identifiziert werden, die an apoptotischen und proliferativen Prozessen beteiligt sind (Gottwein et al., 2007; Skalsky et al., 2007). Die negative Regulation von BACH-1 durch die miR-K12-11 führte ferner zu einer erhöhten Expression von xCT, einem Aminosäuretransporter, der zuvor als KSHV Fusionsrezeptor beschrieben wurde (Kaleeba und Berger, 2006; Veettil et al., 2008; Qin et al.,

2010). Erst kürzlich konnte die durch KSHV-miRNAs vermittelte Inhibierung von BCLAF1 und p21 identifiziert werden, welche die Apoptose sowie Proliferation von Zellen regulieren (Ziegelbauer et al., 2009; Gottwein und Cullen, 2010).

1.5 Aufgabenstellung

Das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV) ist ein humanpathogenes γ -Herpesvirus. Es ist das ursächliche Agens des Kaposi Sarkoms (KS) und ist darüber hinaus mit zwei lymphoproliferativen B-Zell-Erkrankungen assoziiert, dem primären Effusionslymphom (PEL) und der Multizentrischen Castleman Krankheit (MCD). Wie bei alle Herpesviren zeichnet sich das KSHV durch zwei distinkte Phasen des viralen Lebenszyklus aus: der latenten und der lytischen Infektionsform. Innerhalb der Latenz-assoziierten Region kodiert das KSHV für einen Cluster aus 12 miRNAs, welche koordinativ während der latenten Phase des viralen Lebenszyklus exprimiert werden.

Die Existenz der KSHV-kodierten miRNAs ist erst vor wenigen Jahren nachgewiesen worden, so dass zu Beginn dieser Arbeit wenig über ihre Funktion und Bedeutung in der Biologie von KSHV bekannt war. Aufgrund ihrer Assoziation mit der latenten Infektionsform ist unsere Arbeitsgruppe daran interessiert die mögliche Rolle der miRNAs in der Aufrechterhaltung der viralen Latenz aufzuklären sowie ihre Zieltranskripte zu identifizieren und dadurch zu einem besseren Verständnis in der Pathogenese KSHV-assoziiierter Erkrankungen beitragen zu können.

Auf Grundlage dessen sollten in der vorliegenden Arbeit die phänotypischen Konsequenzen einer Inhibition der viralen miRNA Expression auf den viralen Lebenszyklus in latent infizierten PEL-Zelllinien untersucht werden. Dabei stand die Suppression von Drosha und Dicer, zwei elementare Bestandteile des miRNA-Biogeneseweges, im Vordergrund der Arbeit. Des Weiteren sollten Zellen mit einer stabilen Expression der KSHV-kodierten miRNAs generiert werden und unter Verwendung von genomischen und proteomischen Analysen zur Identifizierung von zellulären Zieltranskripten genutzt werden.

Letztendlich besteht die Hoffnung, dass die Aufklärung der Funktion viraler miRNAs zu einem besseren Verständnis in der Entstehung KSHV-assoziiierter Erkrankungen und damit der möglichen Entwicklung von wirkungsvollen Behandlungsmethoden beitragen könnte.

2 Material und Methoden

Alle benutzten Geräte und Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen: Advanced Biotechnologies, Amersham, Applied Biosystems, BDFalcon, Beckmann, Bio Rad, Biomol, Biozym, Boehringer Mannheim, Braun, Cell Signaling, Costar, Covance, Duxford, Eppendorf, GE Healthcare, Gibco, Gilson, GlassLine, Greiner, Hartenstein, Heidolph, Heraeus, Invitrogen, Knick, Kodak, Lonza, Medingen, Merck, Mettler, NatuTec, New Brunswick, New England Biolabs, PAA, PeqLab, Promega, Qiagen, Quantace, Riedel-de Haën, Roche, Rockomat Tecnomara, Roth, Santa Cruz, Sarstedt, Schleicher&Schuell, Schott, Sigma, Sorvall, Stratagene, Thermo Electron und Whatman.

2.1 Vektoren

Wenn nicht anders angegeben kodieren die verwendeten Vektoren für eine Ampizillinresistenz.

Eukaryotische Expressionsvektoren:

pcDNA3 (Invitrogen):

Enthält einen CMV (Cytomegalovirus) Promotor für die Expression in Säugetierzellen sowie einen T7 und einen SP6 RNA-Polymerase Promotor für die *in vitro* Transkription. Der Vektor enthält ein bovines Wachstumshormon Polyadenylationssignal und kodiert für eine Neomycinresistenz zur Selektion in eukaryotischen Zellen.

pcDNA3gfp+miR-K12-1-12:

Ein Derivat des pcDNA3 Vektors, in den alle von KSHV-kodierten miRNAs amplifiziert aus der BCBL-1 PEL (body cavity-based lymphoma, primary effusion lymphoma) Zelllinie eingefügt wurden. Die KSHV miR-K12-1-9 wurden unter Verwendung der Oligonukleotide miR-K12-1 Fw und miR-K12-9 Rv in die BamHI/EcoRI Schnittstelle von pcDNA3 kloniert. Die Klonierung von KSHV miR-K12-10-12 erfolgte mit Hilfe der Oligonukleotide miR-K12-10 Fw und miR-

K12-12 Rv in die XhoI/XbaI Schnittstelle. Der Vektor kodiert zusätzlich für das Reporterogen GFP (enhanced fluorescent protein).

Lentivirale Expressionsvektoren:

pSicoR (Addgene):

Ein Lentiviraler Vektor zur Expression von shRNA. Kodiert für ein Reporterogen (GFP) flankiert von LoxP-Sequenzen (locus of X-ing over) und enthält einen CMV Promotor für die Expression in Säugetierzellen. Enthält die für eine Integration notwendigen Sequenzen der LTR (Long Terminal Repeat)-Region.

pSicoR humane Dicer1 (Addgene):

Ein Derivat des pSicoR Vektors, welcher eine shRNA Sequenz zur Regulation der Genexpression der Ribonuklease Dicer1 enthält. Der Vektor kodiert zusätzlich für eine Puromycinresistenz.

pSicoR humane Drosha1 (Addgene):

Ein Derivat des pSicoR Vektors, welcher eine shRNA Sequenz zur Regulation der Genexpression der Ribonuklease Drosha1 enthält. Der Vektor kodiert zusätzlich für eine Puromycinresistenz.

LeGO iG2:

Ein Lentiviraler Expressionsvektor, welcher eine IRES (internal ribosome entry site) Sequenz gefolgt von einem Reporterogen (GFP) unter der Kontrolle eines SFFV (Spleen Focus Forming Virus) Promotors enthält. Die Expressionskassette ist flankiert von LoxP-Sequenzen. Zur Verfügung gestellt von K. Weber (Weber et al., 2008).

LeGO iG2+uPA:

Ein Derivat des LeGO iG2 Vektors zur Expression des vollständigen humanen Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) Proteins mit C-terminalem AU1 Tag. Das PCR Produkt wurde mit BCBL1 cDNA unter Verwendung der Primer uPA Fw und uPA AU1 Rv hergestellt und in die StuI/NotI Schnittstelle inseriert.

LeGO iG2+CCL3:

Ein Derivat des LeGO iG2 Vektors zur Expression des vollständigen humanen Chemokine (C-C motif) Ligand 3 (CCL3) Proteins mit C-terminalem AU1 Tag. Das PCR Produkt wurde mit BCBL1 cDNA unter Verwendung der Primer CCL3 Fw und CCL3 AU1 Rv hergestellt und in die Stul/NotI Schnittstelle inseriert.

pGagP1:

Ein Lentiviraler Verpackungsvektor (gag-pol) zur Herstellung von Lentiviren. Zur Verfügung gestellt von K. Schulz.

pRev:

Ein Lentiviraler Vektor, der das rev-Protein (regulator of expression of virion proteins) zur Herstellung von Lentiviren kodiert. Zur Verfügung gestellt von K. Schulz.

pVSV-G:

Ein Lentiviraler Vektor, der für das Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein (VSV-G) zur Herstellung von Lentiviren kodiert. Zur Verfügung gestellt von K. Schulz.

Primer:

Die Synthese aller Oligonukleotide, die für DNA-Sequenzierungsreaktionen, PCR-Amplifikationen, cDNA-Synthese, Echtzeit-RT-PCR Analysen und Northern Blot verwendet wurden, erfolgte durch die Firma Invitrogen.

2.2 Methoden der eukaryotischen Zellkultur

2.2.1 Medien, Zusätze und Lösungen der Zellkultur

DMEM (Gibco)	+0,11g/L Natriumpyruvat, mit Pyridoxin
RPMI 1640 (Gibco)	+L-Glutamine
Penizillin (PAA)	10,000 U/ml
Streptomycin (PAA)	10 mg/ml
L-Glutamin (Gibco)	200 mM
Trypsin/EDTA (PAA)	0,5/0,2 mg/ml in PBS

FKS (PAA)

Gelatine (2%)

PBS (1x, PAA)

2.2.2 Eukaryotische Zelllinien

Adhärente Zelllinien:

HEK 293:

Humane embryonale Nierenepithelzellen (ACC 305 der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), welche mit der Adenovirus Typ 5 (Ad 5) DNA stabil transformiert worden sind (Louis et al., 1997).

293-T:

Die 293-T Zelllinie ist ein Derivat der etablierten 293 Zelllinie, in die das temperatursensitive T-Antigen des SV40 inseriert worden ist (ATCC CRL-11268).

SLK:

Eine endotheliale Zelllinie, welche aus Kaposi Sarkoma Läsionen isoliert worden ist. KSHV⁻, EBV⁻ (Herndier et al., 1994).

HUVEC:

Eine humane primäre Endothelzelllinie aus der Nabelschnur.

PEL Zelllinien:

BCBL-1:

Eine humane B-Zelllinie (body cavity-based lymphoma), welche aus einem an PEL-erkrankten Patienten gewonnen wurde. KSHV⁺, EBV⁻ (Renne et al., 1996).

CroAP-3:

Eine humane B-Zelllinie, welche aus einem an PEL-erkrankten HIV⁺ Patienten ohne vorangegangenen KS Hintergrund isoliert worden ist. KSHV⁺, EBV⁻, HIV⁻ (Carbone et al., 1998).

2.2.3 Zellkulturbedingungen

Alle Zellkulturmedien enthielten Penizillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml).

HEK 293, 293-T, SLK	DMEM mit 10% (v/v) FKS
HUVEC	ECBM mit Zusätzen
BCBL-1	RPMI 1640 mit 10% (v/v) FKS
CroAP-3, HBL-6	RPMI 1640 mit 20% (v/v) FKS

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit Filterdeckel (Sarstedt) bei 37°C und 5% CO₂ bei 95% relativer Luftfeuchte im Brutschrank kultiviert und ab einer Konfluenz von 80% geteilt. Dazu wurde das Medium der adhärent wachsenden Zelllinien vorsichtig aus den Kulturflaschen entnommen und die Zellen 1x mit Trypsin/EDTA gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese nach erneuter Zugabe der Trypsin/EDTA-Lösung für ca. 5 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend in vorgewärmtem Medium resuspendiert. Ein Aliquot der vereinzelt Zellen wurde im entsprechendem Medium verdünnt und in einer sterilen Kulturflasche subkultiviert.

Die Kultivierung von HUVEC-Zellen erfolgte in mit Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen.

Die in Suspension wachsenden PEL Zelllinien wurden alle zwei bis drei Tage in einem Verhältnis von 1:5 durch Entnahme des alten Mediums und Zugabe von frischem, vorgewärmtem Medium subkultiviert. Die Aufbewahrung von Zellkulturflaschen mit Suspensionszellen erfolgte stehend.

2.2.4 Initiation einer Kultur

Zur Initiation einer Zellkultur wurde ein Aliquot aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, die Zellen bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut und mit 5 ml frischem Medium versetzt. Die Zellen wurden anschließend bei Raumtemperatur für 10 Minuten und 1200 rpm (rounds per minute) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach erneuter Resuspendierung in 5 ml frischem

Medium wurden die Zellen in eine sterile Kulturflasche überführt und bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

2.2.5 Langzeitlagerung von Zellen

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in 1 ml Fötalem Kälberserum (FKS) mit 10% DMSO resuspendiert und nach Transfer in Kryoröhrchen (Sarstedt) unter Verwendung eines mit Isopropanol gefüllten Kühlbehälters langsam bei -80°C heruntergekühlt. Nach 24 h wurden die Zellen für eine Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.6 Transiente Transfektion von Zellen

Das Einschleusen von Fremd-DNA und einzelsträngigen Antisense-Oligonukleotiden in eukaryotische Zellen erfolgte durch zwei unterschiedliche Transfektionsmethoden:

Transfektion mit Polyethylenimin:

Das Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Polyethylenimin (PEI, Sigma-Aldrich). Polyethylenimin ist ein kationisches Polymer, welches mit Nukleinsäuren lösliche Komplexe bilden kann, die das Einschleusen von DNA-Molekülen ermöglichen. Nach Aufnahme des DNA-Polykationen-Komplexes durch Endozytose quillt das Polymer durch die Erniedrigung des pH-Wertes im Lysosom auf. Das daraus resultierende Platzen des Lysosoms führt zur Freisetzung des DNA/PEI-Komplexes und wirkt damit einer intrazellulären Degradierung der DNA entgegen.

Zum Einschleusen von Plasmid-DNA wurden adhärent wachsende Zellen einen Tag vor der Transfektion so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 50% erreichen konnten. Dazu wurden 2×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgebracht. Pro Transfektionsansatz wurde 2 µg DNA in serumfreiem Opti-MEM Medium (Invitrogen) auf ein Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt. Nach Zugabe von 5 µl PEI wurde der Ansatz kurz durchmischt, abzentrifugiert und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. In dieser Zeit wurde das Kulturmedium von den Zellen entnommen und durch 1,5 ml Opti-MEM Medium ersetzt. Das DNA-Transfektionsgemisch wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken der Zellen wurde für eine gleichmäßige Verteilung des Ansatzes gesorgt. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden bei 37°C im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch die Zugabe von frischem Zellkulturmedium ersetzt. Abschließend wurden die Zellen 48 Stunden später am Fluoreszenz-Mikroskop (siehe Kapitel 1.5.7) analysiert und dokumentiert, geerntet und weitere Untersuchungen durchgeführt.

Transfektion mit Lipofectamin 2000:

Lipofektamin 2000 (Invitrogen) ist ein kationisches Lipid, dessen Oberfläche in der Lage ist DNA-Moleküle zu komplexieren. Die daraus resultierende Neutralisierung der negativen Ladung der DNA in positiv geladene DNA-Lipid-Komplexe ermöglicht die Fusion mit der Zellmembran und das Einschleusen in die Zelle.

Eine funktionelle Charakterisierung von einzelnen miRNA erfolgte durch die Lipofectamin 2000 vermittelte Transfektion von kurzen, chemisch modifizierten Oligonukleotiden (2'-O-Methyl RNA), die gegen Ziel-miRNA gerichtet sind. Dafür wurden (Vero Zellen) adhärent wachsende Zellen einen Tag vor der Transfektion mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch - Platte ausplattiert, so dass diese zum Zeitpunkt der Transfektion zu 50% konfluent waren. Für die Transfektion wurden zunächst 5 µl Lipofectamin 2000 in 245 µl serumfreien Opti-MEM Medium aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden 5 µl der einzelsträngigen Oligonukleotide (20 µM) in Opti-MEM Medium verdünnt und mit der Lipofectamin-Lösung vereinigt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die tropfenweise Zugabe der Transfektionslösung zu den Zellen. Um Aussagen über die Transfektionseffizienz treffen zu können wurden gleichzeitig Zellen mit einer Fluorescein Isothiocyanit (FITC) markierten Negativkontroll-siRNA transfiziert (ALLStars siRNA, Qiagen).

2.2.7 Elektroporation von Zellen

Bei der Elektroporation von Zellen ist es möglich durch einen kurzen elektrischen Impuls die Zellmembran permeabel zu machen, dass die Zellen DNA aus ihrer Umgebung aufnehmen können. Dazu wurden $1,5 \times 10^7$ in Suspension wachsende Zellen pelletiert, zweimal mit dem entsprechenden Zellkulturmedium ohne Zusätze gewaschen und in 480 μl desselben Mediums resuspendiert. Nach dem Überführen des Ansatzes in Elektroporationsküvetten (Molecular BioProducts) wurden die Zellen mit 20 μg zuvor linearisierter DNA luftblasenfrei vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Elektroporation der Zellen bei 240 V und 950 μF (Gene Pulser Xcell, BioRad). Die Zellen wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend im Zellkulturmedium mit Zusätzen kultiviert.

Herstellung stabiler Zelllinien:

Für die Herstellung stabiler Zelllinien wurden die elektroporierten Zellen 48 Stunden nach Behandlung durch die Zugabe von 100 $\mu\text{g/ml}$ Neomycin selektioniert. Die Zellen wurden solange unter Selektion gehalten, bis die untransfizierten Zellen gestorben waren.

2.3 Methoden der prokaryotischen Kultur

2.3.1 Bakterienstamm

E.coli DH5 α (Invitrogen):

F⁻, *dcoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (rk⁻, mk⁺), *supE44* 1-, *thi-1*, *gyr A96*, *relA1*

2.3.2 Kulturmedien und Wachstumsbedingungen

LB (Lysogeny broth)-Medium (Lennox/Roth):

10 g/L Trypton

5 g/L Hefeextrakt

5 g/L NaCl

pH 7.0

Agarplatten:

LB-Medium mit 15 g/L Agar-Agar (Roth)

Für die Anzucht von *E.coli* DH5 α in Flüssigkulturen wurde steriles LB-Medium mit einer Einzelkolonie von Agarplatten oder Glyzerinkulturen inokuliert und zur Selektion der Bakterien mit Ampizillin (100 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 37°C und 220 UpM in einem Inkubationsschüttler inkubiert.

Langzeitlagerung von Bakterienkulturen:

Für eine Langzeitlagerung von Bakterienkulturen wurden 500 μ l einer Übernachtkultur mit 500 μ l sterilem Glyzerin (87%) versetzt, in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.3 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Die Herstellung von chemisch-kompetenten Bakterien erfolgte durch die Rubidiumchlorid-Methode. Ausgehend von einem Verdünnungsausstrich des Bakterienstammes *E.coli* DH5 α wurden 500 ml LB_{KB}-Medium inokuliert und über Nacht in einem Inkubationsschüttler bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Bakterienkultur für 15 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 3000 x g für 5

Minuten sedimentiert. Nach Zugabe von 150 ml eiskaltem Transformationspuffer I (TFB I) und einer Inkubationszeit von 60–90 Minuten auf Eis erfolgte eine erneute Zentrifugation (4°C, 3000 x g, 5 Minuten). Abschließend wurden die Bakterien in 30 ml eiskaltem Transformationspuffer II (TFB II) resuspendiert, aliquotiert (250 µl) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C.

<u>LB_{KB}-Medium:</u>	500 ml LB-Medium 10 mM KCl 8 mM MgSO ₄
<u>TFB I:</u>	100 mM RbCl ₂ 30 mM K acetat 10 mM CaCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 15% (v/v) Glyzerin pH 5,8 mit CH ₃ COOH
<u>TFB II:</u>	10 mM RbCl ₂ 10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glyzerin

2.3.4 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Für jede Transformation wurde der Ligationsansatz (siehe Kapitel 1.4.4) mit 100 µl kompetenter *E. coli* DH5α Bakterien in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließendem Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden im Wasserbad folgte eine Inkubation für 5 Minuten auf Eis. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurde der Ansatz für 45 Minuten bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur und 3000 x g für

2 Minuten abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Sediment in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Abschließend wurde der Ansatz zur Selektion auf LB-Platten mit Ampizillin (100 µg/ml) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von kleinen Mengen Plasmid-DNA wurde das Plasmid Miniprep Kit (peqLab) laut Herstellerangaben verwendet. Zur Plasmidpräparation wurde eine Bakterienkolonie in 5 ml Flüssigkulturmedium versetzt mit Ampizillin inokuliert und über Nacht schüttelnd im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Diese wurde am nächsten Tag für 10 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert und der resultierende Überstand verworfen. Die pelletierten Bakterien wurden den Anweisungen des Herstellers folgend weiterverarbeitet und die isolierte DNA in 50 µl H₂O aufgenommen.

Für die Isolierung von größeren Mengen an Plasmid-DNA wurde das QIAprep Spin Maxiprep Kit (Qiagen) verwendet. Hierfür wurden 120 ml LB-Flüssigmedium mit Ampizillin (100 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler bei 220 rpm inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte auch hier den Anweisungen des Herstellers entsprechend und wurde anschließend in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Bestimmung der Reinheit und Konzentration der isolierten DNA erfolgte mittels Spektrofluorometer (Nanodrop ND-1000, peqlab).

<u>TE-Puffer:</u>	10 mM Tris-HCL pH 7,6
	1 mM EDTA pH 8,0

2.4.2 Restriktionsanalysen

Zur Spaltung von DNA wurden FastDigest (Fermentas) Restriktionsenzyme verwendet, die es ermöglichen DNA in relativ kurzer Zeit unter Verwendung eines Puffers zu verdauen. Für analytische Restriktionsanalysen wurden

0,5–1 µg DNA eingesetzt und in einem Wasserbad für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Präparative Restriktionsanalysen wurden mit 2 µg DNA durchgeführt. Alle Ansätze hatten ein Endvolumen von 25 µl und wurden anschließend in einem Agarosegel (siehe Kapitel 1.4.7) analysiert.

2.4.3 Dephosphorylierung von DNA

Um eine intramolekulare Religation der gespaltenen Plasmid-DNA zu verhindern wurden die 5'-Phosphatgruppen hydrolytisch entfernt. Dazu erfolgte direkt nach dem Restriktionsverdau eine Behandlung des Ansatzes mit alkalischer Phosphatase (CIP, New England Biolabs) den Angaben des Herstellers folgend. Anschließend wurde die Plasmid-DNA elektrophoretisch getrennt und aus dem Agarosegel isoliert (siehe Kapitel 1.4.8).

2.4.4 Ligation

Vermittelt durch das Enzym Ligase (T4 DNA Ligase, Invitrogen) werden überhängende komplementäre oder glatte Enden doppelsträngiger DNA miteinander verknüpft. Dazu wurde ein Verhältnis vom Insert zum Vektor von 3:1 verwendet und der Ansatz in einem Gesamtvolumen von 10 µl über Nacht bei 16°C inkubiert. Die Ligation von PCR-Produkten erfolgte nach deren Isolierung gegebenenfalls mit Hilfe der TA-Klonierung. Durch die Aktivität der Taq-Polymerase werden einzelne Adenosin-Überhänge an das 3'-Ende der amplifizierten DNA angefügt. Der linearisierte Vektor des verwendeten Systems (pCR 2.1, TA Cloning Kit, Invitrogen) besitzt an seinen 5'-Enden einzelne Thymidinreste, die kovalent mit einer DNA-Topoisomerase verknüpft sind und somit eine effiziente Ligation mit PCR-Produkten ermöglicht.

2.4.5 Amplifikation von DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Amplifikation (Saiki et al., 1988) von definierten DNA-Fragmenten. Standardmäßig wurde die PCR-Reaktion in einem Gesamtvolumen von 25 µl in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt und enthielt die folgenden

Komponenten: 200 ng Template-DNA, zwei spezifische Primer (10 mM), dNTPs (10 mM), 10 x PCR-Puffer, 2,5 U/μl Taq/Pfu-Polymerase (8:1) und H₂O. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mit den entsprechenden in Tabelle 2 aufgelisteten Oligonukleotiden in einem Thermocycler (AB Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 9700) amplifiziert. In Abhängigkeit der Eigenschaften der eingesetzten Template-DNA, wie beispielsweise ihr GC-Gehalt, sowie der errechneten optimalen Anlagerungstemperatur der Primer [$4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) - 5^{\circ}\text{C}$] und Größe des zu amplifizierenden PCR-Fragments, wurde die Dauer von Denaturierung, Anlagerung und Elongation ausgewählt.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3' Orientierung angegeben. Die Bezeichnungen setzen sich aus dem Namen des zu amplifizierenden Fragments und der Kennzeichnung Fw (vorwärts) oder Rv (rückwärts) zusammen. Durch Primer eingeführte Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme sind in den Sequenzen fett dargestellt. Eingefügte AU1-Tags sind kursiv dargestellt.

Bezeichnung	5'-3' Sequenz
KSHV-miR-K12-1 BamHI Fw	CAGGGATCCTTCTGTTTGAAGGCGAAT
KSHV-miR-K12-9 EcoRI Rv	AGCGAATTCGTAGTCCGCTGGTATTCC
KSHV-miR-K12-10 XhoI Fw	AGCCTCGAGTCAATACATTCTGAGGGA
KSHV-miR-K12-12 XbaI Rv	AGCTCTAGATCAATACATTCTGAGGGA
uPA Stul Fw	AGCAGGCCTACCATGAGAGCCCTGCTGGCGC
uPA AU1 NotI Rv	CAGGCGGCCGCTTAGATGTATCGATACGTATC GAGGGCCAGGCCATTCTCT
CCL3 Stul Fw	AGCAGGCCTACCATGAGAGCCCTGCTGGCGC
CCL3 AU1 NotI Rv	CAGGCGGCCCTTAGATGTATCGATACGTATCGG CACTCAGCTCCAGGT
14-3-3z Stul Fw	AGCAGGCCTACCATGGATAAAAATGAGCTGGT
14-3-3z NotI Rv	CAGGCGGCCAGTTGGAAGGCCGGTTAA

2.4.6 DNA-Sequenzierung

Um die Sequenz von PCR amplifizierten und nachfolgend klonierten DNA-Abschnitten zu überprüfen wurde der DNA-Sequenzierservice der GATC Biotech AG (Konstanz) in Anspruch genommen. Die DNA-Sequenzierung hat die Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) zur Grundlage. Sie erfolgt unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonukleotiden

(ddNTPs), die bei der DNA-Synthese nach Einbau durch die DNA-Polymerase zum Kettenabbruch führen.

Die zu sequenzierende Plasmid-DNA wurde den Angaben des Unternehmens folgend auf 100 ng/ μ l in einem Gesamtvolumen von 30 μ l mit H₂O verdünnt und gegebenenfalls mit dem entsprechen Sequenzier-Oligonukleotid verschickt. Nach Erhalt der Sequenzierdaten wurden diese unter Verwendung der Software CLC Workbench (CLC Bio) dargestellt und analysiert.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Sequenzier-Oligonukleotide. Die Sequenzen der Oligonukletide sind in 5'-3' Orientierung angegeben.

Bezeichnung	5'-3' Sequenz
LeGO iG2-Seq_fw	GCTTCTCGCTTCTGTTTCGC
LeGO iG2-Seq_rv	CATATAGACAAACGCACACCG
LeGO-pG-Seq	AGGAAACTCACCTAACTGTAAAG

2.4.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 0,1-10 kb erfolgte elektrophoretisch mittels 1-2%igen Agarosegelen in TAE-Laufpuffer. Dazu wurde zunächst die entsprechende Menge Agarose im 1 x TAE-Puffer aufgeköcht und vor dem Gießen, nach erfolgter Abkühlung der Gellösung auf ca. 50°C, Ethidiumbromid in einer finalen Konzentration von 0,1 μ g/ml zugegeben. Die DNS-Proben wurden mit 6x Ladepuffer (Fermentas) versetzt und zum Größenvergleich ein DNA-Standard (10 kbp DNA Gene-Ruler, Fermentas) eingesetzt. In der Regel wurde die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 100 Volt in einer Gelkammer (Bio-Rad) durchgeführt. Abschließend wurden Fragmente zur Visualisierung unter UV-Licht ausgewertet und zur Dokumentation fotografiert (Quantity One, Bio-Rad).

10 x TAE-Puffer:
400 mM Tris-acetate
20 mM EDTA
pH 8,5

2.4.8 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurden unter geringer UV-Licht Intensität (UV-Transilluminator, GelDoc 2000, BioRad) die gewünschten Fragment-Banden mit Hilfe eines Skalpells herausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Invitrogen) überführt und anschließend gewogen. Die Aufreinigung erfolgte in Abhängigkeit des Gewichts durch das QIAquick Gel Extraction Kit nach Protokollvorlagen des Herstellers Qiagen. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte in 30 µl H₂O.

2.4.9 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde mittels RNA-Bee (Ambion) den Angaben des Herstellers folgend durchgeführt. Diese Methode basiert auf der sauren Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski und Sacchi et al., 1987). Das gewonnene Präzipitat wurde je nach Größe in 10-30 µl RNase-freiem mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem H₂O gelöst. Die Bestimmung der Konzentration und Integrität der RNA wurde spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt (Nanodrop, peqLab). Die Langzeitlagerung der isolierten RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C.

Aufreinigung und DNase-Verdau

Sollten im Anschluss Genexpressionsanalysen (siehe Kapitel 1.7) durchgeführt werden, deren Ergebnisse aufgrund der hohen Empfindlichkeit sehr stark von der Qualität der eingesetzten RNA abhängen, erfolgte eine Aufreinigung der isolierten RNA mittels der RNeasy-Spinsäulen Technologie (Qiagen). Mit der nach Herstellerangaben durchgeführten Aufreinigung konnte eine RNA gewonnen werden, welche frei von Kontaminationen wie Phenol oder Chloroform war.

Um eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA aus der isolierten RNA für eine nachfolgende cDNA Synthese zu verhindern wurde ein DNase I Verdau (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.4.10 Reverse Transkription (RT)

Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die erstmals in RNA-Tumorviren entdeckt worden ist (Baltimore et al., 1970; Termin und Mizutani, 1970). Die verwendete SuperScript III Reverse Transkriptase (Invitrogen) ist eine genetisch modifizierte Reverse Transkriptase des Moloney Leukämievirus der Maus mit vermindeter RNase-H Aktivität. Dieses Enzym ist in Gegenwart von spezifischen oder zufällig bindenden Oligonukleotidprimern, die einen Pool verschiedenartiger cDNA erzeugen, in der Lage eine komplementäre DNA (cDNA) mit RNA als Substrat zu synthetisieren.

Zur Herstellung einzelsträngiger cDNA wurden 0,5–1 µg der zuvor mit DNase I behandelten RNA eingesetzt und eventuell vorhandene RNAsen durch die Zugabe von 1 µl RNaseOUT inaktiviert. Ein Mix bestehend aus den Oligo(dT) Primern (10 µM) und dNTPs (10 µM) wurden zur RNA hinzugegeben und mit DEPC-behandeltem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 13 µl gebracht. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 65°C, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen, wurde das Gemisch für mindestens 2 Minuten auf Eis überführt. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von 4 µl 5 x First Strand Buffer, 1 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNaseOUT (40 U/µl) und 1 µl SuperScript III (200 U/µl). Der Ansatz wurde zunächst 5 Minuten bei 25°C und nachfolgend für 60 Minuten bei 50°C inkubiert. Die Denaturierung der reversen Transkriptase erfolgte für 15 Minuten bei 75°C. Alle Inkubationsschritte wurden in einem Thermocycler (AB Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 9700) durchgeführt.

Die Proben wurden abschließend für 20 min bei 37°C mit RNase H (2 U/µl, NEB) behandelt und für die Analyse mittels Echtzeit RT-PCR oder semi-quantitativer RT-PCR in einem Verhältnis von 1:5 mit DEPC-behandeltem H₂O verdünnt. Die Langzeitlagerung erfolgte bei – 20°C.

2.4.11 Semi-quantitative RT-PCR

Zur Durchführung einer semi-quantitativen RT-PCR wurde mittels reverser Transkription zunächst cDNA aus Gesamt-RNA gewonnen (siehe Kapitel 1.4.10). Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes entsprach dem Standardprotokoll für PCR-Reaktionen (siehe Kapitel 1.4.10). Um semi-

quantitative Unterschiede zwischen verschiedenen Proben in der Menge des PCR-Produktes untersuchen zu können, war es erforderlich die PCR-Reaktion vor dem Erreichen der Plateau-Phase zu beenden. Als interner Standard wurde das Transkript der Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die amplifizierte cDNA wurde über ein 2%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und zur Dokumentation fotografiert.

2.4.12 Quantitative Echtzeit-RT-PCR

Die Echtzeit-RT-PCR (RT-qPCR) ist eine spezifische und hochsensitive Methode zur relativen und absoluten Quantifizierung von RNA in Echtzeit. Ihr liegt das Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu Grunde und beginnt mit der Reversen Transkription von Gesamt-RNA in cDNA (siehe Kapitel 1.4.10). Die Quantifizierung erfolgt durch die Messung eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR-Green I) am Ende der Elongationsphase eines jeden PCR-Zyklus. SYBR-Green ist ein unsymmetrischer Cyaninfarbstoff, der sich in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA (dsDNA) einlagert und erst dabei seine Fluoreszenzeigenschaften ausbildet. Es eignet sich somit, um die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte sichtbar zu machen. Die Fluoreszenz nimmt hierbei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Zwischen Startphase, in der Hintergrundsignale diejenigen des PCR-Produktes überlagern, und der Plateauphase, in der angereicherte Produktfragmente hemmend auf die PCR wirken, liegt die exponentielle Phase. Der Anfang der exponentiellen Phase wird hierbei zur Quantifizierung herangezogen. Der Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt wird als Ct-Wert (Threshold Cycle) bezeichnet. Da SYBR-Green sich auch unspezifische an PCR-Produkte anlagern kann setzt die Verwendung und das Design von hochspezifischen Oligonukleotidprimern voraus, um einen Anstieg der Fluoreszenzsignale durch Primer-Dimere und unspezifische PCR-Produkte zu verhindern. Für einen zuverlässigen quantitativen Nachweis von mRNA wurden nachstehend aufgeführte Punkte eingehalten:

Auswahl von Primern:

Um den mRNA Gehalt eines Gens von Interesse zu untersuchen, müssen zunächst Intron-überspannende Oligonukleotidprimer entworfen werden. Hierzu wurde ein öffentlich zu nutzendes Software-Programm zu Hilfe genommen (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), welches die Primersuche und Analyse auf eventuelle Sekundärstrukturen durch zueinander komplementäre Bereiche kombiniert. Die auf diese Weise generierten Primer erfüllten folgende Parameter: Sie besaßen eine ähnliche Schmelztemperatur, wiesen eine Länge von 19–22 Basenpaare (bp) sowie einen GC-Gehalt von 40–60% auf und führten zur Amplifizierung von PCR-Fragmenten mit einer Länge von 80–300 bp.

Primer-Optimierung:

Um eine optimale Spezifität der ausgewählten Primer zu gewährleisten wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt und anschließend mittels Agarose-Gel-elektrophorese analysiert (siehe Kapitel 1.4.7). Auf diese Weise wurden die Primer auf ihre Spezifität überprüft und darüber hinaus die optimale Anlagerungstemperatur ermittelt.

Schmelzkurvenanalyse:

Da SYBR-Green in der Lage ist sequenzspezifisch an jede amplifizierte dsDNA zu binden wurde nach jeder abgeschlossenen PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierzu wurde die Temperatur kontinuierlich erhöht und die Fluoreszenz gemessen, wobei sich in Abhängigkeit der jeweiligen Schmelzpunkte die amplifizierte dsDNA in ihre Einzelstränge auftrennt. SYBR-Green ist nun nicht mehr in der Lage zu Interkalieren wobei die Abnahme des Fluoreszenzsignals gemessen und in Form einer spezifischen DNA-Schmelzkurve angezeigt werden kann. Für die Analysen wurden ausschließlich Primer verwendet, welche nur einen Schmelzkurvenpunkt erzeugten. Mehrere Schmelzpunkte weisen auf unspezifische Nebenprodukte und solche bei 75°C auf Primer-Dimere hin.

Standardkurve:

Für jedes Primerpaar wurde die PCR-Effizienz mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der eingesetzten cDNA analysiert (1:10 Verdünnungen, über 5 log Stufen). Aus der Abhängigkeit vom Ct-Wert zur jeweils eingesetzten cDNA-Menge wurde unter Verwendung der Analyse-Software eine relative Standardkurve ermittelt. Diese wurde verwendet, um unbekannte Proben zu analysieren. Für jede Probe konnten relative Mengen erhalten werden, die anschließend, wie unter relative Quantifizierung und Auswertung beschrieben, Normalisiert wurden. Die Effizienz der Reaktion lässt sich dann aus der Steigung der Standardkurve berechnen. Eine optimale Effizienz ergibt sich, wenn die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus verdoppelt wird.

Kontrollen:

Bei RT-PCR-Reaktionen sind DNA-Kontaminationen eine große Fehlerquelle, so dass das Mitführen von Negativkontrollen notwendig ist. Um Kontaminationen durch DNA ausschließen zu können wurde ein Ansatz ohne erfolgte Reverse Transkription mitgeführt (-RT). Verunreinigungen der Reagenzien konnten durch die Verwendung eines DNA-Matrizen losen Reaktionsansatzes kenntlich gemacht werden.

Relative Quantifizierung und Auswertung:

Die Berechnung der Expressionswerte erfolgte sowohl unter Berücksichtigung der Angaben der Standardkurve als auch der Expressionsdaten des Zielgens in Form von biologischen Triplikaten. Die Quantifizierung erfolgte nach der relativen Quantifizierungsstrategie. Hierbei wird die Transkriptionsmenge des Zielgens auf ein nicht reguliertes Haushaltsgen (Housekeeping Gen) in derselben Probe bezogen, um mögliche Varianzen bei der RNA-Isolierung und Reversen Transkription zu korrigieren. Als endogene Kontrolle wurde GAPDH verwendet. Der Transkriptionsgehalt jeder Probe wurde ermittelt und auf das eines Referenzgens bezogen.

Die Echtzeit-RT-PCR Analysen wurden im Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science) durchgeführt und mit Hilfe der dazugehörigen Software (Rotor-Gene

6000) ausgewertet. Dazu wurde pro Ansatz ein Mix aus den Oligonukleotidprimern (10 μ M, siehe Tabelle 3) und 2 x SYBR-Green (SensiMixPlus, Quantance) mit DEPC-behandeltem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 18,5 μ l gebracht. Anschließend wurde der Ansatz mit 1,5 μ l der zuvor verdünnten cDNA (siehe Kapitel 1.4.10) versetzt. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt und von jeder Probe Duplikate angefertigt. In Abhängigkeit der sorgfältig ermittelten Anlagerungstemperatur der Primer sowie der Größe des Amplikons wurde die Dauer von Denaturierung, Anlagerung und Elongation gewählt.

Tabelle 3: Übersicht aller Oligonukleotide, die in der quantitativen Echtzeit-RT-PCR verwendet wurden. Die Sequenz der Oligonukleotide ist in 5'-3' Orientierung angegeben (bp=Basenpaare). Die Bezeichnungen setzten sich aus dem Namen des zu amplifizierenden Fragments und der Kennzeichnung Fw (vorwärts) oder Rv (rückwärts) zusammen.

Bezeichnung	5'-3' Sequenz	T _M	Größe des Amplikons
GAPDH-Fw	GGTCGGAGTCAACGGATTTG	55°C	300 bp
GAPDH-Rv	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTG		
ORF50-Fw	GAGAATACTGTCCAGGCAGCCAC	58°C	113 bp
ORF50-Rv	AGTTGGGCCTTCAGTTCGTCC		
ORF59-Fw	TTCGTTGGAGTGCCAAATCAGC	58°C	90 bp
ORF59-Rv	CGGGTTAGCCTGGAGTCCTTAATC		
Drosha-Fw	AGCTGCTCGGCCTCCGTGGGAAC	53°C	82 bp
Drosha-Rv	AGACTCACACTCGGATTCAGTGG		
Dicer-Fw	TGGGTCCTTTCTTTGGACTG	57°C	141 bp
Dicer-Rv	TCTTCCCTGAGCCAGTGTTT		
PLAU-Fw	TCACCACCAAATGCTGTGT	55°C	125 bp
PLAU-Rv	CCAGCTCACAATTCCAGTCA		

2.4.13 Small RNA Northern Blot

Für den Expressionsnachweis von miRNAs wurde die aus Zellen isolierte Gesamt-RNA (siehe Kapitel 1.4.9) zunächst in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Dazu wurden für ein Gel (8,5 cm x 8,5 cm, 1,5 mm Dicke) 5,8 g Harnstoff mit 3 ml DEPC-behandeltem H₂O, 1,4 ml 10 x TBE sowie 4,7 ml Acrylamid/Bis (30%, 19:1) versetzt und unter Rühren bei 30°C erhitzt. Nachdem der Harnstoff vollständig gelöst war, wurden dem Ansatz 8 µl TEMED und 80 µl APS (10%) hinzugeben, um die Polymerisierung des 10%igen Polyacrylamidgels einzuleiten. Die Lösung wurde in eine Gelkammer gegossen und vollständig auspolymerisiert. Nachfolgend schloss sich ein Vorlauf des Gels bei 45 mA für 45 Minuten an. In dieser Zeit wurden die RNA-Proben für das Auftragen vorbereitet. Hierzu wurden 14 µg Gesamt-RNA in DEPC-behandeltem H₂O auf ein Volumen von 15 µl gebracht und mit gleichem Volumen Ladepuffer versetzt. Um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen erfolgte eine Inkubation der Proben für 2 Minuten bei 70°C, die im Anschluss daran auf Eis gelagert wurden. Vor dem Beladen wurden die Taschen des Gels mit Laufpuffer gespült und die Proben zusammen mit einem Größenstandard (Ultra low range DNA-Ladder, Fermentas) aufgetragen. Die Auftrennung der RNA erfolgte für 1 Stunde bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA.

Um anschließend die Qualität und Quantität der RNA beurteilen zu können, wurde das Gel mit Ethidiumbromid (0,4%) gefärbt und zur Dokumentation fotografiert (Quantity One, BioRad). Nach dem Waschen des Gels im Laufpuffer erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran (Zeta-Probe GT, Bio-Rad) mittels Semi-Dry-Elektroblot-Verfahren für 2 Stunden bei 150 mA. Die Membran wurde anschließend luftgetrocknet und die RNS durch UV-Bestrahlung (cross linking, 1200 x 100 µJoules) auf der Membran fixiert.

Radioaktive Markierung von Oligonukleotid-Sonden:

Die verwendeten Oligonukleotid-Sonden (siehe Tabelle 4) wurden über einen Enzym-katalysierten Transfer des radioaktiv markierten γ -Phosphates von γ^{32} -ATP (Hartmann Analytic) am 5'Ende markiert. Hierzu wurden 10 U/µl des Enzyms T4 Polynukleotid Kinase (T4 PNK, USB), welches den Phosphat-

gruppentransfer katalysiert, sowie 20 pmol des entsprechenden Oligonukleotids zusammen mit 10 x PNK Puffer (USB) mit DEPC-behandeltem H₂O auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von γ^{32} -ATP (250 mCi/ml) erfolgte die Inkubation des Ansatzes für eine Stunde bei 37°C. Die Reaktion wurde anschließend bei 65°C für 10 Minuten gestoppt und überschüssiges γ^{32} -ATP nachfolgend durch die Aufreinigung über Säulen (MicoSpin G-25 Columns, GE Healthcare) den Angaben des Herstellers folgend aus dem Reaktionsansatz entfernt.

Hybridisierung und Waschen von Northern Blots:

Zur Hybridisierung wurde die Nylonmembran in Lösung I angefeuchtet und anschließend in ein Hybridisierungsröhrchen überführt. Nach Zugabe von 10 ml vorgewärmtem Hybridisierungspuffer (ExpressHyb Hybridization Solution, Clontech) erfolgte zunächst die Prähybridisierung der Membran für eine Stunde bei 37°C im Hybridisierungsöfen (peqlab). Die radioaktiv markierte Sonde wurde anschließend in das Röhrchen pipettiert und zusammen mit der Membran bei 37°C über Nacht hybridisiert. Am nächsten Tag erfolgte das Waschen der Membran. Diese wurde zunächst bei 37°C für 30 Minuten in vorgewärmtem Waschpuffer gewaschen. Die zwei darauffolgenden Waschritte erfolgten bei Raumtemperatur in nicht vorgewärmtem Waschpuffer.

Detektion von miRNAs:

Zur Detektion wurde die gewaschene Membran in Klarsichtfolie verpackt und zusammen mit einer Verstärkerfolie in eine Expositionskassette überführt. Abschließend wurde zum Visualisieren der Signale ein Photofilm (BioMax Transscreen HE, Kodak) auf die Membran gelegt und die Kassette für 3 Tage bei -80°C gelagert.

Entfernen von hybridisierten Sonden:

Sollten auf der Membran nachfolgend weitere Sonden hybridisiert werden, so wurde die Membran für 2 Stunden in Ablöse-Puffer inkubiert. Um zu überprüfen, ob das Entfernen zuvor gebundener Sonden erfolgreich war, wurde erneut ein Photofilm aufgelegt. Waren keine Signale mehr zu detektieren wurde die

Membran anschließend in Waschlösung gewaschen und bis zur weiteren Verwendung trocken gelagert.

Ladepuffer: 95% (v/v) Formamid
0,09% (w/v) Bromphenolblau
0,09% (x/v) Xylene Cyanol FF

Laufpuffer: 89 mM Tris-Base
89 mM Borsäure
20 mM EDTA pH 8,0
ddH₂O

20 x SSC: 3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
pH 7,0 mit 1 M HCL

Lösung I: 2 x SSC

Waschpuffer: 2 x SSC
0,1% SDS

Ablöse-Puffer: 0,5% SDS

Tabelle 4: Oligonukleotid-Sonden für den Nachweis von KSHV-kodierten miRNA mittels Small RNA Northern Blot.

Bezeichnung	Sequenz
KSHV-miR-K12-1	GCTTACACCCAGTTTCCTGTAAT
KSHV-miR-K12-2	CAGATCGACCCGGACTACAGTT
KSHV-miR-K12-4-5p	CCTAGAGTACTGCGGTTTAGCT
KSHV-miR-K12-6-5p	CCGATGGATTAGGTGCTGCTGG
KSHV-miR-K12-7	AGCGCCAGCAACATGGGATCA
KSHV-miR-K12-8	CGTGCTCTCTCAGTCGCGCCTA
KSHV-miR-K12-9*	AGCGGGGTTTACGCAGCTGGGT
KSHV-miR-K12-10	GCCACTCGGGGGGACAACACTA
KSHV-miR-K12-11	TCGGACACAGGCTAAGCATTA

2.5 Biochemische und Zellbiologische Techniken

2.5.1 KSHV-Virusstock-Präparation

Die virale Reaktivierung von KSHV und damit die Produktion von infektiösen Viruspartikeln kann *in vitro* nach Stimulation von PEL-Zelllinien induziert werden. Hierfür wurden BCBL-1 Suspensionszellen mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät und zur Produktion von Virusstock mit Natrium-Butyrat (0,3 mM), einem Histon-Deazetylase-Inhibitor, behandelt. Die daraus resultierende verminderte Repression durch Chromatin aktiviert Signal-Kaskaden, die stimulierend auf die Expression von lytischen Genen wirken. Nach einer fünftägigen Inkubation der Zellen bei 37°C im Brutschrank wurde der infektiöse Überstand vorsichtig entnommen und mit Hilfe eines Filters (0,45 µm Porengröße, Millipore) steril filtriert. Um eine höhere Viruskonzentration zu erhalten wurden im Anschluss daran die Virionen bei 13 000 rpm und 4°C für 2 Stunden präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und die infektiösen Viruspartikel mit EBM2 Medium in einem Hundertstel des Ausgangsvolumens resuspendiert. Der gewonnene virushaltige Überstand wurde zur Unterstützung der Infektion mit Polybrene (8 µg/ml) versetzt und direkt zur Infektion von Zielzellen verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.2 Infektion von Zellen mit KSHV

Zur Infektion von Zellen mit KSHV wurden adhärent wachsende Zellen mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen in einer 6-Loch-Platte auf sterilen Objektträgern ausgesät. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit EBM2 Medium erfolgte die Zugabe von EBM2/Polybrene Medium und Virusstock in einem Verhältnis von 2:1. Die Zellen wurden für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend das Infektionsmedium durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. In Abhängigkeit des zu untersuchenden Zeitpunktes erfolgte eine Immunfluoreszenz-mikroskopische Analyse (siehe Kapitel).

2.5.3 Durchflusszytometrie

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS-Analyse) dient der Auftrennung spezifisch markierter Zellen. Diese werden beispielsweise an Fluoreszenz-markierte Antikörper gebunden bzw. exprimieren GFP und werden anschließend in einer Fließkammer an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. In Abhängigkeit der physikalischen Eigenschaften der Zellen sowie der Fluoreszenzeigenschaften des verwendeten Farbstoffs kommt es zur Streuung und zur Lichtemission durch die Fluorochrome. Das gestreute und emittierte Licht, das sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle verhält, wird dabei durch Photodetektoren registriert. Von jeder Zelle kann somit die Größe, Granularität, Fluoreszenzart und –intensität bestimmt werden.

Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen geerntet, in FACS-Röhrchen überführt und einmal mit PBS gewaschen. Nach anschließender Aufnahme der Zellen in FACS-Puffer (1% FKS in PBS) erfolgte die Analyse an einem FACSCanto (Beckton-Dickinson) Durchflusszytometer. Die Daten wurde mit Hilfe der Software FACSDiva generiert und verarbeitet.

2.5.4 Intrazelluläre FACS-Färbung

Zur Detektion von intrazellulären Proteinen mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS-Analyse, siehe Kapitel 1.5.4) erfolgte zunächst eine Fixierung der Zellen. Dazu wurden die in Suspension wachsenden Zellen in FACS-Röhrchen überführt und bei 800 rpm für 5 Minuten pelletiert. Nach einem

Waschschritt in PBS erfolgte die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd (2% in PBS) für 20 Minuten bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen und diese durch die Zugabe von Saponin (1% in PBS) für 10 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Da die Permeabilisierung der Zellmembran durch Saponin reversibel ist, wurde dieses in allen nachfolgenden Färbe- und Waschschritten hinzugegeben. Der Ansatz wurde im Anschluss daran einmal mit FACS-Puffer (1% FKS in PBS) gewaschen und unspezifische Proteinbindestellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 10% FKS gesättigt. Der primäre Antikörper wurde in FACS-Puffer verdünnt und für eine Stunde bei 4°C mit den Zellen inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit FACS-Puffer aus dem Ansatz entfernt. Es schloss sich eine Inkubation der Zellen mit dem sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörper an, welcher ebenso im FACS-Puffer verdünnt wurde. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 4°C erfolgte das dreimalige Waschen der Zellen mit FACS-Puffer. Der Ansatz wurde abschließend auf Eis überführt und die Fluoreszenz mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

2.5.5 Immunfluoreszenz-Mikroskopie von adhärennten Zellen

Auf sterilen Deckgläsern angezogene Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 4°C kaltem Paraformaldehyd (4% in PBS) fixiert. Anschließend wurde das Paraformaldehyd durch dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS entfernt und die fixierten Zellen für 15 Minuten mit Triton X-100 (3% in PBS) permeabilisiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit PBS wurden unspezifische Proteinbindestellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Block-Lösung (3% BSA in PBS) gesättigt. Der primäre Antikörper wurde in Block-Lösung verdünnt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit den Zellen inkubiert (800 µl pro Vertiefung einer 6-Loch Platte). Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und unspezifische Proteinbindestellen nachfolgend für 10 Minuten in Block-Lösung blockiert. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in Block-Lösung verdünnt und die Zellen mit 800 µl pro Vertiefung im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Präparate dreimal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole)

Vectashield (Vecta Laboratories) auf Objektträgern eingedeckelt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Objektträger abgedunkelt bei 4°C gelagert. Die Analyse erfolgte am Fluoreszenz-mikroskop (Leica) und wurde mit Hilfe eines digitalen Bildverarbeitungssystems (Leica) ausgewertet.

2.5.6 Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Suspensionszellen

In Suspension wachsende Zellen wurden mit einer Dichte von $\sim 1 \times 10^3$ in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Sartedt) überführt, pelletiert und einmal mit 30 μ l PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte das Auftropfen der Zellen in das Reaktionsfeld eines hydrophob beschichteten Objektträgers (Thermo Scientific). Das Präparat wurde zum Anheften der Zellen für 30 Minuten im Brutschrank aufbewahrt und das PBS vorsichtig mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt. Alle weiteren Schritte entsprachen dem Protokoll für adhärente Zellen (siehe Kapitel 1.5.6). Alle Pipettierschritte erfolgten durch seitliche Zugabe der Lösungen pro Reaktionsfeld, um die Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. Nach Zugabe von DAPI Vectashield (Vecta Laboratories) und Auflage eines Deckglases wurden die Objektträger am Fluoreszenzmikroskop (Leica) oder am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Carl Zeiss) analysiert. Die Objektträger wurden bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

2.5.7 Konfokale Mikroskopie

Die Analyse von fixierten, dreifachgefärbten Proben erfolgte an einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (LSM 510 Meta, Carl Zeiss) mit einem 20 x Plan-Neofluar Ölimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 0,5. Die Überlagerung (Durchbluten) zweier ähnlicher Fluorophore bei der digitalen Bildaufnahme wurde durch sequentielle Anregung und Detektion im Multitracking Modus verhindert. Laserleistung, Detektorempfindlichkeit und Hintergrundsubtraktion wurden dabei so eingestellt, dass bei nicht-behandelten Zellen keine Eigenfluoreszenz mehr detektiert werden konnte. Der Lochblender-Durchmesser (pinhole) in den einzelnen Kanälen betrug dabei 90-120 μ m. Für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs GFP wurde die Wellenlänge 488 nm des Argon-Lasers mit einem Bandpassfilter von 505–530 nm verwendet. Die

Anregung des Alexa 555 Fluorophor erfolgte mittels Helium-Neon-Laser mit der Wellenlänge 543 nm und einem Bandpassfilter von 560–615 nm. Zur Detektion des Alexa 633 Fluorophor wurde der Helium-Neon-Laser 2 mit der Anregungswellenlänge 633 nm und einem Meta-Detektor von 669–798 nm verwendet.

2.5.8 Induktion und Nachweis von Apoptose

Induktion von Apoptose:

Die Induktion von Apoptose erfolgte durch Schädigung der DNA nach einer Gamma-Strahlen Exposition mit Hilfe einer ^{137}Cs -Quelle. In Abhängigkeit der verwendeten Strahlenquelle entsprach eine Expositionszeit von 45 Sekunden einer Strahlendosis von 1 Gray (Gy).

Hierfür wurden die in Suspension wachsenden Zellen mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät und die Zellen ohne Entfernung des Kulturmediums unterschiedlichen Strahlendosen ausgesetzt. Bis zur weiteren Analyse wurden die Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Apoptosenachweis mittels Annexin V:

Ein frühes Merkmal der Apoptose ist die Translokation von Phosphatidylserin von der cytoplasmatischen Innenseite der Plasmamembran auf die nach außen gerichtete Membranschicht (Andree et al., 1990). Der Verlust der natürlichen Membransymmetrie kann dabei mit Hilfe von Annexin V, das in der Lage ist Ca^{2+} -abhängig und mit hoher Affinität an Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche zu binden, untersucht werden. Durch die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Annexin V können somit spezifisch apoptotische von nicht-apoptotischen Zellen mittels FACS-Analyse unterschieden werden.

Dafür wurden 1×10^5 in Suspension wachsende Zellen zweimal mit PBS und anschließend einmal mit Bindungs-Puffer gewaschen. Nach Aufnahme der Zellen in 100 μl Bindungs-Puffer erfolgte die Zugabe von 2,5 μl des an Phycoerythrin (PE)-gekoppelten Annexin V (Alexis Biochemicals). Der Ansatz wurde mit einem Vortex-Schüttler homogenisiert und 15 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese in FACS-Puffer resuspendiert und nachfolgend auf Eis inkubiert. Die

Auswertung erfolgte mit Hilfe der FACS-Analyse an einem FACSCanto (Beckton-Dickinson) Durchflusszytometer.

<u>Bindungs-Puffer:</u>	10 mM HEPES
	140 mM NaCl
	2,5 mM CaCl ₂

2.5.9 Herstellung von Zelllysaten

Für die Analyse von Proteinen wurden je nach Anwendung verschiedene Lysepuffer verwendet.

Lyse mit KLB-Lysis-Puffer:

Zum Nachweis von phosphorylierten Proteinen wurden die in Suspension wachsenden Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (Sarstedt), abzentrifugiert und mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Lyse der Zellen mit 50–100 µl des entsprechenden Lysepuffers auf Eis. Die Proben wurden mit 1 x SDS Ladepuffer versetzt und anschließend für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Das Lysat wurde auf Eis überführt und direkt für die SDS-PAGE verwendet oder bei -80°C gelagert. Die unten aufgeführten Proteaseinhibitoren wurden dem Lysepuffer in einer 1:1000 Verdünnung frisch zugegeben.

Lyse mit Direkt-Lyse-Puffer:

Hierfür wurden die mit Hilfe von Trypsin/EDTA-Lösung abgelösten Zellen oder die in Suspension wachsenden Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und anschließend nach Bestimmung der Zellzahl in Direkt-Lyse-Puffer lysiert und für 5 Minuten aufgeköcht. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lysate bei -20°C gelagert oder direkt für die SDS-PAGE verwendet. Der Direkt-Lyse-Puffer enthielt keine Proteaseinhibitoren.

<u>KLB-Lyse-Puffer:</u>	25 mM Tris-HCL pH 7,4 150 mM NaCl 5 mM EDTA pH 8,0 15% Glyzerol 1% Triton X-100 10 mM Sodium-Pyrophosphat 1 mM Sodium-Orthovanadat 10 mM Glyzerolphosphat
<u>Direkt-Lyse-Puffer/</u>	Tris-HCL pH 6,8
<u>SDS-Ladepuffer:</u>	2% (w/v) SDS 10% Glyzerol 50 mM DTT 0,01% (w/v) Bromphenolblau
<u>Proteaseinhibitoren:</u>	1x Proteaseinhibitor Tabletten (Roche) 1 mM Pefabloc SC (Roche) 40 mM Na-Pervanadat

2.5.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen aus Zelllysaten erfolgte nach ihrem Molekulargewicht mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Leammli et al., 1970) unter denaturierenden Bedingungen in einer Minigel-Apparatur (Hofer SE 260). In Abhängigkeit vom Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins enthielt das Trenngel 7% oder 14% und das Sammelgel 5% Polyacrylamid. Lysate, die mittels KLB-Lyse-Puffer hergestellt worden sind, wurden vor dem Auftragen auf Eis aufgetaut. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bis zum Erreichen des Trenngels zunächst bei 80 V. Die Spannung wurde anschließend auf 160 V erhöht, bis die Bromphenolblaufront das Ende des Gels erreichte. Als Molekulargewichtstandard wurden 5 µl des Spectra Multicolor Proteinmarkers (Fermentas) verwendet.

<u>Elektrophorese-Puffer:</u>	25 mM Tris-Base
	250 mM Glyzin
	0,1% (w/v) SDS
	pH 8,3

2.5.11 Immunoblotting

Nach Auftrennung des Proteingemisches in der SDS-PAGE wurden die Proteine im Gel auf eine Nitrocellulosemembran mittels Immunoblotting transferiert. Dazu wurden zunächst die Nitrocellulosemembran (Protran Nitrocellulose Transfer Membrane, Whatman) und das Filterpapier (3MM Filterpapier, Whatman) auf die Größe des Polyacrylamidgels zurechtgeschnitten und in Transferpuffer eingeweicht. In einer Semi-Dry-Blotkammer wurde ein Stapel bestehend aus Filterpapier, Nitrocellulose-membran, Polyacrylamidgel und Filterpapier, zusammengesetzt. Eventuell entstandene Luftblasen wurden durch vorsichtiges Rollen mit einer Plastikpipette auf dem Stapel entfernt. Bei einer Stromstärke von 75 mA für 2 Stunden wurden die Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Unspezifische Proteinbindestellen auf der Membran wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Block-Puffer 1 gesättigt. Wenn Zelllysate auf phosphorylierte Proteine hin analysiert werden sollten, erfolgte eine Sättigung der Membran im Block-Puffer 2. Der unten aufgeführte Proteaseinhibitor wurde dem Block-Puffer 2 frisch zugegeben. Um ein Protein auf der Membran nachzuweisen, wurde diese zunächst mit einem spezifischen primären Antikörper (siehe Tabelle 5), welcher im Puffer 3 verdünnt worden war, über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Entfernen von nicht gebundenen Antikörpern erfolgte in drei Waschschritten mit TBS für jeweils 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran mit einem sekundären Antikörper (siehe Tabelle 5), der ebenfalls in Puffer 3 verdünnt wurde, für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Für den Nachweis von phosphorylierten Proteinen erfolgte die Verdünnung des primären und sekundären Antikörpers im Puffer 4. Der sekundäre Antikörper, an dem das Enzym Meerrettich-Peroxidase kovalent gebunden ist, ist gegen ein Epitop des primären Antikörpers gerichtet. Nach der Inkubation mit dem

sekundären Antikörper schlossen sich drei Waschschritte mit TBS-T für 10 Minuten an. Wird die Meerretich-Peroxidase mit einem Substrat inkubiert, das Cumarsäure, Luminol sowie H_2O_2 enthält, kann die daraus resultierende Redox-Reaktion, bei der ein Fluoreszenzsignal emittiert wird, autoradiographisch nachgewiesen werden. Zur Detektion wurden die ECL-Lösung 1 und 2 im gleichen Verhältnis gemischt und gleichmäßig auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurde ein Photofilm (BioMax Transscreen HE, Kodak) auf die Membran gelegt, um die Fluoreszenzsignale zu visualisieren. Die Expositionszeit variierte je nach Signalstärke zwischen 5 Sekunden und 24 Stunden.

Sollten auf der Membran nachfolgend weitere Proteine nachgewiesen werden, so wurde die Membran für 2 Stunden in Ablöse-Puffer inkubiert, um die gebundenen primären und sekundären Antikörper zu entfernen. Daran anschließend wurde die Membran sorgfältig mit TBS-T gewaschen und die unspezifischen Proteinbindestellen für 2 Stunden bei Raumtemperatur gesättigt.

Transfer-Puffer:

25 mM Tris-Base
250 mM Glycin pH 8,3
20% (v/v) Ethanol

TBS:

100 mM Tris-HCL pH 7,5
0,9% (w/v) NaCl

TBS-T:

TBS
0,1% (v/v) Tween 20

Block-Puffer 1:

TBS
10% Magermilchpulver

Block-Puffer 2:

TBS
5% BSA
1 mM Orthovanadat

<u>Puffer 3:</u>	TBS-T 5% Magermilchpulver
<u>Puffer 4:</u>	TBS-T 5% BSA 1 mM Orthovanadat
<u>Ablöse-Puffer:</u>	0,5N NaOH ddH ₂ O
<u>ECL-Lösung 1:</u>	100 mM Tris-HCL pH 8,5 0,4 mM p-Cumarsäure 2,5 mM Luminol ddH ₂ O
<u>ECL-Lösung 2:</u>	100 mM Tris-HCL pH 8,5 0,18% H ₂ O ₂ ddH ₂ O

2.5.12 Antikörper

Tabelle 2: Primäre und sekundäre Antikörper mit verwendeter Verdünnung für Immunoblotting (IB) oder Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IF).

Primärer Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller	Verwendung
α -ORF50 (polyklonal)	1:1000	Hase	Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. David Lukac	IB, IF
α -ORF59 (monoklonal)	1:2000	Maus	Advanced Biotechnologies	IF
α -LANA (polyklonal)	1:1000	Hase	Eigene Produktion	IB, IF
α -Drosha (polyklonal)	1:1000	Hase	Abcam	IB
α -Dicer (polyklonal)	1:1000	Hase	Abcam	IB
α -Phospho-I κ B- α (monoklonal)	1:1000	Hase	Cell Signaling	IB
α -Phospho-c-Jun (monoklonal)	1:1000	Hase	Cell Signaling	IB
α -Caspase 3 (monoklonal)	1:1000	Hase	Cell Signaling	IB
α -ISG15 (polyklonal)	1:1000	Hase	Santa Cruz	IB
α -AU1 (monoklonal)	1:1000	Maus	Covance	IB , IF
α -14-3-3 zeta (polyklonal)	1:1000	Hase	Santa Cruz	IB
α -Tubulin (monoklonal)	1:1000	Maus	Sigma	IB
Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller	Verwendung
α -Hase-HRP	1:10000	Ziege	Santa Cruz	IB
α -Maus-HRP	1:10000	Ziege	Santa Cruz	IB
α -Hase-555	1:1000	Ziege	Invitrogen	IF
α -Maus-555	1:1000	Hase	Invitrogen	IF
α -Maus-633	1:1000	Hase	Invitrogen	IF

2.5.13 Herstellung von lentiviralen Vektorüberständen

Zur Herstellung von lentiviralen Überständen wurden 293T Zellen als Verpackungszelllinie verwendet. Dazu wurden diese am Vorabend mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro 100 mm Zellkulturschale ausgesät, so dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von ungefähr 80% erreichen konnten. Am darauffolgenden Tag erfolgte die transiente Transfektion der Zellen mittels Polyethylenimin (PEI, siehe Kapitel 1.2.6). Pro Ansatz wurden 3 µg vom lentiviralen Vektor zusammen mit je 1,5 µg der Plasmide pGagP1 und pRev sowie pVSV-G in 1 ml Opti-MEM Medium überführt. Nach Zugabe von 40 µl PEI wurde der Ansatz resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit erfolgte das Wechseln des Zellmediums gegen 3 ml Opti-MEM Medium. Das PEI-DNA-Gemisch wurde tropfenweise auf die Zellen pipettiert und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden bei 37°C im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch die Zugabe von frischem, mit HEPES (20 mM) versetztem Zellkulturmedium, ersetzt. Zur Generierung der lentiviralen Vektorüberstände wurden die Zellen anschließend für 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert und abschließend geerntet. Dazu wurde der Überstand vorsichtig aus der Zellkulturschale entnommen, in eine 10 ml Spritze überführt und mit Hilfe eines Filters (45 µm, Millipore) zum Entfernen von Zelldebris steril filtriert. Die viralen Überstände wurden direkt zur Transduktion von Zielzellen eingesetzt (siehe Kapitel 1.5.15) oder bis zur weiteren Verwendung in 3 ml Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

<u>HEPES:</u>	50 mM HEPES
	280 mM NaCl
	1,5 mM Na ₂ HPO ₄

2.5.14 Lentivirale Transduktion von Suspensionszellen

Um eine möglichst hohe Infektionsrate zu erhalten, erfolgte die Transduktion von Suspensionszellen mittels Zentrifugation. Dazu wurden die Suspensionszellen mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte

ausgesät und der lentivirale Überstand in verschiedenen Verdünnungen zu den Zellen pipettiert. Zur Unterstützung der Virus-DNA Aufnahme in die Zielzellen, durch Neutralisation von ladungsbedingten Wechselwirkungen, wurde dem Ansatz das Polykation Polybrene (8 µg/ml) hinzugegeben und dieser bei 800 rpm für eine Stunde und 25°C zentrifugiert. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37°C im Brutschrank. Am darauffolgenden Tag wurden die Suspensionszellen in 15 ml Röhrchen überführt und bei 800 rpm für 5 Minuten pelletiert. Die Zellen wurden in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und erneut in die Vertiefung einer 6-Loch-Platte gegeben. Die Überprüfung der Transduktionseffizienz anhand von GFP erfolgte 48 Stunden nach Transduktion am Fluoreszenzmikroskop sowie mit Hilfe einer FACS-Analyse. Je nach zu untersuchendem Zeitpunkt wurden die Suspensionszellen geerntet und nachfolgend einer RNA-Isolierung (siehe Kapitel 1.4.9) unterzogen.

Tabelle 6: Oligonukleotide für Luciferase Assay. Die Sequenz der Oligonukleotide ist in 5'-3' Orientierung angegeben. Die Bezeichnungen setzen sich aus dem Namen des zu amplifizierenden Fragments und der Kennzeichnung Fw (vorwärts) oder Rv (rückwärts) zusammen. Durch Primer eingeführte Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme sind in den Sequenzen fett dargestellt.

Bezeichnung	5'-3'-Sequenz
14-3-3z-3'-UTR-Spel Fw	CAG ACTAGT ATGGATAAAAATGAGCTGG
14-3-3z-3'-UTR-HINDIII Rv	AGCA AAGCTTTT AATTTTCCCCTCCTTCTC
ATF3-3'-UTR-Spel Fw	CAG ACTAGT GAGTCCTCATTGAATCCTC
ATF3-3'-UTR-HINDIII Rv	AGCA AAGCTTT GACAGGTTAGGAATACTAG

2.6 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet einen Mechanismus der es erlaubt, mit Hilfe von doppelsträngigen RNA-Molekülen die Expression eines Zielgens sequenzspezifisch zu inhibieren (Fire et al., 1998). Dabei wurden kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle (short interfering RNA, siRNA) mit einer Länge von 19 – 23 nt und einem 3'-Überhang von 2 Nukleotiden als RNAi vermittelnde Moleküle identifiziert (Elbashir et al., 2001), die nach Prozessierung von längeren, doppelsträngigen RNA-Molekülen (short hairpin RNA, shRNA) durch

die Ribonuklease Dicer entstehen können. Nach Inkorporierung des siRNA-Moleküls in einen Enzymkomplex (RISC: RNA-induced silencing complex) dissoziiert einer der beiden siRNS-Stränge, während der sequenzspezifische Strang weiterhin mit dem RISC-Komplex assoziiert bleibt. Über homologe Hybridisierung der zellulären, komplementären Ziel-mRNA mit der siRNA wird diese innerhalb des RISC-Komplexes endonukleolytisch gespalten. Die daraus resultierenden RNA-Fragmente werden degradiert und somit die Genexpression post-transkriptionell unterdrückt.

2.7 Genexpressions Array

Für eine umfassende Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene wurden DNA-Microarray Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde das Whole Human Genome Microarray der Firma Agilent gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Dieses bietet die Möglichkeit, die Expression aller bekannten humanen Gene in einem Zweikanal-Experiment zu analysieren. Dabei sind in diesem Microarraysystem annähernd 41,000 Gene und Transkripte durch genspezifische 60-mer Oligonukleotide repräsentiert, die mit Hilfe eines photolithographisch Druckverfahrens direkt auf die Oberfläche des Glasobjektträgers synthetisiert werden (*in situ*). Die Verwendung von langen Oligonukleotiden hat eine hohen Sensitivität und bessere Hybridisierungseigenschaften zum Vorteil.

Um das Expressionsprofil zweier Proben relativ zueinander vergleichen zu können wurde zunächst die isolierte Gesamt-RNA einer Referenz- und einer Test-Probe durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und diese durch Einbau von zwei unterschiedlichen Cyanin 5- bzw. Cyanin 3-markierten Cytosin-Triphosphat (CTPs) mittels T7-abhängiger cRNA Synthese markiert. Als interne Kontrollen wurden der Gesamt-RNA ein Gemisch aus RNA-Transkripten hinzugefügt (RNA Spike-in), die sequenzspezifisch und in definierter Menge an ihre komplementären Bereiche auf dem Microarray binden. Dadurch kann die Effizienz der Hybridisierung überprüft sowie unter anderem eine Normalisierung der Cyanin 5- und Cyanin 3-Signale durchgeführt werden.

Ausgehend von jeweils 1 µg gereinigter Gesamt-RNA (siehe Kapitel 1.4.9), erfolgte die cDNA Synthese und anschließend die Amplifikation der cRNA und deren Markierung mit den fluoreszierenden Farbstoffen unter Verwendung eines T7-Oligo(dT) Promotor Primers in einer *in vitro* Transkription, vermittelt durch die T7-RNA Polymerase. Hierbei kommt es zu einer hohen Amplifikationsrate, da ein cDNA-Molekül mehrere Male als Matrize fungieren kann. Die markierte cRNA wurde anschließend über Säulen aufgereinigt und mittels Spektralfluorometer (Nanodrop) auf Qualität und Quantität hin überprüft. Entsprechend den Qualitätskriterien hinsichtlich der Inkorporationsrate der Fluoreszenzfarbstoffe so wurden die beiden unterschiedlich markierten Proben gemischt und anschließend in bis zu 200 Nukleotidegroße Fragmente zerkleinert. Die Hybridisierung auf die DNA-Microarrays erfolgte für 17 Stunden bei 65°C in einem Hybridisierungsofen (SciGene). Ungebundene Zielmoleküle wurden durch das Waschen der Microarrays entfernt und damit das Hintergrundsignal durch die Reduzierung von Kreuzhybridisierungen verringert. Nach dem Waschen der Arrays wurden diese gescannt.

Das Scannen der Microarrays erfolgte nach dem Anlegen eines Gitternetzes über die Gen-Spots in einer Auflösung von 5 µm unter Verwendung eines DNA-Microarray Laser Scanner (Axon GenePix 4100A). Hierbei werden die angeregten Fluoreszenzsignale mit Hilfe eines Photomultiplier (Photo Multiplication Tube, PMT) erfasst. Die beiden Detektionswellenlängen der verwendeten Fluorophore wurden in Abhängigkeit ihrer Einbauraten dermaßen kalibriert, dass bei einer definierten Laserenergie vergleichbare Signalintensitäten bei möglichst geringen Hintergrundsignalen erfasst werden konnten. Je höher der gewählte PMT-Wert, desto stärker ist die Detektion. Gleichzeitig ist damit aber auch ein Anstieg von Hintergrundsignalen verbunden. Die Cyanin 5- und Cyanin 3-Signale des Microarray wurden nacheinander aufgenommen und einzeln sowie als Schichtbild gespeichert. Die anschließende Analyse der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der GenePix Pro 6.0 Software. Dazu wurde zunächst ein Gitternetz konstruiert und dieses nach Erkennung der einzelnen Gen-Spots automatisch adjustiert. Irreguläre Gen-Spots, Artefakte oder Hintergrundpartikel wurden durch manuelle Nachbearbeitung gekennzeichnet und von der nachfolgenden Analyse

ausgeschlossen, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern. Bei allen Microarray-Untersuchungen wurden die für jeden einzelnen Gen-Spot spezifischen Hintergrundintensitäten, die durch unspezifische Hybridisierung entstehen können, von den Signalintensitäten subtrahiert und die mittlere Intensität eines Spots als Medianwert bestimmt. Unterschiede in der Markierungsqualität der beiden auf einen Array aufgetragenen Proben sowie die Detektionseffizienz der verwendeten Farbstoffe wurden nachfolgend durch eine Normalisierung mathematisch korrigiert. Für weitere Analysen wurde der zur Basis 2 logarithmierte Quotient der korrigierten Expressionswerte mit einem vorgegebenen Schwellenwert (cut-off) für die beiden Kanäle verwendet. Dieser mit LogRatio bezeichnete Wert gibt Auskunft über die relative Expressionsänderung. Dabei steht ein Verhältnis von 1 für eine gleichsinnige Genexpression in beiden Proben und erhält somit einen fold-change von 0. Die Darstellung der Auswertung erfolgte in einem Scatter Plot. Um den erzeugten Daten abschließend eine biologische Relevanz in biologischen Prozessen zu geben, wurden die regulierten Gene mit der Gene-Ontologie (GO) Datenbank abgeglichen.

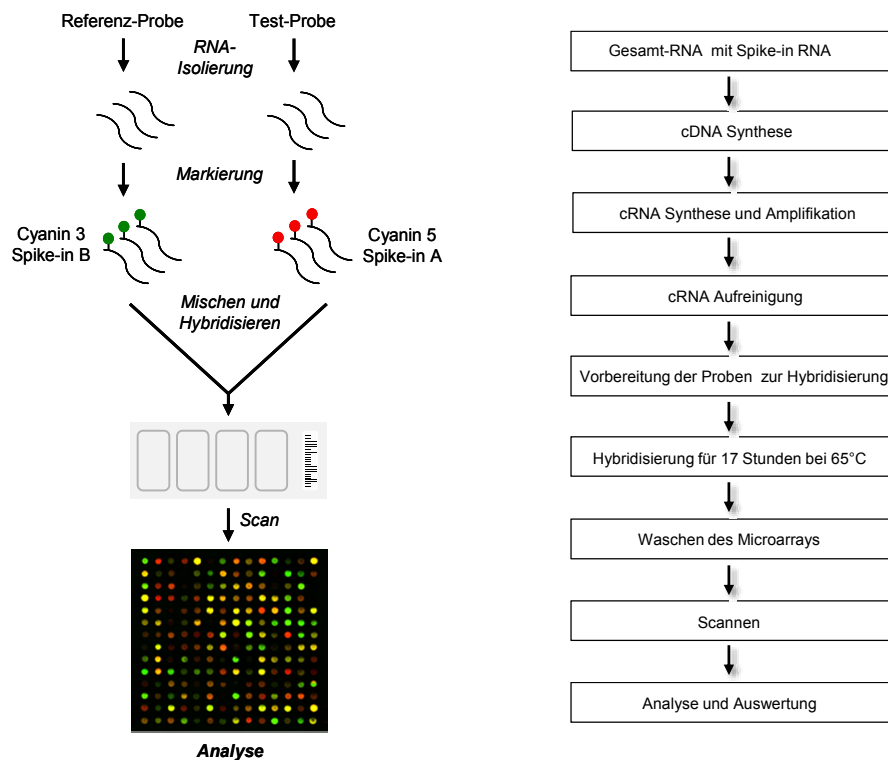


Abbildung 7: Schema zur Durchführung eines DNA-Microarrays.

3 Ergebnisse

Über die Bedeutung der KSHV-kodierten miRNAs im viralen Lebenszyklus von KSHV war zu Beginn dieser Arbeit wenig bekannt. Durch eine spezifische Suppression von Drosha sowie von Dicer sollte der Prozess der miRNA-Reifung in latent infizierten PEL-Zelllinien inhibiert werden und dadurch die Rolle der virusspezifischen miRNAs in der viralen Latenz analysiert werden. Da die Bindung von miRNAs an ihre Ziel-mRNA sowohl zu einer Destabilisierung als auch zu einer translationalen Inhibition des entsprechenden Transkripts führen kann, sollten mit Hilfe von genomischen und proteomischen Analysen die Identifizierung von Zieltranskripten KSHV-kodierter miRNAs erfolgen.

3.1 Generierung von lentiviralen Überständen zur Suppression von Drosha und Dicer mittels shRNA

Die sequenzspezifische Inhibition der Expression von Drosha und Dicer erfolgte mit Hilfe von doppelsträngigen RNA-Molekülen (short hairpin RNA, shRNA) (Fire et al., 1998). Durch den Mechanismus der RNAi, reifen diese durch zelluläre Prozessierungsmechanismen zu siRNAs heran, die aufgrund ihrer vollständigen Komplementarität zu ihrer Ziel-mRNA deren endonukleolytische Spaltung vermitteln (siehe Kapitel 2.6). Das Einbringen der shRNA in Zielzellen erfolgte durch den Einsatz eines lentiviralen Gentransfers, welcher eine stabile Expression der entsprechenden shRNA ermöglicht. Zur Infektion von BCBL-1 Zellen mit den shRNA-exprimierenden Vektoren pSico humane Drosha1 und pSico humane Dicer1 sowie mit pSico wurden zunächst Virusüberstände generiert (siehe Kapitel 2.5.14). Die Virusproduktion erfolgte in der Verpackungszelllinie 293-T. Der als negative Kontrolle dienende pSico Vektor kodiert anstelle einer shRNA für das Reportergen GFP, so dass die Effizienz der Transfektion anhand der GFP Expression der Zellen im Fluoreszenzmikroskop sowie mittels Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 2.5.4) überprüft werden konnte (siehe Abbildung 8). Nach 48 Stunden exprimierten ungefähr $90\% \pm 4,66\%$ der Zellen GFP. In allen Ansätzen konnte eine konstante Transfektionsrate der virusproduzierenden Zellen erzielt werden.

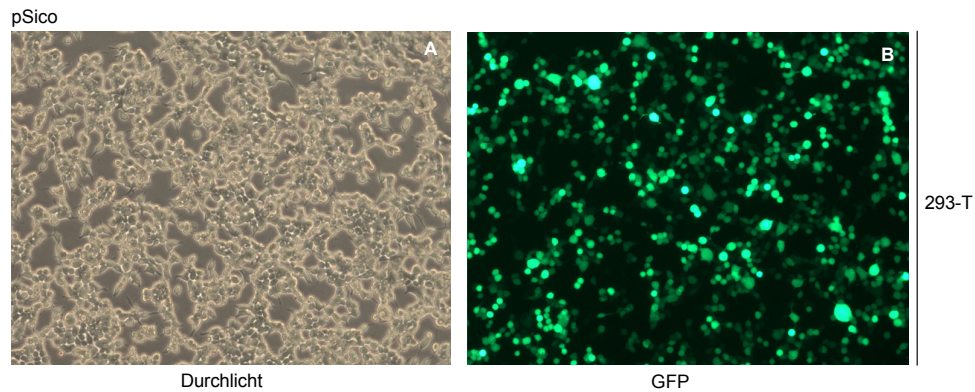


Abbildung 8: Durchlicht und Fluoreszenzmikroskopie transfizierter 293-T Zellen. 293-T Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80% mit 3µg pSico zusammen mit je 1,5µg der Plasmide pGagP1 (gag-pol) und pRev sowie 0,75µg pVSV-G mit Hilfe von PEI zur Herstellung von lentiviralen Überständen transfiziert (siehe Kapitel 2.5.14). Die Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion im Durchlichtmikroskop (A) sowie in der Fluoreszenzmikroskopie (B) untersucht. Etwa 90% der Zellen exprimierten das Reporter-gen GFP.

Die Zellen gaben die Viruspartikel in das Medium ab, so dass die lentiviralen Überstände pSico, shDrosha sowie shDicer 48 Stunden nach erfolgter Transfektion geerntet, steril filtrierte und zur Infektion von BCBL-1 Zielzellen verwendet werden konnten.

3.1.1 Lentivirale Transduktion von BCBL-1 Zellen

Die Transduktion von latent infizierten BCBL-1 Zellen mit den generierten Virusüberständen shDrosha, shDicer und pSico erfolgte mittels Zentrifugation, um eine möglichst hohe Infektionsrate zu gewährleisten. Parallel dazu wurden auch Zellen ohne lentiviralen Überstand unter identischen Bedingungen behandelt (mock-infiziert) und dienten neben pSico in jedem Infektionsansatz als zusätzliche Negativkontrolle. Zur Bestimmung der optimalen Viruskonzentration wurden zunächst fünf verschiedene Verdünnungen des lentiviralen pSico Überstandes (1:24, 1:12, 1:5, 1:2,5 und 1:1) mit Zellkulturmedium getestet (Daten nicht gezeigt) und die Effizienz der Transduktion anhand der Expression von GFP im Fluoreszenzmikroskop analysiert sowie im Durchflusszytometer quantifiziert. Eine Verdünnung des Virusüberstandes von pSico von 1:2,5 mit Zellkulturmedium zeigte 48 Stunden nach erfolgter Transduktion der BCBL-1

Zellen die höchste GFP-Expression in nahezu 85% der Zellen (siehe Abbildung 9).

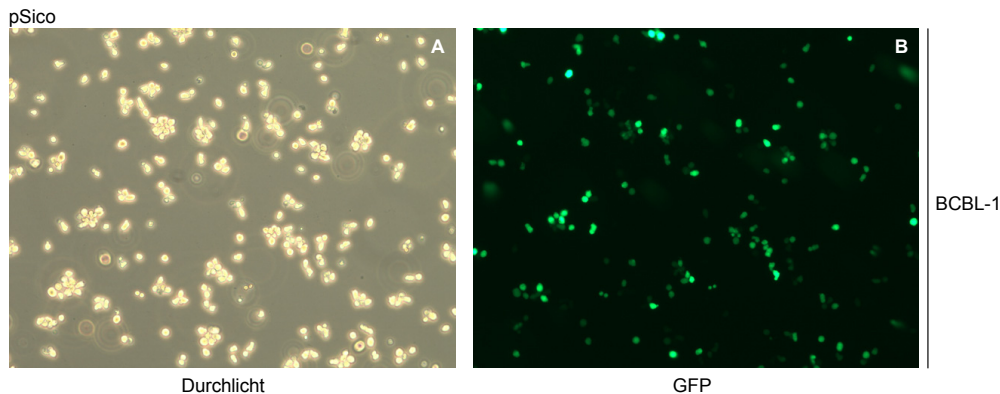


Abbildung 9: Durchlicht und Fluoreszenzmikroskopie transduzierter BCBL-1 Zellen. BCBL-1 Zellen wurden mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät und mit einer Verdünnung des lentiviralen pSico Überstandes mit Zellkulturmedium (+ 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybren) von 1:2,5 transduziert (siehe Kapitel 2.5.15). Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 800 rpm zentrifugiert und die Zellen nach 48 Stunden mit Hilfe des Durchlichtmikroskops (A) sowie in der Fluoreszenzmikroskopie (B) untersucht.

In allen erfolgten Transduktionansätzen wurden die lentiviralen Überstände pSico, shDrosha ebenso wie shDicer in einer Verdünnung von 1:2,5 mit Zellkulturmedium verwendet. Die anhand der GFP-Expression ermittelten Transduktionseffizienzen lagen in jedem Ansatz bei nahezu $85\% \pm 8,4\%$.

3.1.2 Stabile Herunterregulation der RNase III Enzyme Drosha und Dicer

Um die Suppressions-Effizienz der verwendeten shRNAs auf Transkriptebene zu untersuchen, wurden zunächst quantitative Echtzeit-RT-PCR (RT-qPCR) Analysen durchgeführt. Für einen zuverlässigen quantitativen Nachweis von mRNA wurden alle für diese Methode verwendeten Oligonukleotidprimer sorgfältig ausgewählt und etabliert (siehe Kapitel 2.4.12). BCBL-1 Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit den lentiviralen Überständen pSico, shDrosha und shDicer transduziert sowie mock-infiziert. Nach reverser Transkription der isolierten Gesamt-RNA folgte die relative Quantifizierung der Drosha mRNA nach 24, 48 und 60 Stunden mittels RT-qPCR. Die

Transkriptmengen von drei biologischen Replikaten wurden analysiert und auf die ubiquitär exprimierte GAPDH mRNA normalisiert (siehe Abbildung 10).

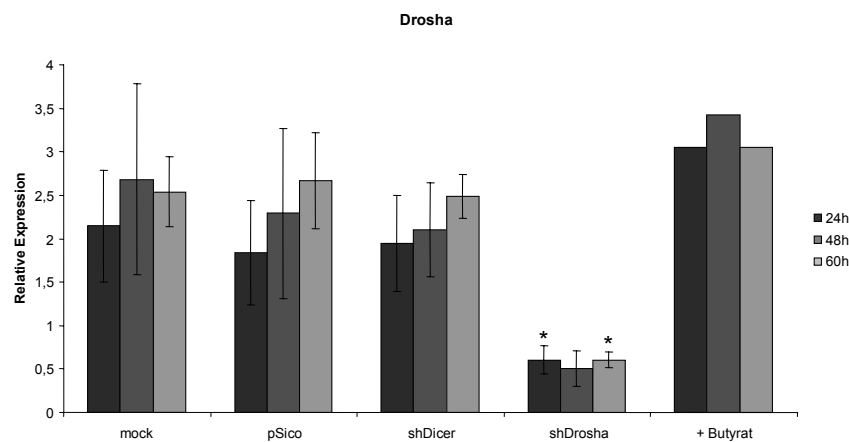


Abbildung 10: RT-qPCR Analyse von BCBL-1 Zellen nach lentiviraler Transduktion einer shRNA gegen Droscha zur relativen Quantifizierung der Droscha-mRNA. BCBL-1 Zellen wurden mit den lentiviralen Überständen pSico, shDroscha und shDicer transduziert sowie ohne lentiviralen Überstand infiziert (mock). Nach 24, 48 und 60 Stunden wurde die isolierte Gesamt-RNA (siehe Kapitel 2.4.9) revers transkribiert (siehe Kapitel 2.4.10) und die relative Droscha-Transkriptmenge mittels RT-qPCR quantifiziert (siehe Kapitel 2.4.12). Der pSico Vektor exprimiert anstelle einer shRNA das Reportgen GFP und diente zusammen mit mock-infizierten BCBL-1 Zellen als Negativkontrolle. Der Transkriptgehalt jeder Probe wurde ermittelt und auf die Transkriptmenge des GAPDH Referenzgens bezogen. Angegeben ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Die Fehlerbalken entsprechen jeweils der Standardabweichung. Die produktive KSHV Replikation wurde durch die Behandlung von BCBL-1 Zellen mit Natriumbutyrat (0,3 mM) induziert (+ Butyrat, n=1). Die relative Quantifizierung des Dicer Transkriptgehalts in shDicer behandelten BCBL-1 Zellen ist in Abbildung 23 gezeigt. *p<0,05 vs. mock.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, konnte bereits 24 Stunden nach lentiviraler Transduktion von BCBL-1 Zellen mit shDroscha eine statistisch signifikante Verminderung der relativen Transkriptmenge von Droscha im Vergleich zu mock-infizierten Zellen nachgewiesen werden (3,5-fach). Auch zu späteren Zeitpunkten, nach 48 und 60 Stunden, blieb die Transkriptmenge von Droscha deutlich und konstant reduziert (5-fach bzw. 4-fach). Sowohl die lentivirale Transduktion mit pSico als auch die Transduktion mit shDicer hatte über das untersuchte Zeitfenster keinen Einfluss auf den Transkriptgehalt von Droscha. Gleiches konnte bei mock-infizierten BCBL-1 Zellen beobachtet werden. Die produktive KSHV Replikation kann *in vitro* durch die Behandlung von latent

infizierten PEL-Zelllinien mit Natriumbutyrat eingeleitet werden (Miller et al., 1997) und führte in BCBL-1 Zellen zu keiner signifikanten Veränderung der Drosha Expressionswerte (siehe Abbildung 10). Diese Daten zeigen, dass eine lentivirale Transduktion von shDrosha in BCBL-1 Zellen zu einer stabilen, signifikanten und spezifischen Reduzierung von Drosha auf Transkriptebene führt.

Für den Nachweis des shRNA-Effekts auf Proteinebene wurden BCBL-1 Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach erfolgter Transduktion mit den lentiviralen Überständen sowie nach mock Infektion geerntet und die Zellpellets anschließend aufgeschlossen. Die Proteinlysate wurden zur Überprüfung der Dicer und Drosha Expression über SDS-PAGE und Immunoblot unter Verwendung der Antikörper α -Dicer sowie α -Drosha analysiert. Als Kontrolle wurde die KSHV-negative humane B-Zelllinie BJAB verwendet und analog zu den BCBL-1 Zellen behandelt (siehe Abbildung 11).

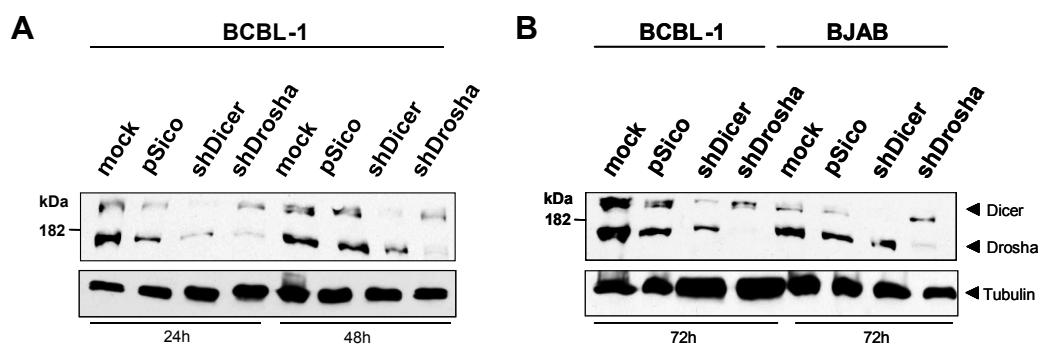


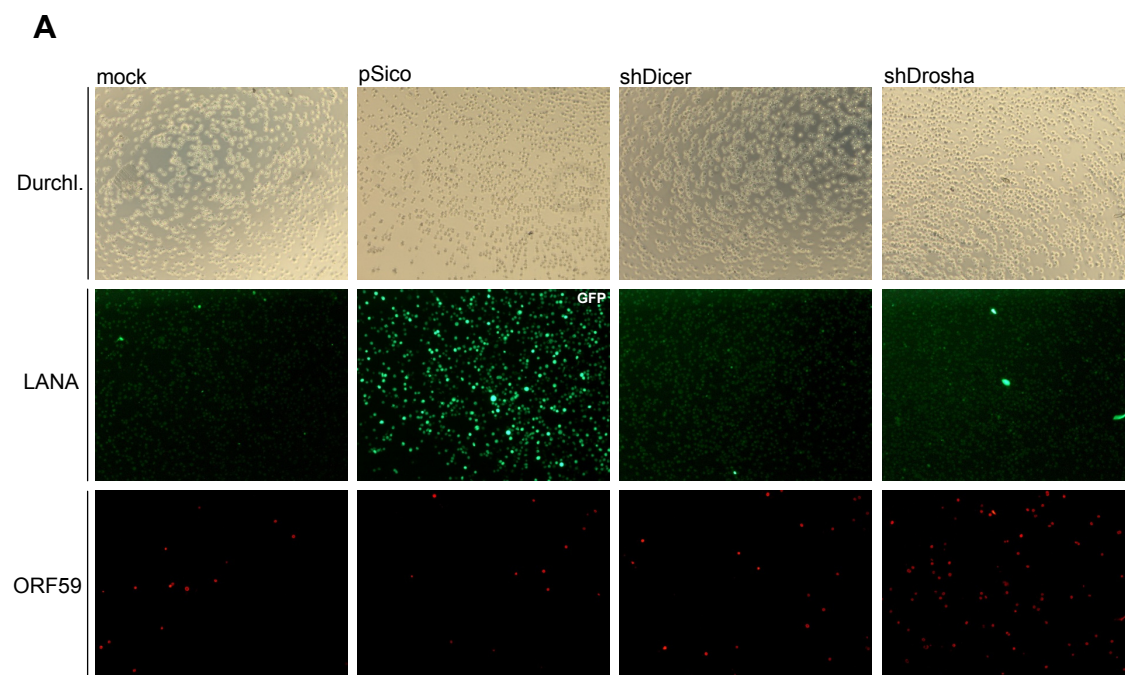
Abbildung 11: Analyse des Expressionsniveaus von Dicer und Drosha in BCBL-1 Zellen nach lentiviraler Transduktion. BCBL-1 Zellen wurden mit den lentiviralen Überständen pSico, shDrosha und shDicer transduziert sowie mock-infiziert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen lysiert (siehe Kapitel 2.5.10) und die Proteinlysate über ein 7%iges SDS-Gel aufgetrennt (siehe Kapitel 2.5.11). Die Expression von Dicer (~217 kDa) wurde mit einem primären α -Dicer Antikörper (1:1000, polyklonal) im Immunoblot detektiert. Die Detektion von Drosha (~159 kDa) erfolgte mit einem primären α -Drosha Antikörper (1:1000). Als negative Kontrolle wurde die KSHV-negative humane B-Zelllinie BJAB verwendet. Als Ladekontrolle diente Tubulin (1:1000, monoklonal). Die erwarteten Banden-Größen der jeweiligen untersuchten Proteine sind durch Pfeile angegeben.

Wie in Abbildung 11 gezeigt, konnte durch die lentivirale Transduktion von BCBL-1 Zellen mit shDicer und shDrosha im Immunoblot bereits nach 24 Stunden eine Suppression der Expression von Dicer (~217 kDa) und Drosha

(~159 kDa) im Immunoblot detektiert werden. Das Protein-Expressionsniveau blieb sowohl im Falle von Dicer als auch von Drosha nach 48 und 72 Stunden konstant erniedrigt. Diese Ergebnisse bestätigen, dass eine lentivirale Transduktion von shDrosha in BCBL-1 Zellen, neben der zuvor gezeigten reduzierenden Wirkung auf Transkriptebene, ferner zu einer Unterdrückung der Drosha Expression auf Proteinebene führt. Darüber hinaus kann durch die Expression von shDicer eine vergleichbare Suppression des Protein-Expressionsniveaus von Dicer gezeigt werden.

3.2 Lentivirale Transduktion einer shRNA gegen Drosha induziert die lytische KSHV Replikation

Um die Auswirkung der sequenzspezifischen Herabregulierung von Dicer und Drosha auf die Induktion der lytischen KSHV Replikation in latent infizierten BCBL-1 Zellen zu untersuchen, wurden zunächst immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt (siehe Kapitel 1.5.7). Die Zellen wurden 48, 72 und 96 Stunden nach Transduktion mit den lentiviralen Überständen shDrosha, shDicer und pSico sowie nach einer mock-Infektion fixiert und gegen LANA-1 und ORF59 gefärbt. In Abbildung 12, A-C sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Mikroskopie exemplarisch dargestellt.



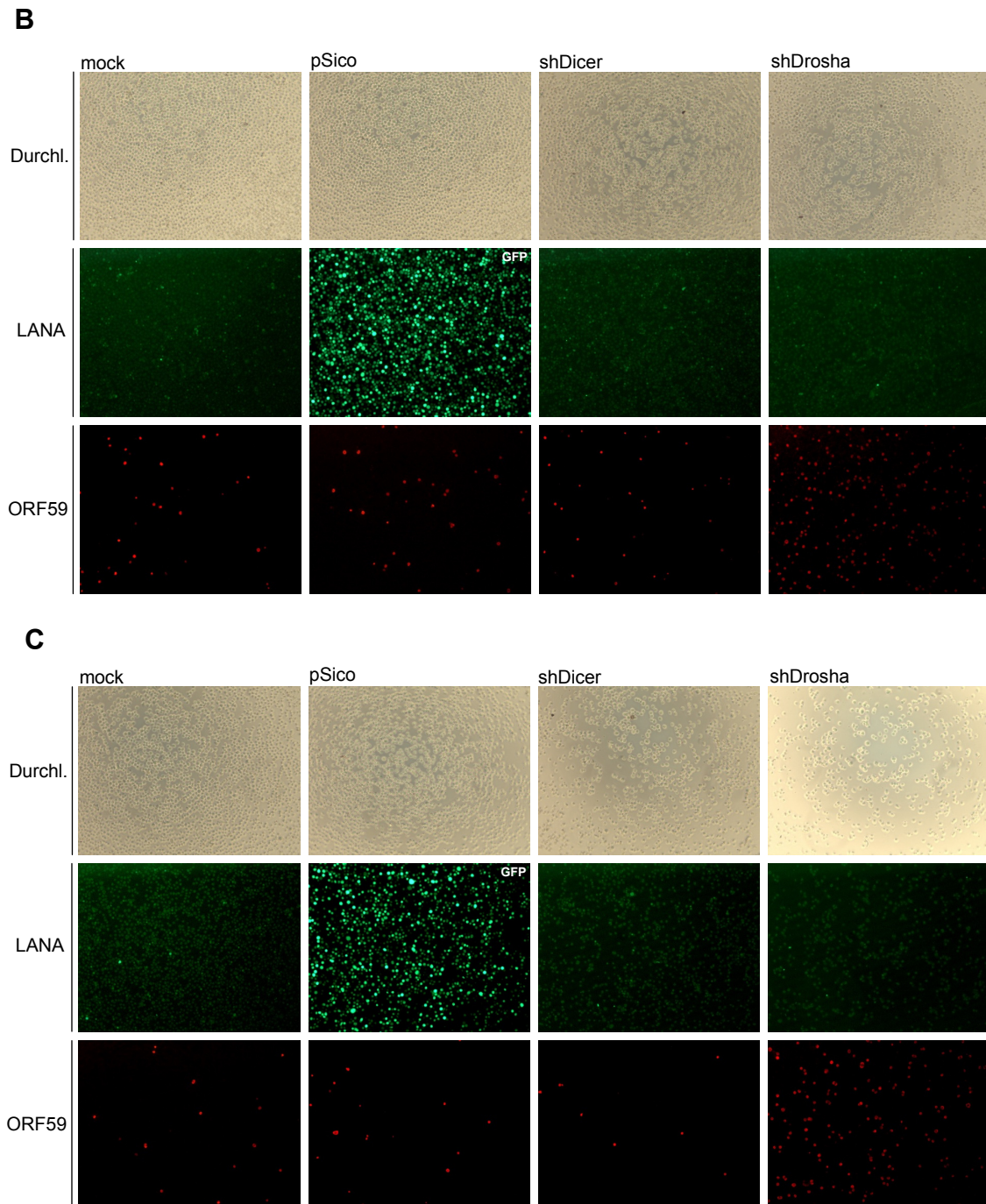


Abbildung 12: Induktion der lytischen KSHV Replikation nach shRNA-vermittelter Suppression von Drosha in BCBL-1 Zellen. BCBL-1 Zellen wurden mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät und mit einer Verdünnung der lentiviralen Überstände pSico, shDrosha und shDicer von 1:2,5 in Zellkulturmedium (+ 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybren) transduziert. Parallel dazu wurden BCBL-1 Zellen ohne lentiviralen Überstand unter identischen Bedingungen behandelt (mock). Die Zellen wurden für 1 Stunde bei 800 rpm zentrifugiert und 48 (A), 72 (B) sowie 96 Stunden (C) nach erfolgter Transduktion mit 4% PFA fixiert und zur Detektion der LANA-1 Expression mit einem primären α -LANA-1 Antikörper (1:500, polyklonal) und einem sekundären α -Hase-488 Antikörper (1:1000, grün, mitte) inkubiert. Der Nachweis der ORF59 Expression erfolgte mit einem primären α -ORF59

Antikörper (1:2000, monoklonal) und einem sekundären α -Maus-555 Antikörper (1:1000, rot, unten) (siehe Kapitel 1.5.7). Der pSico Vektor kodiert anstelle einer shRNA für das Reportergen GFP und diente zum Nachweis einer erfolgreichen Transduktion der Zielzellen sowie zusammen mit mock-infizierten BCBL-1 Zellen als Negativkontrolle. Die durchlichtmikroskopischen (Durchl., oben) sowie immunfluoreszenz-mikroskopischen Bilder sind repräsentativ dargestellt.

Das LANA-1 Protein wird ubiquitär in allen mit KSHV-infizierten Zellen exprimiert (Rainbow et al., 1999) und kann sowohl in latenten Zellen des PEL, als auch in TPA- und Natriumbutyrat-induzierten lytischen Zellen von PEL-Zelllinien nachgewiesen werden (Katano et al., 2000). Damit stellt LANA-1 einen universellen Marker für KSHV-Infektionen dar (Dupin et al., 1999) und zeigte in der Immunfluoreszenz zu allen untersuchten Zeitpunkten eine charakteristische punkt-ähnliche Anfärbung im Zellkern, der die Bindung von LANA-1 an virale Episome zugrunde liegt (Ballestas et al., 1999; Cotter et al., 2001; Szekely et al., 1999) (siehe Abbildung 12, A-C). Ein frühes Ereignis in der Reaktivierung von KSHV stellt die Expression des ORF59 dar. Dieser kodiert für einen DNA-Polymerase Prozessierungsfaktor, welcher früh nach Induktion der lytischen Replikation exprimiert wird (Russo et al., 1996; Chan und Chandran, 2000; Lin et al., 1998). Die Expression von ORF59 kann somit als ein wichtiger Marker der lytischen Replikation von KSHV verwendet werden. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Mikroskopie 48, 72 und 96 Stunden nach Transduktion von BCBL-1 Zellen zeigten, dass sich zu allen untersuchten Zeitpunkten sowohl in mock-infizierten als auch in pSico-infizierten BCBL-1 Zellen ORF59-positive Zellen detektieren ließen. Aufgrund der Tatsache, dass in einigen wenigen latent infizierten PEL-Zellen *in vitro* eine spontane lytische Reaktivierung beobachtet werden kann (<5%) (Renne et al., 1996) war diese Beobachtung mit der Literatur konform. Interessanterweise konnte bereits nach 48 Stunden in den mit shDrosha behandelten Zellen ein deutlicher Anstieg an ORF59-positiven Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 12 B). Die shRNA-vermittelte Inhibierung von Dicer führte erstaunlicherweise im Vergleich zur Suppression von Drosha über die analysierten Zeitfenster zu keiner Erhöhung an ORF59-exprimierenden Zellen (siehe Abbildung 12, A-C). Stattdessen konnte in mit shDicer aber auch in shDrosha behandelten Zellen,

die Ausprägung eines apoptotischen Phänotyps beobachtet werden, der zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit genauer untersucht wurde. Die augenscheinlich erhöhte ORF59 Expression in den mock-infizierten aber auch in den pSico und shDicer transduzierten Zellen nach 72 Stunden (siehe Abbildung 12, B) im Vergleich zur Analyse nach 48 Stunden (siehe Abbildung 12, A) war auf eine erhöhte Zellzahl in den jeweiligen untersuchten Feldern des Objektträgers zurückzuführen. In Abbildung 13 sind die untersuchten BCBL-1 Zellen 72 Stunden nach Transduktion mit shDrosha vergrößert dargestellt. Deutlich zu erkennen sind die charakteristischen punkt-ähnlichen Muster der LANA-1 Färbung im Zellkern nahezu aller latent infizierten BCBL-1 Zellen. Einige dieser Zellen exprimieren nach Transduktion mit shDrosha zudem vermehrt das frühe, nukleäre lytische Genprodukt des ORF59. In allen durchgeführten Transduktionsexperimenten konnte die Ausbildung der beschriebenen Phänotypen beobachtet werden.

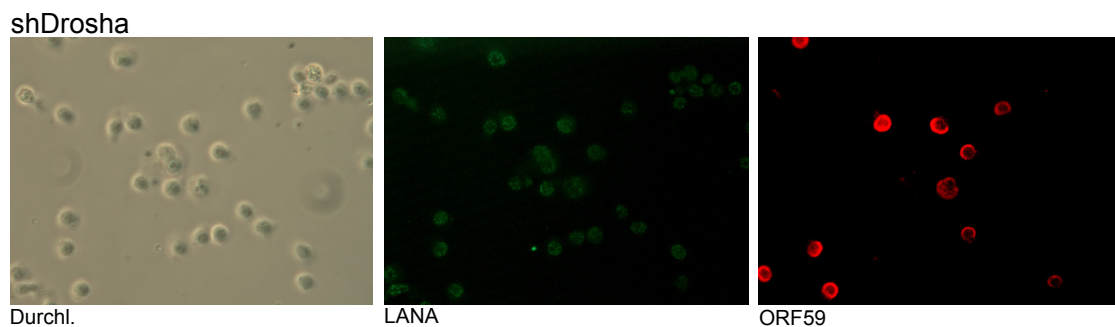


Abbildung 13: Erhöhte Vergrößerung von BCBL-1 Zellen nach shRNA-vermittelter Herunterregulation von Drosha. BCBL-1 Zellen wurden wie in Abbildung 12 beschrieben mit dem lentiviralen Überstand shDrosha in einer 1:2,5 Verdünnung mit Zellkulturmedium transduziert. Nach 72 Stunden erfolgte die Fixierung der Zellen, welche zur Detektion der Expression von LANA-1 und ORF59 mit α -LANA-1 sowie α -ORF59 gefärbt wurden.

Intrazelluläre FACS-Färbung von ORF59 in BCBL-1 Zellen

Eine genauere Analyse der ORF59 Expression in BCBL-1 Zellen erfolgte mittels Fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (siehe Kapitel 2.5.5). Hierzu wurden BCBL-1 Zellen 36, 60 und 84 Stunden nach erfolgter lentiviraler Transduktion von pSico, shDrosha und shDicer fixiert und intrazellulär gegen ORF59 gefärbt. Anhand der Analyse der intrazellulären FACS-Färbung konnten die immunfluoreszenz-mikroskopischen Ergebnisse bestätigt werden (siehe Abbildung 14). Die durchflusszytometrische Detektion von ORF59 zeigte 84

Stunden nach lentiviraler Transduktion von shDrosha in BCBL-1 Zellen eine statistisch signifikante Erhöhung der ORF59 Expression um 20%. Die Transduktion von BCBL-1 Zellen mit einer shRNA gegen Dicer hatte über das untersuchte Zeitfenster keinen Einfluss auf die Induktion der ORF59 Expression in diesen Zellen. Zusammenfassend machen diese Daten deutlich, dass die shRNA-vermittelte Expressionsverringering von Drosha aber nicht von Dicer zu einer Induktion der ORF59 Expression führt.

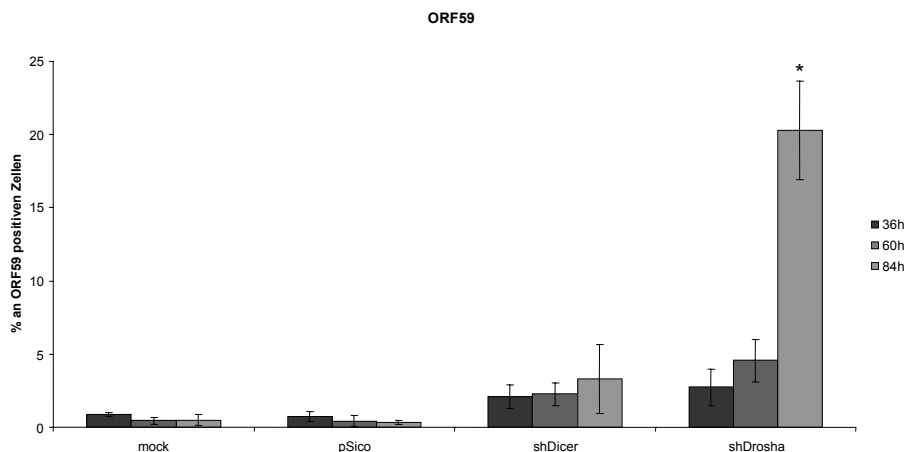


Abbildung 14: FACS-basierte Zellzahl-Analyse von ORF59-positiven Zellen in shDrosha shDicer behandelten BCBL-1 Zellen. BCBL-1 Zellen wurden mit den lentiviralen Überständen pSico, shDrosha und shDicer transduziert sowie mock-infiziert. Nach 36, 60 und 84 Stunden wurden die Zellen mit 2% PFA fixiert und durch Zugabe von 1% Saponin permeabilisiert. Die Detektion der ORF59 Expression erfolgte mit einem primären α -ORF59 Antikörper (1:2000) und einem sekundären α -Maus-555 Antikörper (1:1000) (siehe Kapitel 2.5.5). Der für das Reportergen GFP kodierende pSico Vektor diente mit mock-infizierten BCBL-1 Zellen als Negativkontrolle. Angegeben ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$). Die Fehlerbalken entsprechen jeweils der Standardabweichung. * $p < 0,05$ vs. mock.

3.2.1 Induktion der lytischen KSHV Replikation in BCBL-1 Zellen nach shRNA-vermittelter Suppression von Drosha

Die Reaktivierung von KSHV in den lytischen Zyklus wird durch die Expression eines einzelnen viralen Gens reguliert. Das als Regulator der transkriptionellen Aktivierung (RTA) bezeichnete Genprodukt des ORF50 gehört zu den sehr frühen Genen und ist für die Induktion der lytischen KSHV Replikation sowohl notwendig als auch ausreichend. RTA ist dabei in der Lage durch Bindung an spezifische DNA Sequenzen und Interaktion mit zellulären Transkriptions-

faktoren aktivierend auf die Expression lytischer viraler Gene zu wirken (Deng et al., 2000, Chang et al., 2002, Gwack et al., 2002, Byun et al., 2002, Wang et al., 2003). So kann RTA unter anderem die Expression von ORF59 induzieren (Liu et al., 2008; Chen et al., 2009).

Lentivirale Transduktion einer shRNA gegen Drosha führt zur Induktion der Expression von ORF50 und ORF59 auf transkriptioneller Ebene

Um zu überprüfen, ob die lentivirale Transduktion einer shRNA gegen Drosha sowie Dicer zu einer Induktion der ORF50 und damit einhergehend zu einer Induktion der ORF59 Expression auf Transkriptebene führt, wurden RT-qPCR Analysen durchgeführt. Die latent infizierte Zelllinie BCBL-1 wurde mit pSico, shDicer und shDrosha transduziert sowie ohne lentiviralen Überstand (mock) behandelt. Zusätzlich wurde die lytische KSHV Replikation durch chemische Behandlung von BCBL-1 Zellen mit Natriumbutyrat induziert. Nach reverser Transkription der isolierten Gesamt-RNA folgte die relative Quantifizierung der ORF50 und ORF59 mRNA nach 24, 48 und 60 Stunden mittels RT-qPCR. Die Transkriptmengen von drei biologischen Replikaten wurden analysiert und auf die ubiquitär exprimierte GAPDH mRNA normalisiert (siehe Abbildung 15).

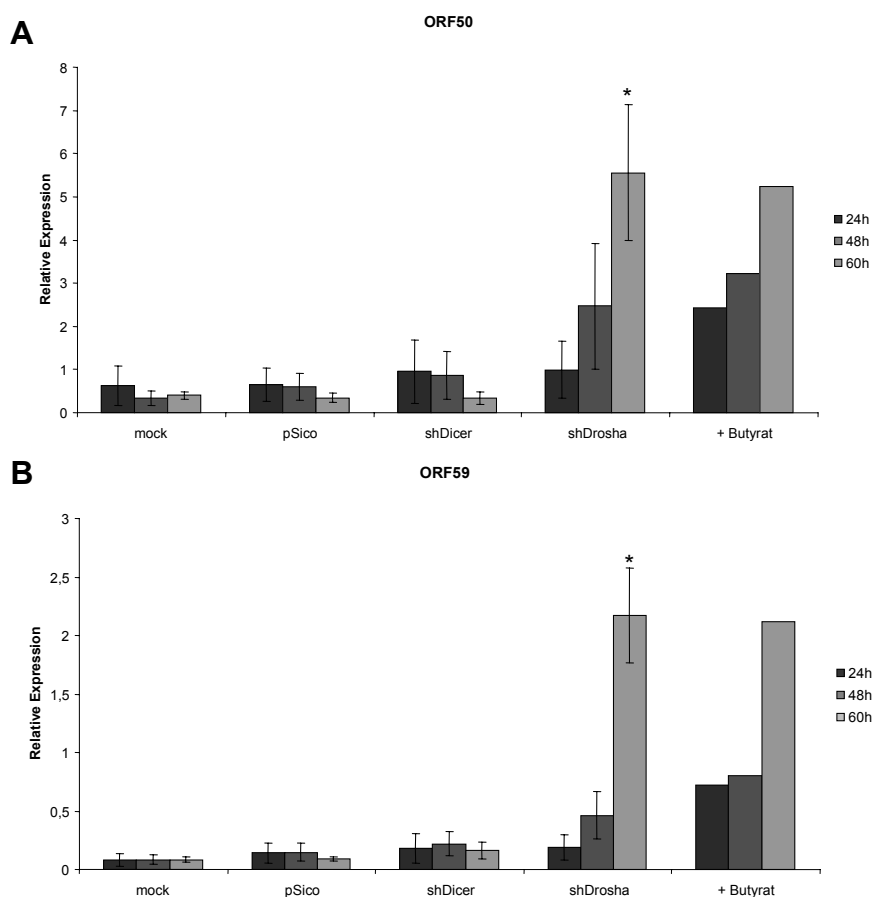


Abbildung 15: Analyse der ORF50 und ORF59 Transkriptmenge in BCBL-1 Zellen nach lentiviraler Transduktion von shRNAs gegen Dicer und Drosha mittels RT-qPCR. BCBL-1 Zellen wurden mit den lentiviralen Überständen pSico, shDrosha und shDicer transduziert sowie mock-infiziert. Die Zellen wurden nach 24, 48 und 60 Stunden geerntet und die Gesamt-RNA isoliert (siehe Kapitel 2.4.9). Nach reverser Transkription der RNA in cDNA (siehe Kapitel 2.4.10) erfolgte die Analyse der ORF50 und ORF59 mRNA-Expression mittels RT-qPCR (siehe Kapitel 2.4.12). Der pSico Vektor exprimiert anstelle einer shRNA das Reportgen GFP und diente zusammen mit mock-infizierten BCBL-1 Zellen als Negativkontrolle. In jedem Experiment wurde der relative Transkriptgehalt jeder Probe ermittelt und auf das GAPDH Referenzgen bezogen. Angegeben ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Die Fehlerbalken entsprechen jeweils dem Standardfehler. Die produktive KSHV Replikation wurde durch die Behandlung von BCBL-1 Zellen mit Natriumbutyrat (0,3 mM) induziert (+ Butyrat, n=1). *p<0,05 vs. mock.

Wie in Abbildung 14 gezeigt, führte die shRNA-vermittelte Herabregulierung von Drosha in BCBL-1 Zellen zu einer raschen und effizienten Induktion des lytischen Zykluses. Bereits 48 Stunden nach lentiviraler Transduktion konnte eine Erhöhung sowohl der relativen Transkriptmenge von ORF50 (7,3-fach) als auch der relativen Transkriptmenge von ORF59 (5,6-fach) im Vergleich zu mock-infizierten Zellen nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen stieg sowohl der ORF50 als auch der ORF59 mRNA-Gehalt weiter an (14-fach bzw. 26-fach). Die Effizienz der lytischen Reaktivierung war dabei mit der durch Natriumbutyrat eingeleiteten Induktion der produktiven KSHV Replikation vergleichbar. Interessanterweise führte die lentivirale Transduktion von BCBL-1 Zellen mit einer shRNA gegen Dicer zu keiner Induktion der ORF50 Expression und wie die einleitend durchgeführten immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen zeigten (vergleiche Abbildung 10) auch zu keiner Induktion der ORF59 mRNA Expression. Sowohl die lentivirale Transduktion mit pSico als auch die mock-Infektion von BCBL-1 Zellen hatte über die angegebenen Zeitpunkte keinen Einfluss auf die Reaktivierung von KSHV. Diese Daten belegen, dass eine spezifische Suppression der Drosha aber nicht der Dicer Expression zu einer effizienten Induktion der lytischen KSHV Replikation führt.

Die shRNA-vermittelte Suppression von Drosha führt zur Induktion von ORF50 auf Proteinebene

Um die Daten der RT-qPCR zu überprüfen, wurde der induzierende Effekt einer shRNA-vermittelten Reduzierung von Drosha auf die ORF50 Expression auf Proteinebene analysiert. Nach erfolgter Transduktion von BCBL-1 Zellen mit den lentiviralen Überständen pSico, shDrosha sowie shDicer wurden Proteinlysate der Zellen zusammen mit einer mock Infektion 24, 48 und 72 Stunden später über SDS-PAGE und Immunoblot unter Verwendung des Antiköpers α -ORF50 untersucht. Die KSHV-negative humane B-Zelllinie BJAB wurde in Analogie zu den BCBL-1 Zellen behandelt und fungierte als Negativkontrolle (siehe Abbildung 16).

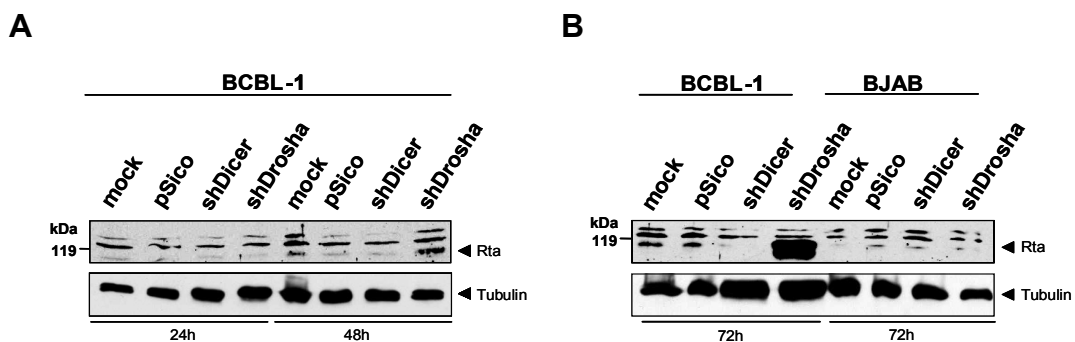


Abbildung 16: Analyse des Expressionsniveaus von ORF50 nach lentiviraler Transduktion von BCBL-1 Zellen. BCBL-1 Zellen wurden mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät und mit den lentiviralen Überständen pSico, shDicer und shDrosha transduziert sowie mock-infiziert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen lysiert und die resultierenden Lysate zur Überprüfung der ORF50 Expression über SDS-PAGE (10%) und Immunoblot analysiert. Die Detektion von ORF50 (~110 kDa) erfolgte mit einem primären α -ORF50 Antikörper (1:1000, polyklonal) und einem sekundären α -Hase (1:10000) Antikörper. Als Ladekontrolle wurde Tubulin (1:1000, monoklonal) verwendet. Die Pfeile geben die erwartete Banden-Größe der untersuchten Proteine an. Als Negativkontrolle wurde die KSHV-negative B-Zelllinie BJAB in Analogie zu den BCBL-1 Zellen behandelt.

Der durchgeführte Immunoblot zeigte entsprechend der RT-qPCR Befunde die Veränderung der Expression von ORF50 anhand der erwarteten Banden-Größe von ~110 kDa, die erstmals 48 Stunden nach der Behandlung von BCBL-1 Zellen mit shDrosha detektiert werden konnte (siehe Abbildung 16 A). Eine deutlichen Erhöhung der ORF50 Expression in diesen Zellen war nach 72 Stunden nachzuweisen (siehe Abbildung 16 B). Die Transduktion von BCBL-1

Zellen mit den lentiviralen Überständen pSico und shDicer aber auch eine mock-Infektion dieser Zellen hatte zu den untersuchten Zeitpunkten keinen Einfluss auf das ORF50 Protein-Expressionsniveau (siehe Abbildung 16 A, B). Die Detektion mit dem α -ORF50 Antikörper erzeugte im Immunoblot von BCBL-1 Zellen generell einen starken Hintergrund, der auf eine Kreuzreaktion mit zellulären Proteinen zurückzuführen ist, wie die Ergebnisse in den KSHV-negativen BJAB Zellen vermuten lassen (siehe Abbildung 16 B).

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Experimente, dass die Transduktion von latent infizierten BCBL-1 Zellen mit einer shRNA gegen Drosha zu einer effizienten und raschen Induktion der ORF50 und ORF59 mRNA Expression führen. Die Effizienz der Induktion ist mit der nach Natriumbutyrat Behandlung, welches für gewöhnlich zur Induktion des lytischen Zyklus in PEL-Zelllinien verwendet wird, vergleichbar. Darüber hinaus führt eine shRNA-vermittelte Erniedrigung der Drosha Expression zu einer deutlichen Erhöhung des Protein-Expressionsniveaus von ORF50. Eine spezifische Suppression der Dicer Expression in BCBL-1 Zellen führte hingegen zu keiner ähnlichen Induktion der lytischen Reaktivierung.

Die Induktion von RTA durch eine shRNA-vermittelte Suppression von Drosha führt zu einer vollständigen produktiven KSHV Replikation

Eine weitere Fragestellung war, ob die Aktivierung des lytischen Replikationszyklus durch eine shRNA-vermittelte Suppression von Drosha in BCBL-1 Zellen zur Produktion und Freisetzung von reifen, infektiösen Viruspartikeln führt. Damit sollte die Möglichkeit einer abortiven Reaktivierung in BCBL-1 Zellen ausgeschlossen werden. Um dieser Frage nachzugehen, wurden BCBL-1 Zellen mit den lentiviralen Überständen pSico, shDrosha und shDicer transduziert sowie mock-infiziert. Parallel dazu wurden BCBL-1 Zellen zur Produktion von infektiösen KSHV Partikeln mit Natriumbutyrat behandelt. Nach fünf Tagen erfolgte die Entnahme der Überstände, welche aufkonzentriert und zur Infektion von endothelialen SLK Zellen verwendet wurden (siehe Kapitel 2.5.2 und 2.5.3). Zum spezifischen Nachweis einer erfolgten Infektion mit KSHV wurden die Zellen nach 72 Stunden fixiert und die Expression von LANA-1 im Immunfluoreszenz-Mikroskop analysiert (siehe Abbildung 17). Eine LANA-1

Expression, mit seinem charakteristischen nukleären Färbungsmuster, konnte in den SLK Zellen nachgewiesen werden, welche mit Überständen aus shDrosha sowie Natriumbutyrat behandelten BCBL-1 infiziert wurden (siehe Abbildung 17 B und H). Folglich führt eine lentivirale Transduktion von BCBL-1 Zellen mit einer shRNA gegen Drosha zur Produktion und Freisetzung von infektiösen KSHV Virionen. Eine shRNA-vermittelte Suppression von Dicer ist jedoch nicht in der Lage eine produktive KSHV Replikation zu induzieren (siehe Abbildung 17 E). Gleiches trifft für mock-infizierte als auch pSico transduzierte BCBL-1 Zellen zu (Daten nicht gezeigt).

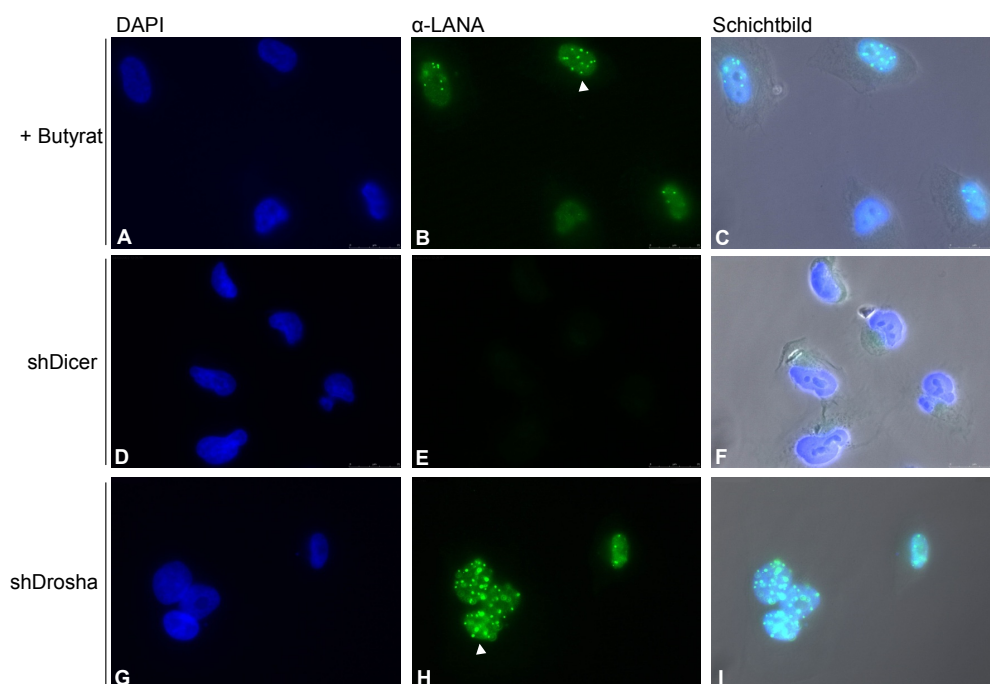


Abbildung 17: Eine shRNA-vermittelte Suppression der Drosha Expression in BCBL-1 Zellen führt zur Produktion und Freisetzung von infektiösen KSHV Partikeln. BCBL-1 Zellen wurden mit den lentiviralen Überständen shDrosha und shDicer transduziert, der Überstand nach fünftägiger Inkubation entnommen und mittels Zentrifugation aufkonzentriert (siehe Kapitel 2.5.2). SLK Zellen wurden bei einer Konfluenz von 50% mit den konzentrierten Überständen infiziert (siehe Kapitel 2.5.2) und nach 72 Stunden mit 4% PFA fixiert (siehe Kapitel 2.5.6). Der spezifische Nachweis einer Infektion mit KSHV in den Zellen erfolgte durch die Detektion der LANA-1 Expression mit einem primären α -LANA-1 Antikörper (1:500, polyklonal) und einem sekundären α -Hase-488 Antikörper (1:1000, B, E und H). Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit DAPI (A, D und G). Parallel dazu wurde die produktive KSHV Replikation durch die Behandlung von BCBL-1 Zellen mit Natriumbutyrat (0,3 mM) eingeleitet. Die Fluoreszenz-Mikroskopie Bilder sind exemplarisch dargestellt. Die Pfeile zeigen die charakteristische LANA-1 Färbung im Zellkern infizierter Zellen an (B und H). (C) Schichtbild von Bild A und B. (F) Schichtbild von Bild D und E. (I) Schichtbild von Bild G und H.

3.2.2 Northern Blot Analyse KSHV-kodierter miRNAs nach Suppression von Drosha und Dicer

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob die KSHV-kodierten miRNAs eine Rolle in der Aufrechterhaltung der viralen Latenz spielen. Da sowohl Drosha als auch Dicer entscheidend für den Prozess der miRNA-Reifung sind, wurde die Auswirkung der sequenz-spezifischen Inhibition der RNase III Enzyme auf die miRNA Expression in BCBL-1 Zellen anhand von Northern Blot Analysen untersucht (siehe Kapitel 2.4.13). Hierzu wurden BCBL-1 Zellen mit den lentiviralen Überständen pSico, shDrosha und shDicer transduziert und die Gesamt-RNA dieser Zellen nach 48 Stunden mit radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden gegen die gewünschten KSHV-kodierten miRNAs untersucht. Wie aus Abbildung 18 hervorgeht, konnte mittels Northern Blot Analysen die Expression von reifen virusspezifischen miRNAs mit der erwarteten Banden-Größe detektiert werden. Im Vergleich zu pSico und mock-infizierten Kontrollzellen, welche eine relativ starke und unveränderte miRNA Expression zeigten, führte die lentivirale Transduktion von BCBL-1 Zellen mit shRNAs gegen Drosha oder Dicer zu einer deutlichen Abnahme der miRNA Expression. Dieser Befund konnte in allen durchgeführten Northern Blot Analysen für die untersuchten KSHV-kodierten miRNAs gezeigt werden. Darüber hinaus lieferte die Analyse der zellspezifischen hsa-let-7 miRNA Expression dieselben Ergebnisse. Interessanterweise konnte nach Suppression von Drosha oder Dicer eine vergleichbare Reduktion der reifen miRNA Expression festgestellt werden. Lediglich die virusspezifische miR-K12-7 zeigte im Vergleich zu shDicer behandelten BCBL-1 Zellen ein leicht erniedrigtes Expressionsniveau. Eine mögliche Erklärung könnte eine höhere Stabilität dieser miRNA darstellen. Die miRNA Expression nach Einleitung der lytischen KSHV Replikation durch Natriumbutyrat wurde zudem für einige virusspezifische miRNAs analysiert und zeigte nur für die miR-K12-9* ein erniedrigtes Expressionsniveau. Diese Daten zeigen zum einen deutlich, dass die Herabregulation von Drosha und Dicer durch spezifische shRNAs zu einer starken Beeinträchtigung der miRNA-Reifung in BCBL-1 Zellen führt. Dies wird in einigen Fällen zudem durch eine verstärkte Akkumulation der entsprechenden pre-miRNAs (~70 Nukleotide) verdeutlicht. Weitaus wichtiger

war jedoch die Feststellung, dass sich zwischen shDrosha und shDicer behandelten BCBL-1 Zellen eine vergleichbare Reduktion sowohl der viruspezifischen miRNA Expression als auch der zellulären hsa-let-7 miRNA nachweisen ließ. Die erbrachten Ergebnisse belegen klar, dass eine Suppression von Drosha aber nicht von Dicer zu einer robusten Induktion der lytischen KSHV Replikation führt. Somit scheint ein miRNA-unabhängiger Mechanismus für den beobachteten Phänotyp verantwortlich zu sein.

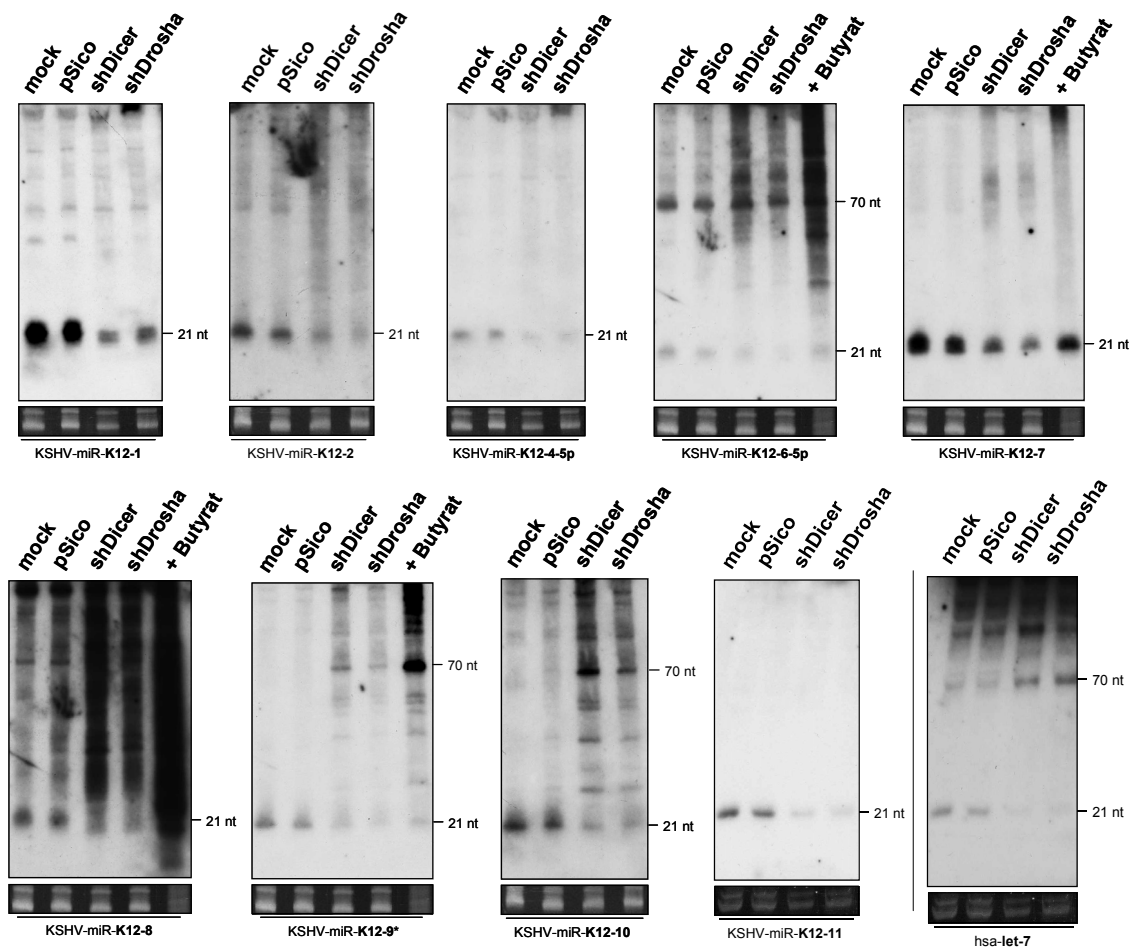


Abbildung 18: Northern Blot Analyse zum Nachweis KSHV-kodierter miRNAs in BCBL-1 Zellen nach shRNA-vermittelter Suppression von Drosha und Dicer. BCBL-1 Zellen wurden mit den lentiviralen Überständen pSico, shDrosha und shDicer transduziert sowie mock-iniziert. Nach 48 Stunden erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA (siehe Kapitel 2.5.9), die anschließend mit den angegebenen radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden für den Nachweis von KSHV-kodierten miRNAs mittels Northern Blot analysiert wurde (siehe Kapitel 2.5.13). Die lytische KSHV Replikation wurde durch die Behandlung von BCBL-1 Zellen mit Hilfe von Natriumbutytrat eingeleitet (+ Butyrat) und die Gesamt-RNA dieser Zellen nach fünf Tagen isoliert. Als Ladekontrolle ist die ribosomale RNA nach Färbung des Polyacrylamidgels mit Ethidiumbromid gezeigt. Von jeder Probe wurden 14 µg Gesamt-RNA analysiert. Die angegebene Marker-Größe von 21 Nukleotiden gibt die Größe der reifen miRNA an, während

die Marker-Größe von 70 Nukleotiden die Größe der pre-miRNA angibt. Die dargestellten Blots wurden maximal dreimal zum Entfernen von gebundenen Sonden gestrippt und rehybridisiert.

3.2.3 Induktion der lytischen KSHV Replikation in AP3 Zellen nach shRNA-vermittelter Suppression von Drosha

Um auszuschließen, dass es sich bei der Induktion der lytischen KSHV Replikation in BCBL-1 Zellen um einen zellspezifischen Phänotyp handelt, wurde die Auswirkung einer shRNA-vermittelten Suppression von Drosha und Dicer auf die Reaktivierung von KSHV in einer weiteren PEL-Zelllinie untersucht. Aus diesem Grunde wurden latent infizierte AP3 Zellen mit den lentiviralen Überständen shDrosha und shDicer transduziert und die ORF50 und ORF59 sowie die Drosha Expression auf Transkriptebeine nach 24, 48 und 60 Stunden mittels RT-qPCR untersucht. Als Kontrolle diente der pSico Vektor, welcher anstelle einer shRNA für das Reporterogen GFP kodiert. Parallel wurden AP3 Zellen ohne lentiviralen Überstand behandelt (mock). Die relativen Transkriptmengen aus drei unabhängigen biologischen Replikaten wurden analysiert und auf die mRNA-Spiegel der endogenen Kontrolle GAPDH normalisiert (siehe Abbildung 19 A und B). Darüber hinaus erfolgte eine Analyse der ORF50 Expression mittels Immunoblot (siehe Abbildung 19 D). Wie in Abbildung 19 gezeigt, führte die spezifische shRNA gegen Drosha in der KSHV-positiven Zelllinie AP3 im Vergleich zu mock-infizierten Zellen nach 60 Stunden zu einer 100-fachen Erhöhung der relativen Transkriptmenge von ORF50 (siehe Abbildung 19 A) und zu einem 130-fachen Anstieg der relativen Transkriptmenge von ORF59 (siehe Abbildung 19 B). In diesen Zellen konnte zudem nach 48 und 60 Stunden eine signifikant erniedrigte relative Transkriptmenge von Drosha nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19 C), welche nach 60 Stunden um das 4-fache reduziert war. Eine Suppression von Dicer war, wie zuvor in BCBL-1 Zellen beobachtet, nicht in der Lage induzierend auf die Reaktivierung von KSHV in AP3 Zellen zu wirken. Sowohl bei lentiviraler Transduktion von pSico und gleichermaßen bei mock-infizierten AP3 Zellen ließ sich über das analysierte Zeitfenster kein Einfluss auf die relative Transkriptmenge von Drosha nachweisen. Eine Analyse der ORF50 Expression auf Proteinebene führte 72 Stunden nach Transduktion von AP3

Zellen mit shDrosha zu einer deutlichen Induktion der ORF50 Expression mit der erwarteten Banden-Größe von ~110 kDa (siehe Abbildung 19 D). Nach 24 sowie 48 Stunden war noch kein ORF50 detektierbar (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend kann eine shRNA-vermittelte Suppression von Drosha jedoch nicht von Dicer sowohl in BCBL-1 Zellen als auch in latent infizierten AP3 Zellen zu einer effizienten Induktion der lytischen KSHV Replikation führen. Somit sprechen diese Daten gegen einen für einzelne Zelllinien spezifischen Phänotyp, sondern für eine generelle Eigenschaft von PEL-Zellen.

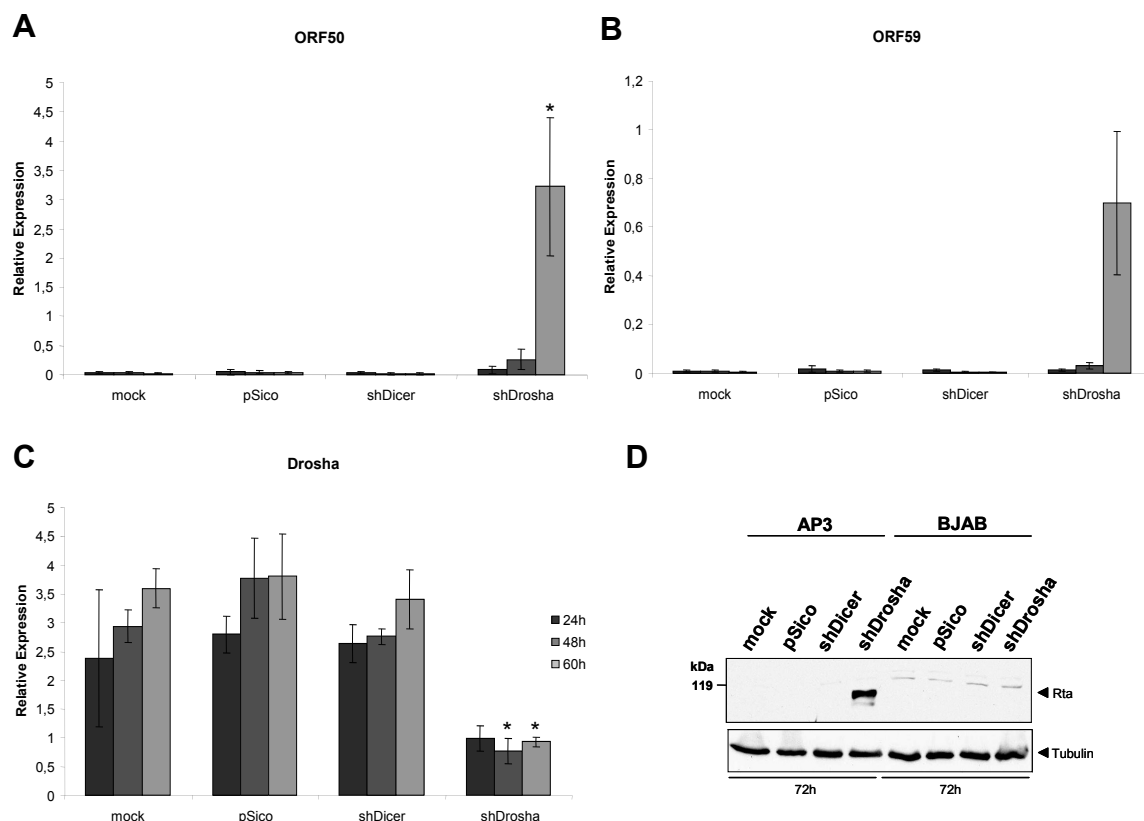


Abbildung 19: Eine shRNA-vermittelte Suppression von Drosha führt zur Induktion der lytischen KSHV Replikation in AP3 Zellen. BCBL-1 Zellen wurden mit den lentiviralen Überständen pSico, shDrosha und shDicer transduziert sowie mock-infiziert. Nach 24, 48 und 60 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert (siehe Kapitel 2.4.9) und revers transkribiert (siehe Kapitel 2.4.10). Die Analyse der ORF50 (A), ORF59 (B) und Drosha (C) mRNA-Expression erfolgte mittels RT-qPCR (siehe Kapitel 2.4.12). pSico fungierte zusammen mit mock-infizierten BCBL-1 Zellen als Negativkontrolle. In jedem Experiment wurde der relative Transkriptgehalt jeder Probe ermittelt und auf das GAPDH Referenzgen bezogen. Angegeben ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Die Fehlerbalken entsprechen jeweils dem Standardfehler. *p<0,05 vs. mock. (D) Analyse der ORF50 Expression in AP3 Zellen nach Suppression von Drosha und Dicer. BCBL-1 Zellen wurden mit den lentiviralen Überständen pSico, shDrosha und shDicer transduziert sowie mock-infiziert. Der ORF50 Nachweis erfolgte

nach 72 Stunden durch Immunoblotting mit einem polyklonalen α -ORF50 Antikörper. Als Kontrolle wurde die KSHV-negative humane B-Zelllinie BJAB verwendet und unter gleichen Bedingungen behandelt.

3.3 Die shRNA-vermittelte Suppression von Dicer führt zu einer erhöhten Apoptoserate in BCBL-1 Zellen

In allen durchgeführten Transduktionsexperimenten konnte in mit shDrosha sowie in shDicer behandelte Zellen die Ausprägung eines apoptotischen Phänotyps beobachtet werden. Um diese Beobachtung näher zu untersuchen, wurden BCBL-1 Zellen mit den lentiviralen Überständen pSico, shDrosha und shDicer transduziert und die Apoptoserate durchflusszytometrisch mittels Annexin V-Färbung bestimmt (siehe Kapitel 2.5.9). Zur Ermittlung der basalen Apoptoserate wurden unbehandelte BCBL-1 Zellen mitgeführt und diese anschließend von den berechneten Mittelwerten substrahiert. Zusätzlich erfolgte ein Nachweis der Apoptose über die Aktivierung von Caspase-3 im Immunoblot (siehe Abbildung 20).

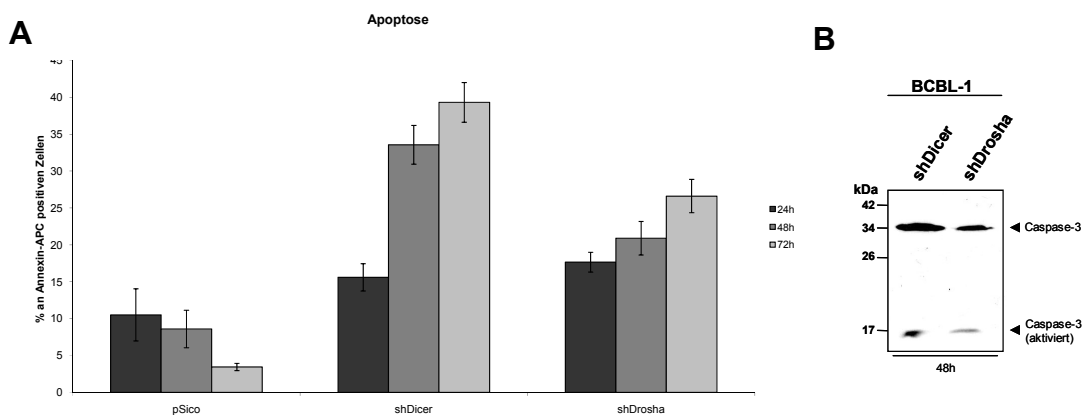


Abbildung 20: Die Suppression von Dicer in BCBL-1 führt zu einer gesteigerten Apoptoserate. (A) Bestimmung der Apoptoserate in mit pSico, shDrosha und shDicer transduzierten BCBL-1 Zellen mittels Annexin V-Färbung nach 24, 48 und 72 Stunden (n=2) (siehe Kapitel 2.5.9). (B) Immunoblot Analyse zur Detektion von aktivierter Caspase-3. BCBL-1 Zellen wurden mit den lentiviralen Überständen shDrosha und shDicer transduziert und die Proteinlysate 48 Stunden später im Immunoblot untersucht. Die Detektion von Caspase-3 erfolgte mit einem primären α -Caspase-3 Antikörper (1:1000, monoklonal) und einem sekundären α -Hase Antikörper.

Wie in Abbildung 20 gezeigt, war die Apoptoserate in mit shDicer behandelten BCBL-1 Zellen im Vergleich zu pSico Kontrollzellen bereits nach 48 Stunden um 25% erhöht (siehe Abbildung 20 A). Die Transduktion von BCBL-1 Zellen mit shDrosha führte im Vergleich zu pSico Kontrollzellen zu einem Anstieg der Apoptoserate von 12%. Während sich die Anzahl an Annexin V-positiven Zellen in mit pSico behandelten Zellen 72 Stunden nach erfolgter Infektion auf 3% erniedrigte, nahm die Apoptoserate zu diesem Zeitpunkt sowohl in mit shDicer (40%) als auch mit shDrosha (26%) transduzierten BCBL-1 Zellen weiterhin zu. Dabei zeigten mit shDicer behandelten Zellen nach 48 Stunden eine um 12% erhöhte Anzahl an Annexin V-positiven Zellen als im Vergleich zu shDrosha infizierten Zellen. Dieser Unterschied konnte zudem mittels Immunoblot gegen aktivierte Caspase-3 mit einer erwarteten Banden-Größe von ~17 kDa detektiert werden (siehe Abbildung 20 B).

Eine Induktion der Apoptose führt nicht zur Reaktivierung von KSHV in BCBL-1 Zellen

Zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen stellte sich zum einen die Frage, ob die erhöhte Apoptoserate in mit shDrosha behandelten BCBL-1 Zellen, im Vergleich zu den Kontrollzellen, einen Einfluss auf die Induktion der lytischen Replikation hat. Zum anderen galt es die Frage zu beantworten, ob die deutlich erhöhten Apoptoseraten nach shDicer Behandlung eine Reaktivierung von KSHV verhindern bzw. die Detektion einer möglicherweise erfolgten Reaktivierung erschweren. Um diesen Fragestellungen nachzugehen, erfolgte eine Induktion der Apoptose in BCBL-1 Zellen durch Schädigung der DNA nach unterschiedlichen Gamma-Strahlen Expositionen (siehe Kapitel 2.5.9). Die Apoptoseraten der Zellen wurde durch eine durchflusszytometrische Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Annexin V-Färbung bestimmt (siehe Kapitel 2.5.9) und der Einfluss der induzierten Apoptose auf die Reaktivierung von KSHV in BCBL-1 Zellen anhand einer ORF59-Färbung am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht.

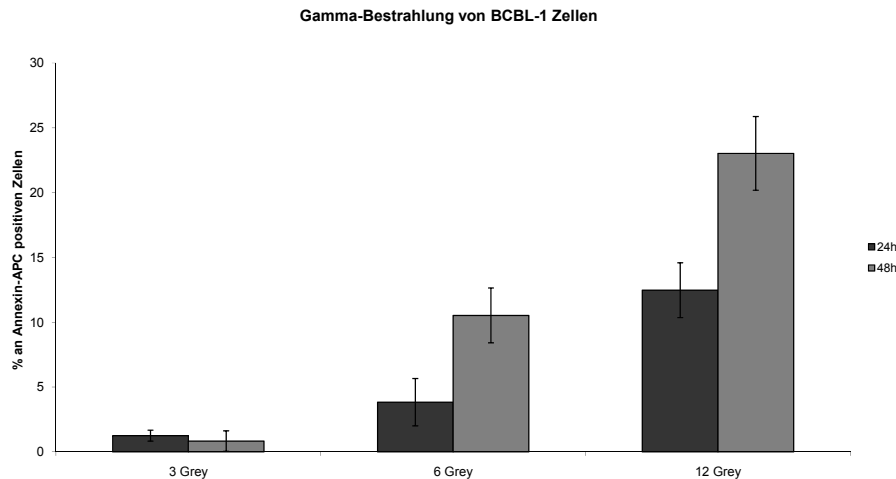


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose in BCBL-1 Zellen mittels Annexin V-Färbung nach unterschiedlichen Gamma-Strahlendosen. BCBL-1 Zellen wurden Strahlendosen von 3, 6 und 12 Grey ausgesetzt. Nach 24 und 48 Stunden wurden die Zellen zur Bestimmung der Apoptose-Induktion mit Annexin V-APC gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Kapitel 2.5.9). Zur Ermittlung der basalen Apoptose wurden unbehandelte BCBL-1 Zellen mitgeführt und von den berechneten Mittelwerten substrahiert.

Wie aus Abbildung 21 ersichtlich, führte eine Gamma-Strahlen Exposition von BCBL-1 Zellen zur Induktion von apoptotischen Prozessen, die mit Hilfe einer Annexin V-Färbung durchflusszytometrisch detektiert werden konnten. Während die Bestrahlung mit 3 Grey kaum Einfluss auf die Apoptoserate zeigte, konnte nach Bestrahlung mit 12 Grey und 48 Stunden nach Schadensinduktion eine Apoptoserate von 23% detektiert werden. Diese war mit der nach shDrosha Behandlung beobachteten Apoptoserate von 21% vergleichbar (siehe Abbildung 20). Wie die immunfluoreszenz-mikroskopischen Bilder in Abbildung 20 zeigen, konnte 72 Stunden nach erfolgter Gamma-Strahlen Exposition von 3, 6 oder 12 Grey kein Anstieg an ORF59-positiven Zellen beobachtet werden. Eine Initiation der Apoptose mit FasL (CD95L) hatte ebenso keinen Einfluss auf die ORF59 Expression (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend machen diese Daten deutlich, dass die Induktion von Apoptose in BCBL-1 Zellen keinen Einfluss auf die Reaktivierung von KSHV in diesen Zellen zur Folge hat.

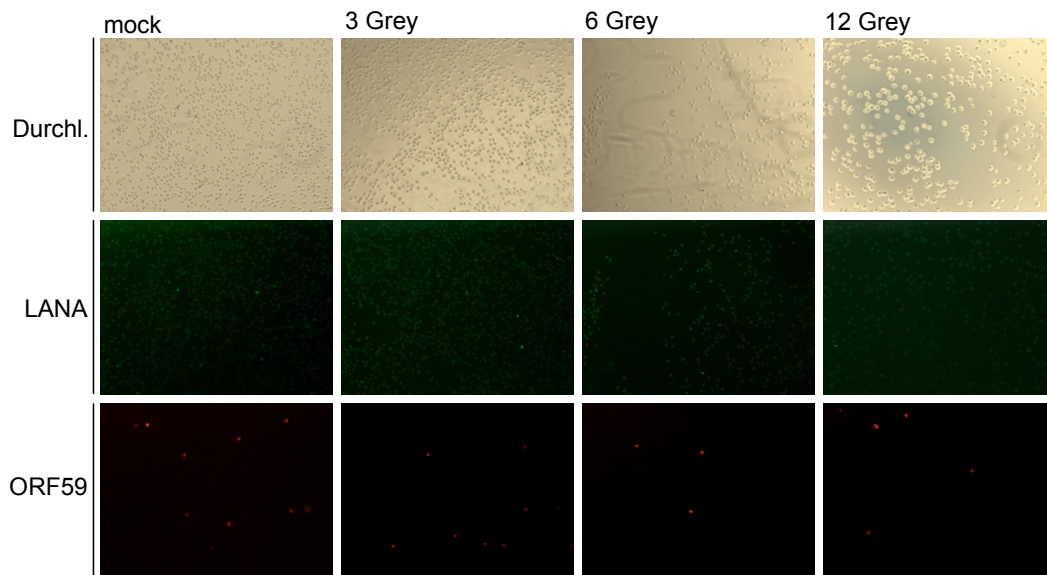


Abbildung 22: Immunfluoreszenz-mikroskopische Analyse der ORF59 Expression in BCBL-1 nach Gamma-Strahlen Exposition. BCBL-1 Zellen wurden mit 3, 6 und 12 Grey bestrahlt und nach 72 Stunden mit 4% PFA fixiert. Die Detektion der ORF59 Expression erfolgte mit einem primären α -ORF59 Antikörper und einem sekundären α -Maus-555 Antikörper. Zum Nachweis der LANA-1 Expression wurden die Zellen mit einem primären α -LANA-1 Antikörper und einem sekundären α -Hase-488 Antikörper inkubiert. Als Negativkontrolle sind nicht bestrahlte Zellen (mock) gezeigt.

Zusammenfassend machen diese Daten deutlich, dass die Induktion von apoptotischen Prozessen in BCBL-1 Zellen keinen Einfluss auf die Reaktivierung von KSHV zu haben scheint, zumindest wenn die Induktion durch Gamma-Bestrahlung sowie durch FasL erfolgt.

Lentivirale Kotransduktion von shDrosha und shDicer führt zur Induktion der lytischen Reaktivierung

Um auszuschließen, dass eine lentivirale Suppression von Dicer zur Initiation der lytischen KSHV Reaktivierung führen könnte, welche aufgrund der raschen Apoptoseinduktion jedoch nicht nachzuweisen ist, wurde der Einfluss einer gleichzeitigen Herabregulation von Drosha und Dicer auf die Induktion des lytischen Zykluses anhand von Kotransduktions-Experimenten untersucht. Hierzu wurden latent infizierten BCBL-1 Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der lentiviralen Überstände shDicer und shDrosha kotransduziert und die relative Transkriptmenge von ORF50, ORF59, Drosha

und Dicer nach 96 Stunden mittels RT-qPCR quantifiziert und die Expression von ORF59 zudem immunfluoreszenz-mikroskopisch analysiert. Als Kontrolle erfolgte eine Transduktion von pSico sowohl mit shDicer als auch mit shDrosha. Parallel wurden BCBL-1 Zellen ohne lentiviralen Überstand behandelt (mock). Die jeweiligen Transkriptmengen von drei unabhängigen Experimenten wurden analysiert und auf die GAPDH-mRNA normalisiert (siehe Abbildung 23). Die lentivirale Kotransduktion von BCBL-1 Zellen mit pSico und shDrosha (1:2,5 verdünnt) führte nach 96 Stunden zu einer 44-fachen Erhöhung der relativen Transkriptmenge von ORF50 (siehe Abbildung 23 A) und zu einer 90-fachen Zunahme der relativen Transkriptmenge von ORF59, welche statistisch signifikant waren (siehe Abbildung 23 B). Sowohl die Suppression von Drosha als auch von Dicer war in den Kotransduktions-Studien mit pSico signifikant erniedrigt (5-fach bzw. 4-fach, siehe Abbildung 23, C und D). Mit zunehmender Verdünnung der lentiviralen Überstände konnte eine verringerte Suppressions-Effizienz von Drosha und Dicer und damit einhergehend eine verringerte Zunahme der ORF50 und ORF59 Transkriptmenge nachgewiesen werden (siehe Abbildung 23).

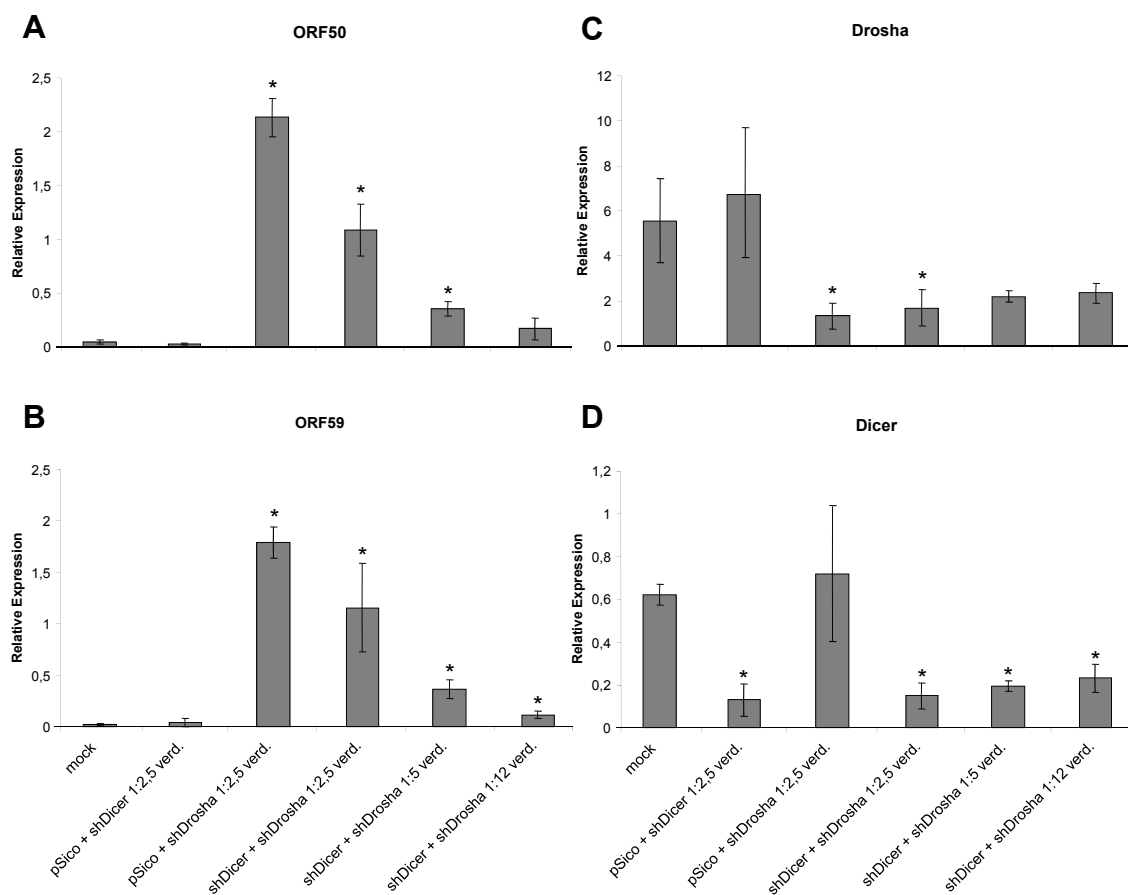


Abbildung 23: RT-qPCR Analyse von BCBL-1 nach Kotransduktion von shDicer und shDrosha zur Quantifizierung der relativen Transkriptmengen von ORF50, ORF59, Dicer sowie Drosha. Die lentiviralen Überstände von shDicer und shDrosha wurden 1:2,5, 1:5 und 1:12 mit Zellkulturmedium verdünnt, gemischt und zur Kotransduktion von BCBL-1 Zellen verwendet. Nach 96 Stunden erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA (siehe Kapitel 2.4.9) und anschließend die Reverse Transkription in cDNA (siehe Kapitel 2.4.10). Die Analyse der relativen ORF50- (A), ORF59- (B), Drosha- (C) und Dicer- (D) Transkriptmengen erfolgte mittels RT-qPCR Analyse (siehe Kapitel 2.4.12). Der relative Transkriptgehalt jeder Probe aus drei unabhängigen Experimenten (n=3) wurde ermittelt und auf das GAPDH Referenzgen bezogen. Die Fehlerbalken entsprechen jeweils dem Standardfehler. *p<0,05 vs. mock.

Die immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchung von BCBL-1 Zellen bestätigte die Ergebnisse der RT-qPCR Analyse anhand der Expression von ORF59 (siehe Abbildung 24). Die Kotransduktion von shDicer und shDrosha führte zu einer Induktion der ORF59 Expression in BCBL-1 Zellen (siehe Abbildung 22 D). Mit zunehmender Verdünnungen der lentiviralen Überstände (1:5 und 1:12) konnte eine Erniedrigung an ORF59-positiven Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 24, E und F).

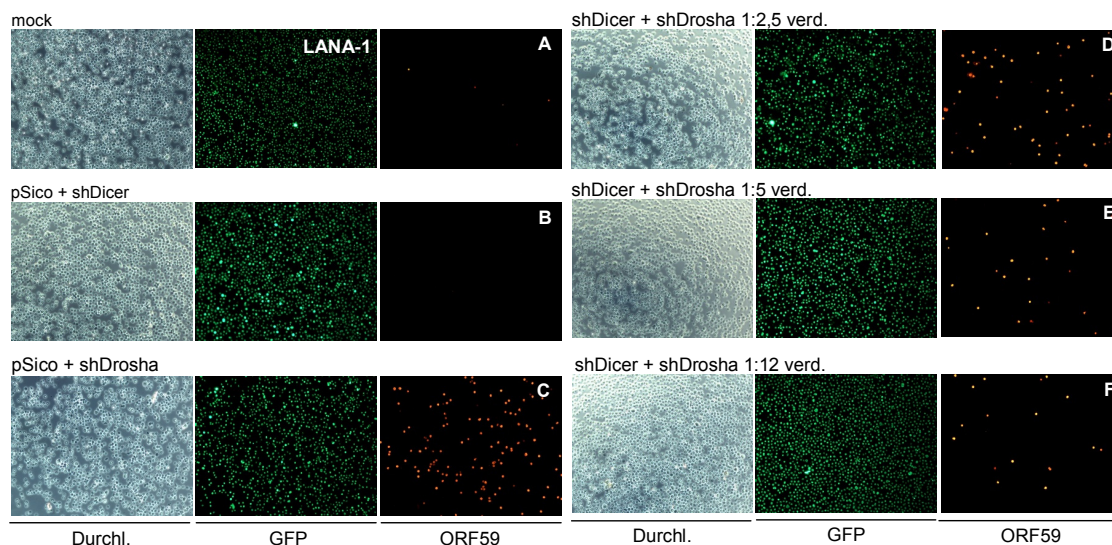


Abbildung 24: Analyse der ORF59 Expression in BCBL-1 Zellen nach Kotransduktion von shDicer und shDrosha mittels Immunfluoreszenz. BCBL-1 Zellen wurden mit shDicer und shDrosha in den angegebenen Verdünnungen des lentiviralen Überstands Kotransduziert und nach 96 Stunden zur Detektion der ORF59 Expression primären α -ORF59 Antikörper und einem sekundären α -Maus-633 Antikörper inkubiert.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass eine Kotransduktion von shDicer und shDrosha zur Induktion der lytischen Replikation in BCBL-1 Zellen führt. Da

die Aktivität von Dicer essentiell für die Prozessierung von shRNAs in wirksame siRNA-Moleküle ist, resultierte die Kotransduktion von shDrosha und shDicer in einer verringerten Suppressions-Effizienz und damit einhergehend in einer verringerten Induktion der lytischen Reaktivierung.

3.4 Einfluss einer shRNA-vermittelten Suppression von Drosha auf das zelluläre Genexpressionsprofil in BCBL-1 Zellen

Während der Erstellung dieser Arbeit konnte von Han et al. gezeigt werden, dass Drosha in der Lage ist pre-miRNA-ähnliche Haarnadelstrukturen in der mRNA seines Kofaktors DGCR8 zu schneiden, was folglich zu einer Destabilisierung des korrespondierenden Transkripts führte (Han et al., 2009). Auf Grundlage dessen könnte Drosha weitere zelluläre Transkripte mit pre-miRNA-ähnlichen Strukturen schneiden, welche nach Suppression von Drosha stabilisiert werden könnten und somit zur Induktion der lytischen KSHV Reaktivierung führen könnten. Um weitere zelluläre Transkripte zu identifizieren, welche direkt durch Drosha reguliert werden könnten, wurden Zweikanal-DNA-Microarray Analysen mit Hilfe des Whole Human Genome Microarrays der Firma Agilent durchgeführt (siehe Kapitel 2.7). Diese Technik ermöglicht die Messung der differentiellen Transkription aller bekannten humanen Gene in einem Experiment. Hierzu wurden BCBL-1 Zellen mit den lentiviralen Überständen shDicer oder shDrosha und pSico transduziert und die Gesamt-RNA nach 24 oder 48 Stunden isoliert. Die Gesamt-RNA aus shDicer oder shDrosha behandelten Zellen wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und diese durch den Einbau von Cy5-markierten CTPs mittels T7-abhängiger cRNA Synthese markiert. Ein Vergleich der Expressionsprofile erfolgte mit Cy3-markierter cRNA aus pSico behandelten BCBL-1 Kontrollzellen, welche anschließend zur Hybridisierung der Whole Human Genome Microarrays verwendet wurde. Für jeden Zeitpunkt wurden zwei unabhängige biologische Replikate mittels DNA-Microarray Analysen untersucht. In Abbildung 25 sind die Auswertungen der Genexpressionsanalysen nach einer Normalisierung in einem Scatter Plot repräsentativ dargestellt.

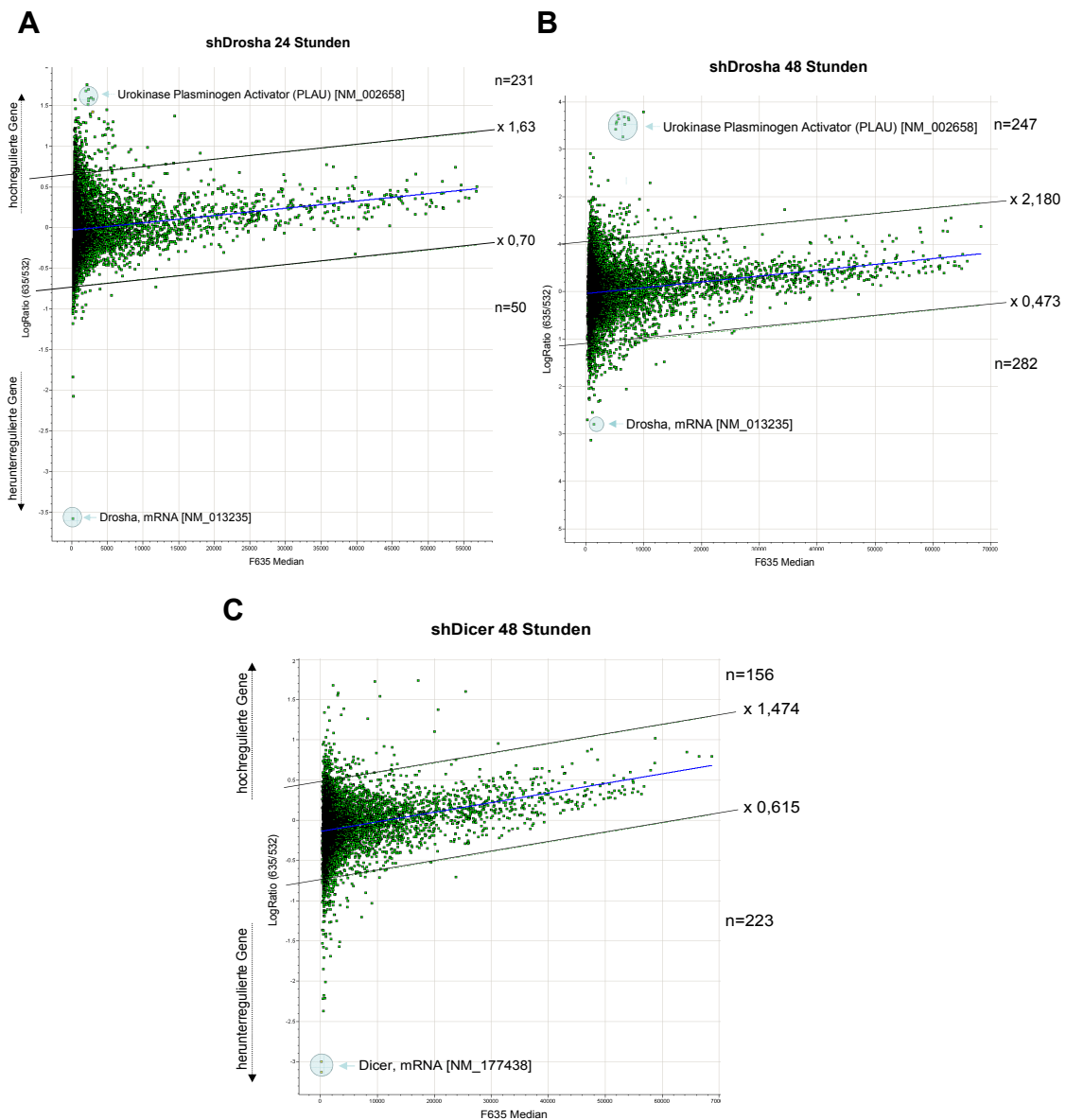


Abbildung 25: Scatter Plot der normalisierten Genexpressionsdaten nach Suppression von Dicer und Drosha in BCBL-1 Zellen. Das Expressionsprofil von shDicer (48 Stunden C) sowie shDrosha (24 und 48 Stunden A,B) behandelten Zellen (Cy-5 markiert) wurden mit pSico transduzierten BCBL-1 Zellen verglichen (Cy-3 markiert). Der Quotient aus den Signalintensitätswerten für die Cy-5 und Cy-3-Hybridisierung (635; 532), beschreibt den Grad der differentiellen Genexpression. Der zur Basis 2 logarithmierte Quotient der korrigierten Expressionswerte ($\log_{2} \text{Ratio } 635/532$, y-Achse) ist gegen den Median der Signalintensität der Cy-5 markierten cRNA der jeweiligen Probe (x-Achse) aufgetragen und gibt die relative Expressionsänderung an. Ein logarithmisches Verhältnis von 0 (blaue Linie) steht für eine balancierte Genexpression in beiden Proben und erhält einen fold-change von 1. Der Schwellenwert (cut-off) gibt den zur Basis 2 logarithmierten Wert der 2-fachen Standardabweichung der korrigierten Expressionswerte für die beiden Kanäle an und ist durch eine durchgezogene schwarze Linie repräsentiert, welche zudem den fold-change angibt. Gene, welche über oder unter dem Schwellenwert liegen sind potentiell hoch- bzw

herunterregulation und deren Anzahl angegeben. Die Pfeile geben signifikant regulierte Gene an.

Wie in Abbildung 25 gezeigt, konnte bereits 24 Stunden nach einer shRNA-vermittelten Suppression von Drosha, unter Berücksichtigung der 2-fachen Standardabweichung, eine differentielle Expression von insgesamt 297 Genen mittels Microarray Analysen identifiziert werden. Von diesen zeigten 230 Gene ein erhöhtes Expressionsniveau (siehe Abbildung 25 A). Nach 48 Stunden zeigten 247 Gene im Vergleich zu pSico behandelten Kontrollzellen eine erhöhte Expression (siehe Abbildung 25 B). Auffallend an diesen Microarray Analysen war die deutlich erhöhte Expression von PLAU (urokinase plasminogen activator, uPA), die in allen biologischen Replikaten zum untersuchten Zeitfenster nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 25 A und B, oberer Pfeil). Ein reduziertes Expressionsniveau konnte für 50 Gene nach 24 Stunden und für 282 Gene nach 48 Stunden in diesen Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 25 A, B). Sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden führte die Transduktion einer spezifischen shRNA gegen Drosha zu einer deutlichen Reduzierung der Drosha Transkriptmenge in BCBL-1 Zellen (12-fach bzw. 7-fach, siehe Abbildung 25 A, B). Nach Suppression von Dicer zeigten 156 Gene ein erhöhtes Expressionsniveau und 223 Gene eine reduzierte Expression (siehe Abbildung 25 C). Ebenso wie in shDrosha behandelten BCBL-1 Zellen führte die spezifische Suppression von Dicer zu einer enormen Abnahme der Dicer Transkriptmenge (siehe Abbildung 25 C). Um den herunterregulierten Genen, welche einer direkten Regulation des Mikroprozessors unterliegen könnten, biologisch relevanten Prozessen zuordnen zu können, wurden diese mit den Gen-Orthologie (GO) Annotationen des GO-Konsortiums verknüpft. Die GO-Annotationen stellen dabei ein einheitliches Vokabular für die Klassifizierung von Genen dar. Bei der Analyse der GO-Kategorien ergaben sich statistisch signifikante Häufungen von Genen, die mit der MHC-Klasse II Rezeptor-Aktivität, dem MHC-Klasse II Proteinkomplex sowie der Antigen Prozessierung und Präsentation über MHC-Klasse II Moleküle assoziiert sind (siehe Abbildung 26). Somit führt dieses Ergebnis zu der Vermutung, dass nach Suppression von Drosha zentrale Prozesse des Immunsystems signifikant reguliert sein könnten.

GO-Kategorie	Anzahl der Gene in dieser Kategorie	Anzahl aller Gene in dieser Kategorie	p-Wert
MHC-II Rezeptor-Aktivität	3	7	0,001
MHC-II Proteinkomplex	3	10	0,004
Antigen Prozessierung und Präsentation via MHC-II	3	14	0,008
MHC Proteinkomplex	5	30	<0,001
Antigen Prozessierung und Präsentation von Peptid-Antigenen	3	21	0,0032

Abbildung 26: Funktionelle Annotation der nach Suppression von Drosha hochregulierten Gene. Die mittels Microarray Analysen identifizierten Gene, welche in ihrer Expression 48 Stunden nach Suppression von Drosha induziert waren, wurden mittels GO-Annotationen hinsichtlich ihrer Signifikanz in biologischen Prozessen untersucht (www.llama.med.harvard.edu/funcassociate.com). Angegeben ist die Anzahl der aus insgesamt 40 analysierten Gene (n=2), die eine Assoziation zu der jeweiligen GO-Kategorie zulassen. Zudem ist die Anzahl aller Gene, welche sich in der jeweiligen Kategorie annotiert finden lassen, dargestellt. Die Ergebnisse der GO-Zuordnung sind statistisch signifikant.

Um direkt durch Drosha regulierte zelluläre mRNAs zu identifizieren, wurden nachfolgend die differentiell exprimierten Transkripte aus shDrosha und shDicer behandelten BCBL-1 Zellen miteinander verglichen. Nur solche Gene, die in ihrer Expression nach Suppression von Drosha aber nicht nach Suppression von Dicer induziert waren, wurden in den nachfolgenden Analysen betrachtet. In Abbildung 27 sind einige der nach Drosha Suppression hochregulierten Gene aus zwei biologischen Replikaten nach jeweils 24 und 48 Stunden dargestellt.

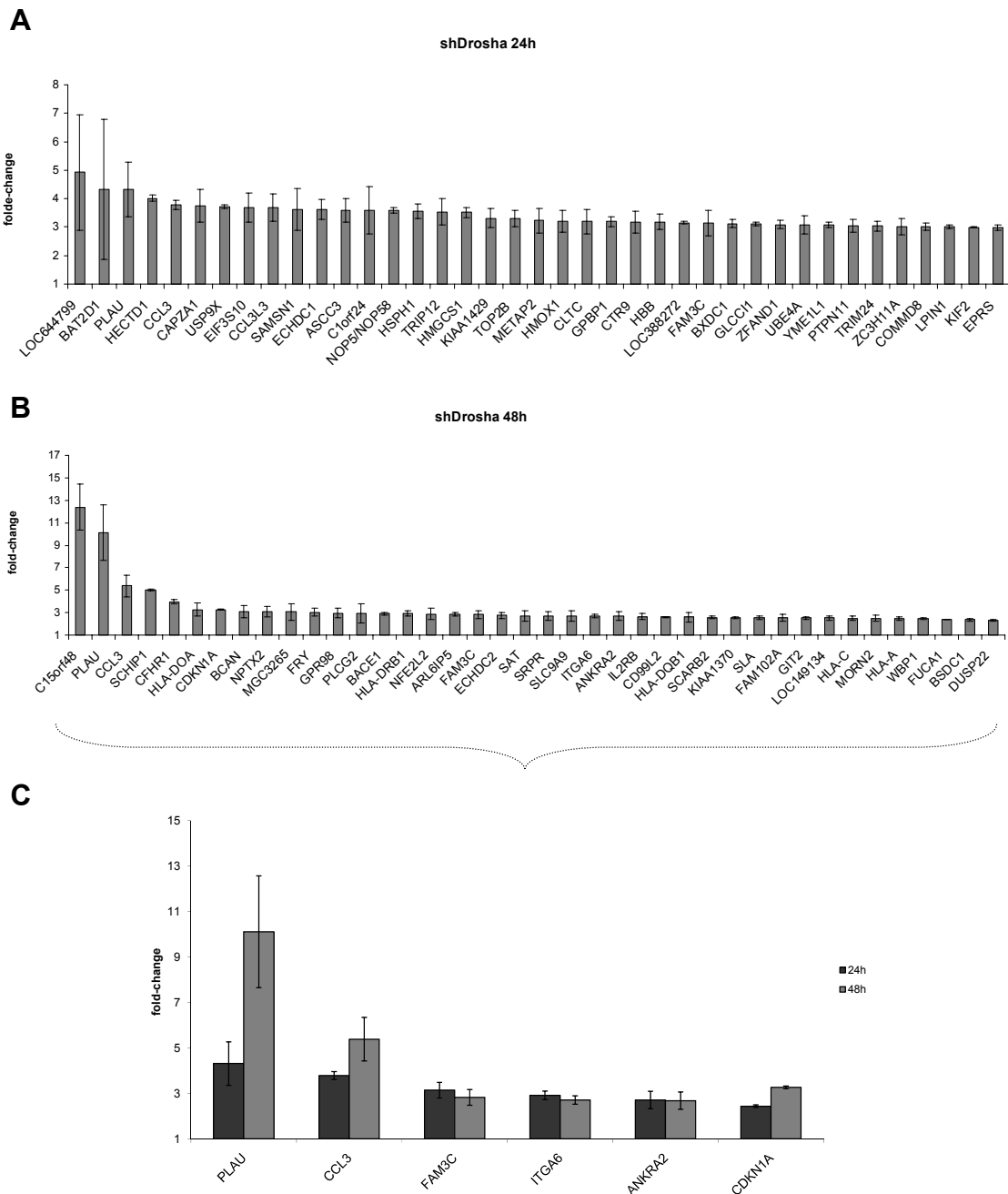


Abbildung 27: Eine shRNA-vermittelte Unterdrückung von Drosha induziert die Expression von zellulären Genen in BCBL-1 Zellen. Gezeigt sind mittels Zweikanal-DNA-Mikroarray Analysen identifizierte Gene, deren relative Expression 24 (A) und 48 (B) Stunden nach Suppression von Drosha im Vergleich zum Leervektor pSico am stärksten induziert wurde (n=2). (C) Dargestellt sind zudem die Gene, welche zu beiden untersuchten Zeitpunkten in allen Microarray Analysen induziert wurden. Die angegebenen fold-change Werte sind Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Gene sind in Abhängigkeit ihres fold-change absteigend dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen jeweils der Standardabweichung. Eine vollständige Liste der über 2-fach hochregulierten Gene 24 und 48 Stunden nach Transduktion einer shRNA gegen Drosha kann im Kapitel Anhang eingesehen werden.

Die Abbildung 27 fasst die Ergebnisse der Whole Human Genome Microarray Analysen zusammen. In den Diagrammen sind 40 Gene abgebildet, deren Expression durch Suppression von Drosha nach 24 und 48 Stunden im Vergleich zu pSico behandelten Kontrollzellen mindestens 2-fach induziert wurde (siehe Abbildung 27 A und B). Die DNA-Microarraydaten zeigten insgesamt eine gute Übereinstimmung zwischen den biologischen Replikaten zu den entsprechenden Zeitpunkten. Die Gene, welche sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden in ihrer Expression induziert waren, sind in Abbildung 27 C gezeigt. Wie bereits anhand der grafischen Darstellung der Expressionswerte im Scatter Plot beschrieben (siehe Abbildung 25 A und B), zeigte PLAU zu den untersuchten Zeitpunkten die höchste Induktion. Bereits nach 24 Stunden konnte eine um 4,3-fach erhöhte Transkriptmenge nachgewiesen werden, die im zeitlichen Verlauf der Analysen nach 48 Stunden auf das 10-fache anstieg. Beim zweiten am stärksten induzierten Gen handelte es sich um das CCL3 (chemokine C-C motif ligand 3), welches nach 24 Stunden eine 3,8-fache und nach 48 Stunden eine 5,4-fache Erhöhung der Expression in BCBL-1 Zellen zeigte (siehe Abbildung 27 C). Weitere in allen durchgeführten DNA-Microarray Analysen nach Drosha Suppression hochregulierten Gene waren: FAM3C (family with sequence similarity 3, member C), ITGA6 (integrin alpha 6), ANKRA2 (ankyrin repeat family A, 2) sowie CDNK1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21). Wie bereits erläutert konnte eine differentielle Expression der genannten Gene nach Suppression von Dicer in diesen Zellen mittels DNA-Microarray Analysen nicht nachgewiesen werden. Somit könnten diese Gene direkt durch den Mikroprozessor reguliert werden und zudem zur Aufrechterhaltung einer Balance zwischen der latenten und lytischen Infektionsform von KSHV beitragen. Aus diesem Grunde werden diese identifizierten Gene nachfolgend genauer betrachtet. Das FAM3C gehört neben FAM3A, FAM3B und FAM3D zu einer neuen Cytokine-ähnlichen Genfamilie dessen Genprodukt, welches auch als ILEI (interleukin-like EMT inducer) bekannt ist, eine wichtige Rolle in der Entstehung von Krebserkrankungen zu spielen scheint und in multiplen Tumoren mit einer erhöhten Expression gefunden werden kann (Zhu et al., 2002; Waerner et al., 2006). Das ITGA6 gehört zur Familie der Integrine, eine

große und funktionell wichtige Gruppe von Zelladhäsionsrezeptoren, welche mit Fibronektin assoziiert die Schicht der extrazellulären Matrix (ECM) bilden. Die Zell-adhäsionsrezeptoren vermitteln dabei die Anheftung von Zellen an die ECM und die Interaktion mit Nachbarzellen. Ein Vorgang der für den Verlauf von vielen Erkrankungen, wie beispielsweise bei der Metastasierung von Krebszellen, wichtig ist. Das ANKRA2 gehört zu einer Familie von Proteinen, die durch Wiederholung einer 33 Aminosäure langen Ankyrin-Domäne (ankyrin repeat domain, ARD) charakterisiert sind. Die Ankyrin-Domäne stellt eine Protein-Protein-Interaktionsmotif dar und kann in zahlreichen Proteinen, welche unterschiedliche Funktionen ausführen, gefunden werden (Mosavi et al., 2004). ANKRA2 steht im Verdacht zur Aktivierung der MHC-II Expression beizutragen (Wang et al., 2005). Das CDKN1A Gen kodiert einen Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen, welcher als p21 bezeichnet wird. Das p21 Protein ist in der Lage mit den cyclin-abhängigen Kinasen 2 und 4 (CDK2 und CDK4) zu interagieren und diese in ihrer Funktion zu inhibieren. Somit stellt es einen wichtigen Regulator beim Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzykluses dar (Übersicht in Jung et al., 2010). Aufgrund der deutlich erhöhten Expressionswerte von PLAU und CCL3 wurden diese Gene hinsichtlich ihrer Rolle in der Induktion der lytischen KSHV Replikation genauer untersucht. Der Rezeptorgebundene Plasminogen Aktivator vom Urokinase-Typ stellt eine Tumor-assoziierte Protease dar, welche induzierend auf die Auflösung der umgebenden Tumormatrix und Basalmembran wirkt. Damit spielt es bei Metastasierung und Wachstum von Tumorzellen sowie beim Primärtumorwachstum diverser solider Tumoren eine bedeutende Rolle (Übersicht in Blasti, 1997; Carmeliet und Collen, 1998; Tkachuk et al., 1996; Mohanam et al., 1999). Das PLAU Protein wird als einkettiges Proenzym (single-chain PLAU, scuPA), welches aus einer N-terminalen EGF (epidermal growth factor)-ähnlichen Domäne (GFD), einer Kringel-Domäne (KD) sowie einer Serinprotease-Domäne besteht, von Zellen in seiner inaktiven Form sezerniert (Peterson et al., 1988; Stepanova et al., 2008). Vermittelt durch die GFD-Domäne bindet scuPA an den Urokinase-Rezeptor (uPAR) auf der Oberfläche von Tumorzellen und wird durch Plasmin in ein proteolytisch aktives zweiketten Enzym (two-chain PLAU, tcuPA) umgewandelt (Appella et al., 1987; Lijnen et al., 1988). Die Aktivierung erfolgt am effektivsten

nach dem Anlagern von scuPA an zellgebundenes uPAR. Diese positive Rückkopplung führt zu einer verstärkten Aktivierung von Plasmin und löst dadurch den Abbau der ECM aus, was die Ausbreitung der Tumorzellen begünstigt. PLAU und sein Rezeptor uPAR bilden ein multifunktionelles System dessen induzierende Wirkung auf die Zellproliferation unter anderem durch das Zusammenspiel mit Integrinen gefördert wird (Chapman, 1997). Das CCL3 gehört zur Familie der Chemokine (chemoattractant cytokines), welche zahlreiche strukturell sehr ähnliche sekretorische Proteine mit einem Molekulargewicht von 6-14 kDa umfasst. Chemokine aktivieren verschiedene Chemokin-Rezeptoren und haben Funktionen im Zusammenhang mit der Zelladhäsion, der Zytokinsekretion, der Zellproliferation, der Apoptose und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Wachstums von Blutgefäßen. Aufgrund ihrer Struktur und biologischen Aktivität, vor allem durch die spezifische Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren, können sie in vier Untergruppen klassifiziert werden: C-, CC-, CXC- und CX3C-Chemokine. Ausschlaggebend ist dafür die Zahl und die Anordnung konservierter Cysteinreste in ihrer Sequenz. Das CCL3 (macrophage inflammatory protein-1 alpha, MIP-1 alpha) gehört zu den CC-Chemokinen, welche chemotaktisch auf Monocyten und Makrophagen wirken (Übersicht in Menten et al., 2002). Eine vollständige Auflistung der regulierten Gentranskripte befindet sich im Kapitel Anhang.

3.4.1 Verifizierung der differentiellen PLAU Expression in BCBL-1 Zellen mittels RT-qPCR

Zur Validierung der DNA-Microarray Ergebnisse wurden zunächst quantitative sowie semi-quantitative RT-PCR Analysen durchgeführt. Dazu wurden BCBL-1 Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der lentiviralen Überstände shDrosha und shDicer kotransduziert. Zur Quantifizierung der relativen Transkriptmenge von PLAU in diesen Zellen wurde dieselbe Gesamt-RNA wie in Abbildung 23 verwendet.

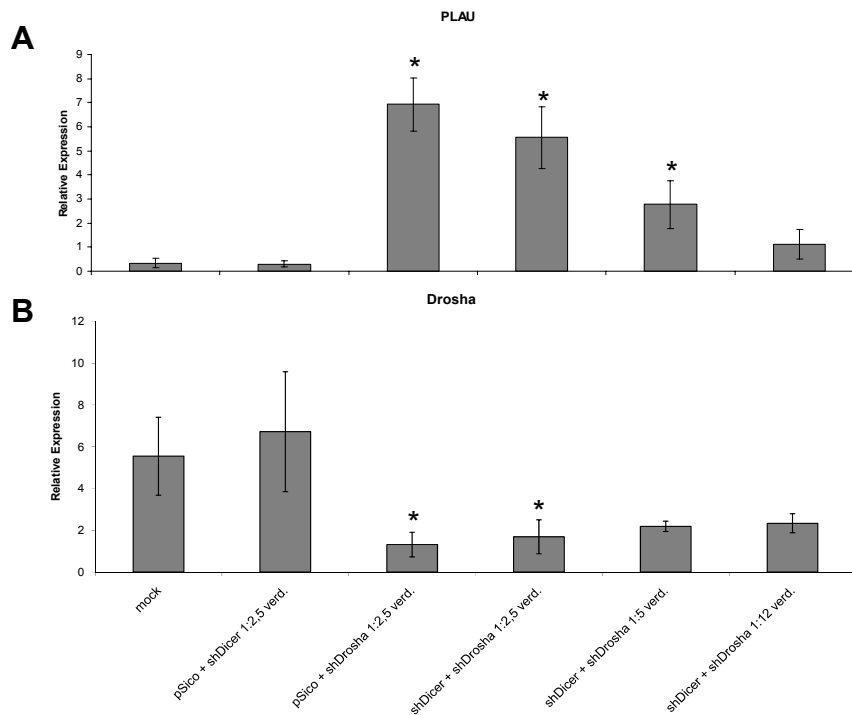


Abbildung 28: Bestätigung der differentiellen Regulation von PLAU nach Suppression von Drosha in BCBL-1 Zellen mittels RT-qPCR Analyse. BCBL-1 Zellen wurden mit den lentiviralen Überständen shDicer und shDrosha in den Verdünnungen 1:2,5, 1:5 sowie 1:12 kotransduziert. Nach 96 Stunden erfolgte die Quantifizierung der relativen Transkriptmenge von PLAU (A) und Drosha (B). Die relativen Transkriptmengen von ORF50, ORF59 sowie von Dicer sind in Abbildung 21 dargestellt, da zur Analyse dieselbe Gesamt-RNA verwendet wurde. Die Normalisierung erfolgte auf GAPDH. Die Fehlerbalken entsprechen jeweils dem Standardfehler. * $p < 0,05$ vs. mock; $n = 3$.

Wie in Abbildung 28 dargestellt, führte eine shRNA-vermittelte Suppression von Drosha zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der relativen Transkriptmenge von PLAU. Diese war nach lentiviraler Kotransduktion von pSico und shDrosha nach 96 Stunden im Vergleich zu mock-infizierten Zellen 20,5-fachen erhöht. Eine 16,6-fache Zunahme der PLAU mRNA konnte durch die Kotransduktion von shDicer mit shDrosha nachgewiesen werden. Mit zunehmender Verdünnung des lentiviralen Überstands (1:5 und 1:12) verringerte sich die Zunahme (8,1-fach bzw. 2,5-fach). Ein Nachweis der differentiellen PLAU Expression erfolgte zudem mittels semi-quantitativer RT-PCR Analysen (siehe Abbildung 29), die sowohl in BCBL-1 Zellen als auch in AP3 Zellen nach Herabregulation von Drosha eine Zunahme der Transkriptmenge von PLAU zeigten.

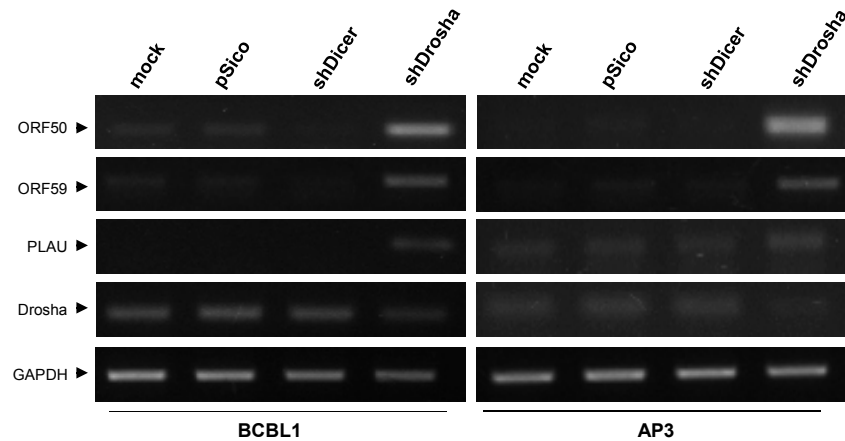


Abbildung 29: Expressionsnachweis von ORF50, ORF59 sowie von PLAU in an Drosha verarmten BCBL-1 und AP3 Zellen mittels semi-quantitativer RT-PCR. BCBL-1 und AP3 Zellen wurden mit dem lentiviralen Überständen pSico, shDicer und shDrosha transduziert sowie mock-infiziert. Die Analyse der ORF50, ORF59 und PLAU Expression erfolgte nach 96 Stunden mittels semi-quantitativer RT-PCR. Als interner Standard fungierte das Transkript von GAPDH.

Diese Daten machen zusammenfassend deutlich, dass eine shRNA-vermittelte Suppression von Drosha aber nicht von Dicer zu einer Induktion der Transkriptmenge von PLAU führt. Darüber hinaus bestätigen die durchgeführten quantitativen sowie semi-quantitativen RT-PCR Analysen die DNA-Microarray Ergebnisse.

3.4.2 Computerbasierte Analyse von pri-miRNA-ähnlichen Sekundärstrukturen der PLAU und CCL3 mRNA

Um zu überprüfen, ob die PLAU und CCL3 mRNA-Sequenz in der Lage ist pri-miRNA-ähnliche Haarnadelstrukturen auszubilden, welche durch den Mikroprozessor erkannt und geschnitten werden könnten, wurden computerbasierte Analysen durchgeführt. Zum Einsatz kam ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes Programm namens VMir, ein computerbasierter Algorithmus für die Vorhersage von putativen pre-miRNA Haarnadelstrukturen, welches bereits erfolgreich zur Identifizierung von miRNAs im Genom verschiedener Viren eingesetzt werden konnte (Grundhoff et al., 2006; Sullivan und Gundhoff, 2007; Walz et al., 2009). Charakteristisch für eine pri-miRNA Haarnadelstruktur ist ihre symmetrische Form mit wenigen, relativ kurzen

Ausbuchtungen in doppelsträngigen Bereichen (bulges und internal loops). Der Anteil an gepaarten Nukleotiden in der Stammstruktur ist somit relativ hoch und die terminale Haarnadelschleife mit höchstens 20 Nukleotiden relativ kurz. Das Programm nutzt diese Kriterien unter Berücksichtigung der minimalen Energie einer Faltung und bewertet die Haarnadelstrukturen durch einen Vergleich mit bereits bekannten pri-miRNA Strukturen. Anhand von komparativen Genomanalysen konnten zwei konservierte Haarnadelstrukturen in der DGCR8 mRNA identifiziert werden, welche starke Ähnlichkeiten zu denen von pri-miRNAs aufweisen (Pederson et al., 2006). Diese Strukturen sind zum einen in der 5'UTR und in der kodierenden Sequenz nahe dem Startcodon der DGCR8 mRNA lokalisiert (Pedersen et al., 2006) und als Referenz in Abbildung 30 A dargestellt. Der Mikroprozessor ist in der Lage die Haarnadelstrukturen zu schneiden und kontrolliert damit die Stabilität dieses Transkripts (Han et al., 2009). Mit Hilfe von Vorhersagen potentieller pri-miRNA Strukturen in der PLAU mRNA konnten zwei Sekundärstrukturen in der 3'UTR dieses Transkripts gefunden werden, welche die oben genannten Charakteristika aufweisen (siehe Abbildung 30 B). Die Stammstrukturen sind symmetrisch und zeigen wenige interne Schleifenstrukturen. Ein Vergleich mit den Haarnadelstrukturen des DGCR8 Transkripts ließ starke Ähnlichkeiten erkennen. Die Analyse auf mögliche Sekundärstrukturen der CCL3 mRNA mittels Vmir konnte eine Haarnadelstruktur in der 3'UTR dieses Transkripts vorhersagen (siehe Abbildung 30 C). Aufgrund der relativ großen internen Schleifen und ihrer Anzahl wurde diese pri-miRNA Struktur weniger gut bewertet. Diese Untersuchungen zeigen, dass sowohl die CCL3 mRNA aber besonders die PLAU mRNA in der Lage ist potentielle pri-miRNA-ähnliche Sekundärstrukturen auszubilden, welche folglich vom Mikroprozessor erkannt und von Drosha prozessiert werden könnten. Ist die Aktivität des Mikroprozessors gestört, würde dies zu einer Stabilisierung und Akkumulation der PLAU und CCL3 Transkripte führen, welche zur Induktion der lytischen KSHV Reaktivierung führen könnten.

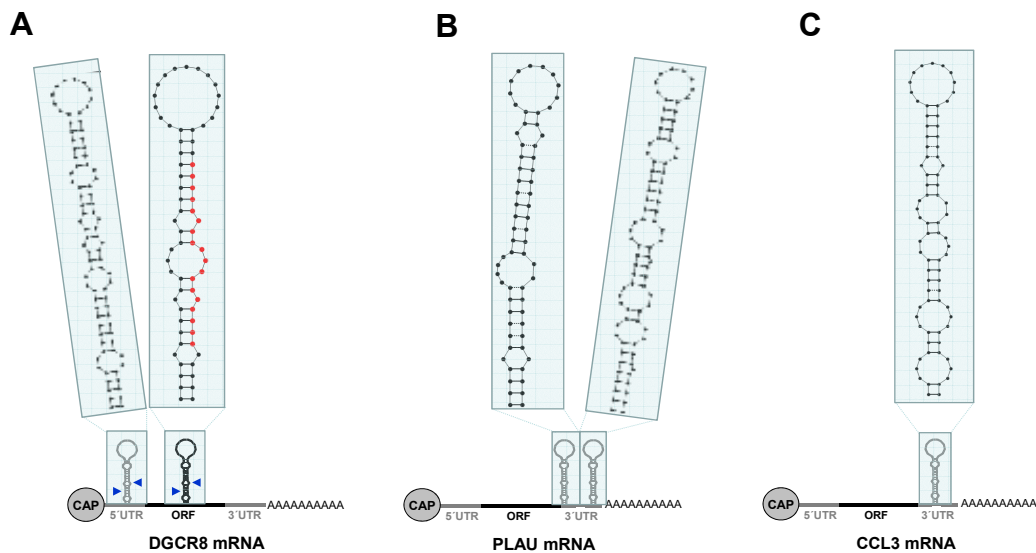


Abbildung 30: VMir Vorhersage von pri-miRNA Strukturen. Analyse der DGCR8 (A), PLAU (B) und CCL3 (C) mRNA auf die Ausbildung von möglichen pri-miRNA-ähnlichen Sekundärstrukturen mittels VMir. Die Haarnadelstrukturen der DGCR8 mRNA sind als Referenz gezeigt. Die zweite Haarnadelstruktur der DGCR8 mRNA im ORF beinhaltet zudem eine reife miRNA (rot), welche als miR-1306 bezeichnet wurde (Friedlander et al., 2008; Morin et al., 2008). Die entsprechenden Transkripte sind schematisch und die Lokalisation sowie die Form der Sekundärstrukturen in Kästchen dargestellt. Die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte VMir Software kann auf der Internetseite des Heinrich-Pette-Instituts heruntergeladen und genutzt werden (www.hpi-hamburg.de).

3.5 Einfluss einer lentiviralen Überexpression von PLAU und CCL3 auf die Induktion der lytischen KSHV Replikation

Um zu überprüfen, ob eine Überexpression von PLAU und CCL3 einen induzierenden Effekt auf die lytische KSHV Reaktivierung in BCBL-1 Zellen hat, wurden zunächst lentivirale Expressionsvektoren generiert. Das humane CCL3 Gen ist auf Chromosom 17 lokalisiert und kodiert für einen 280 bp langen ORF, welcher aus 3 Exons besteht. Das humane PLAU Gen liegt auf Chromosom 10 und kodiert für zwei alternativ gespleißte Transkripte. Das längere Transkript besteht aus 10 Exons und kodiert für einen 1296 bp ORF. Dem zweiten kürzeren Transkript fehlt demgegenüber das erste Exon. Zur Generierung von lentiviralen Expressionsvektoren wurde das CCL3 Transkript unter Verwendung der Oligonukleotidpaare CCL3 StuI Fw und CCL3 AU1 NotI Rv aus BCBL-1 cDNA mittels PCR amplifiziert (siehe Tabelle 1). Die Amplifikation des längeren PLAU Transkripts erfolgte mit den Oligonukleotiden PLAU StuI Fw und PLAU

AU1 NotI Rv (siehe Tabelle 1). Die PCR-Produkte zeigten die erwarteten Molekulargrößen von 280 bp sowie 1296 bp (siehe Abbildung 31 A) und wurden in den lentiviralen Expressionsvektor LeGO iG2 kloniert (Weber et al., 2008). Die erzeugten Konstrukte wurden als LeGO iG2 CCL3 bzw. LeGO iG2 PLAU bezeichnet und die Sequenz der klonierten PCR-Produkte sequenziert. Die Überprüfung der Sequenzierdaten des ORF von PLAU zeigte einen singulären Basenaustausch (single-nucleotide polymorphism, SNP) in der Basenfolge an Position 422, welcher in einer Änderung der Aminosäure Leucin zu Prolin resultiert. Wie Beqaj et al. aus Untersuchungen mit 26 humanen Nierenzelllinien zeigen konnte, lag die Frequenz des SNP in diesen Zelllinien bei 69% und zeigte keinen Einfluss auf die Funktion des PLAU Proteins (Beqaj et al., 2003). Nach erfolgter Produktion von lentiviralen Überständen schloss sich die Infektion von BCBL-1 Zellen an. Diese sollten an ihrem C-terminalen Ende mit einem AU1-Epitop markierte Proteine exprimieren. Für den Nachweis der Expression des AU1-Epitops wurden BCBL-1 Zellen 72 Stunden nach erfolgter Transduktion mit den lentiviralen Überständen im Immunoblot sowie im Immunfluoreszenz-Mikroskop unter Verwendung des Antikörpers α -AU1 analysiert (siehe Abbildung 31, B und C). Der durchgeführte Immunoblot zeigt die Expression des AU1-Epitop markierten CCL3 Proteins anhand der erwarteten Banden-Größe von ~11 kDa, dessen Expression zudem an der Zelloberfläche von transduzierten BCBL-1 Zellen im Immunfluoreszenz-Mikroskop nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 31, B und C). Ein Expressionsnachweis des AU1-Epitop markierten PLAU Proteins konnte im Immunoblot 72 Stunden nach erfolgter Infektion von BCBL-1 Zellen nicht erbracht werden. Sowohl durch unterschiedliche Verdünnungen des lentiviralen Überstands als auch durch frühere oder spätere Analysezeitpunkte konnte keine Expression des AU1-Epitops im Immunoblot nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Anhand von immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen konnte die Expression des AU1-Epitop markierten PLAU Proteins im Vergleich zu CCL3 in relativ wenigen BCBL-1 Zellen detektiert werden (siehe Abbildung 31 C).

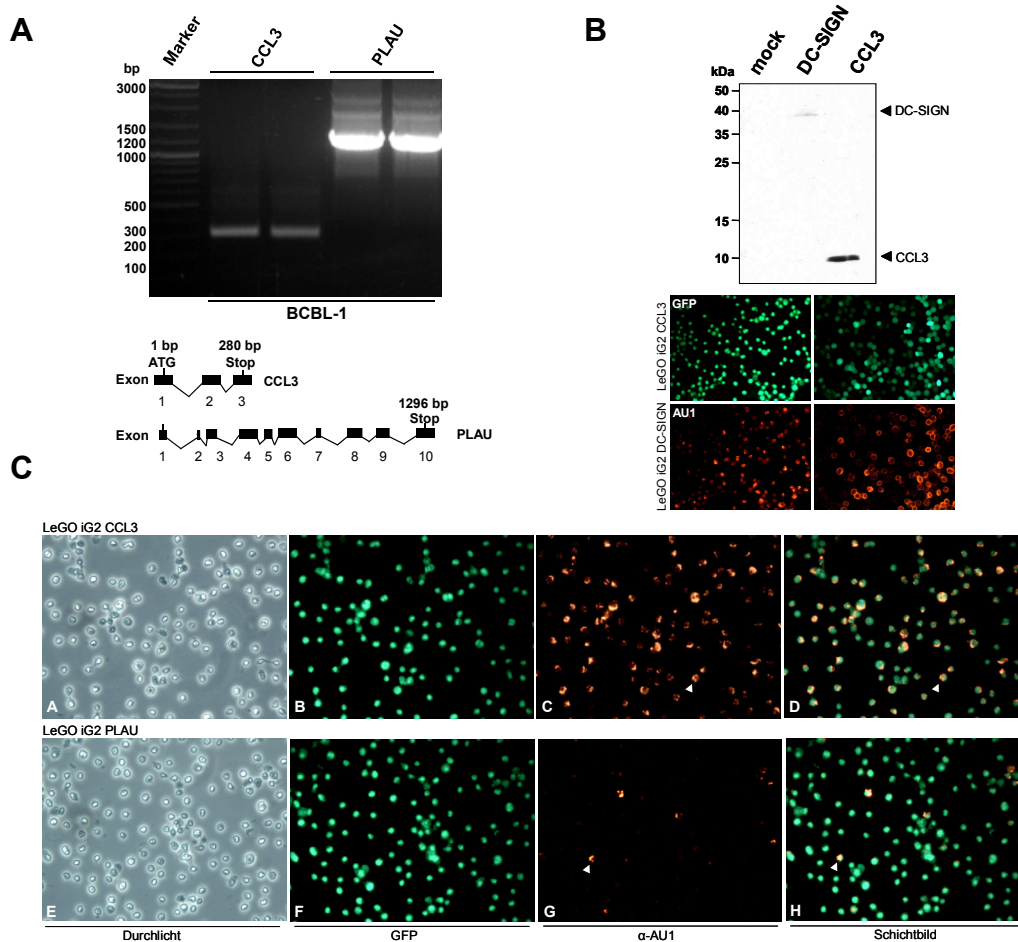


Abbildung 31: Generierung von lentiviralen CCL3 und PLAU Expressionsvektoren. (A) CCL3 und PLAU spezifische PCR mit cDNA aus BCBL-1 Zellen führte zur Amplifikation der erwarteten Banden-Größen von 280 bp (CCL3) und 1296 bp (PLAU). Die DNA-Fragmente wurden in den LeGO iG2 Vektor kloniert und sequenziert (siehe Kapitel 2.4.6). Das CCL3 Transkript beinhaltet 3 Exons und das längere PLAU Transkript 10, die schematisch dargestellt sind. (B) Detektion von CCL3 (~11 kDa) mit einem primären α -AU1 Antikörper (1:1000, monoklonal) und einem sekundären α -Maus Antikörper nach lentiviraler Transduktion von BCBL-1 Zellen mit LeGO iG2 CCL3. Als Positivkontrolle wurde der lentivirale Expressionsvektor LeGO iG2 DC-SIGN verwendet (hergestellt von C. Henning im Zuge ihrer Master-Arbeit). (C) Immunfluoreszenz-Mikroskopie von BCBL-1 Zellen 72 Stunden nach lentiviraler Transduktion von LeGO iG2 CCL3 und LeGO iG2 PLAU. Die Detektion von CCL3 sowie von PLAU erfolgte mit einem primären α -AU1 Antikörper und einem sekundären α -Maus-555 Antikörper. Die Pfeile zeigen CCL3 (C und D) bzw. PLAU (G und H) exprimierende Zellen an. (B und F) BCBL-1 Zellen exprimieren nach erfolgreicher Transduktion das durch LeGO iG2 kodierte Reportergen (GFP). (D und H) Schichtbild von B und G (CCL3) bzw. von F und G (PLAU). (A und E) Durchlicht-mikroskopische Aufnahme von BCBL-1 Zellen zum Zeitpunkt der Analyse.

Zusammenfassend konnte sowohl das CCL3 Transkript als auch das längere PLAU Transkript mittels PCR aus BCBL-1 Zellen amplifiziert und nachfolgend in den lentiviralen LeGO iG2 Expressionsvektor kloniert werden. Die lentivirale Transduktion von BCBL-1 Zellen mit LeGO iG2 CCL3 führte zur Expression des AU1-Epitop markierten CCL3 Proteins, während die Expression des AU1-Epitope markierten PLAU Proteins in relativ wenigen BCBL-1 Zellen nachgewiesen werden konnte.

Führt eine lentivirale Transduktion von PLAU und CCL3 zur Induktion der ORF50 Expression in BCBL-1 Zellen?

Nach erfolgter Generierung der lentiviralen Expressionsvektoren LeGO iG2 CCL3 und LeGO iG2 PLAU, wurde die Wirkung der AU1-Epitop markierten Proteine auf die Induktion der lytischen KSHV Replikation in BCBL-1 Zellen mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Dazu wurden BCBL-1 Zellen mit den entsprechenden lentiviralen Überständen zur Expression von PLAU und CCL3 transduziert, nach 72 Stunden fixiert und gegen das AU1-Epitop sowie gegen ORF50 doppelgefärbt. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie nach lentiviraler Transduktion von LeGO iG2 PLAU dargestellt.

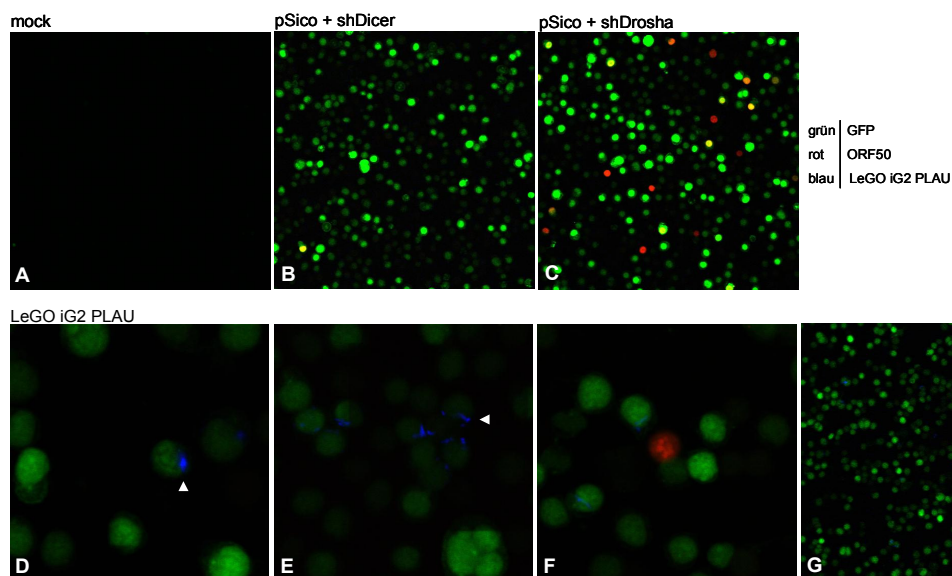


Abbildung 32: Analyse der AU1 sowie ORF50 Expression in BCBL-1 Zellen nach lentiviraler Transduktion von LeGO iG2 PLAU mittels konfokaler Mikroskopie. BCBL-1 Zellen wurden mit dem lentiviralen Überstand LeGO iG2 PLAU transduziert (D-G) sowie zur Kontrolle mit pSico und shDicer (B) oder mit pSico und shDrosha (C) kotransduziert. Die

Detektion des AU1-Epitope erfolgte nach 72 Stunden mit einem primären α -AU1 Antikörper und einem sekundären α -Maus-633 Antikörper (blau, A-G). Zum Nachweis der ORF50 Expression in denselben Zellen, wurde ein primärer α -ORF50 Antikörper und ein sekundärer α -Hase-555 Antikörper (rot) verwendet (A-G). Erfolgreich transduzierte BCBL-1 Zellen exprimieren das durch den lentiviralen Expressionsvektor kodierte GFP (grün, B-G). Die Analyse der dreifachgefärbten Proben erfolgte an einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (siehe Kapitel 2.5.8). Die Pfeile zeigen die Expression des AU1-Epitope markierten PLAU Proteins an (D und E).

Die Expression des AU1-Epitop markierten PLAU Proteins konnte nach 72 Stunden an der Zelloberfläche weniger transduzierter BCBL-1 Zellen detektiert werden (siehe Abbildung 32, D und E). Jedoch hatte die lentivirale Infektion von BCBL-1 Zellen mit LeGO iG2 PLAU keinen Einfluss auf die ORF50 Expression (siehe Abbildung 32, D-F). Gleiches konnte nach lentiviraler Überexpression von CCL3 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch zu späteren Zeitpunkten der Analyse und unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen der lentiviralen Überstände war keine Koexpression der AU1-Epitop markierten Proteine und ORF50 mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie in diesen Zellen nachzuweisen. Wie eingangs erläutert (siehe Kapitel 3.5) kodiert das humane PLAU Gen für zwei alternativ gespleißte Transkripte. Im Gegensatz zur längeren Transkriptvariante, welche zur lentiviralen Überexpression kloniert wurde und 10 Exons beinhaltet, fehlt dem kürzeren Transkript das erste Exon (siehe Abbildung 31 A). Um die Wirkung der alternativ gespleißten Transkriptvariante auf die Induktion der lytischen KSHV Replikation zu untersuchen, wurde der entsprechende ORF in den LeGO iG2 Expressionsvektor kloniert und zur lentiviralen Transduktion von BCBL-1 Zellen verwendet. Durch eine nachfolgende Analyse der ORF50 Expression im Fluoreszenz-Mikroskop ließ sich keine Veränderung des ORF50 Expressionsniveaus in diesen Zellen nachweisen (Daten nicht gezeigt). Wie Poliakov et al. zeigen konnten, führt die Spaltung von scuPA durch Plasmin zur Entlassung der GFD-Domäne und damit zu einer Form von PLAU, die nicht mehr in der Lage ist an uPAR zu binden (Poliakov et al., 2001). Diese Form konnte aber nach Translokation in den Zellkern die Expression von glattmuskulärem alpha-Aktin (alpha-SMA) induzieren (Plekhanova et al., 2006). Somit könnte PLAU an der Modulation der Gentranskription beteiligt sein. Auf

Grundlage dieser Beobachtung wurde eine GFD-Deletionsmutante von PLAU hergestellt und in BCBL-1 Zellen lentiviral überexprimiert. Initial durchgeführte Experimente konnten auch hier keinen induzierenden Effekt auf die Expression von ORF50 aufzeigen (Daten nicht gezeigt). Somit scheint die lentivirale Überexpression von PLAU sowie von CCL3 keinen Einfluss auf die Induktion der lytischen KSHV Reaktivierung in BCBL-1 Zellen zu haben.

3.6 Differentielle Proteinexpression nach Suppression von Drosha in BCBL-1 Zellen

In Analogie zu den Untersuchungen zur Veränderung der Genexpression auf mRNA-Ebene mit Hilfe von DNA-Microarrays (siehe Kapitel 3.4) sollten mittels differentieller Proteinexpressionsanalysen Proteine identifiziert werden, die einen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen viraler Reaktivierung und Suppression des RNase III Enzyms Drosha liefern. Da Drosha an dem Prozess der post-transkriptionellen Regulierung durch direkte Destabilisierung von mRNAs beteiligt ist (Han et al., 2009), wurde die Auswirkung auf Proteinebene mittels 2-dimensionaler (2D) Gelelektrophorese untersucht. Hierbei werden die einzelnen Proteine eines Proteingemisches in der ersten Dimension durch den Einsatz von immobilisierten pH-Gradienten zunächst isoelektrisch fokussiert und anschließend in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Für die Proteomanalysen wurden BCBL-1 Zellen mit einer shRNA gegen Drosha lentiviral transduziert. Nach 48 Stunden erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA, welche zunächst zur Untersuchung der relativen Transkriptmengen von Drosha, ORF50 und ORF59 mittels RT-qPCR analysiert wurde. Die lentivirale Transduktion von BCBL-1 Zellen mit shDrosha führte zu diesem Zeitpunkt zu einer 7,6-fachen Erniedrigung der relativen Transkriptmenge von Drosha sowie zu einer 19-fachen bzw. 36-fachen Zunahme des mRNA-Gehalts von ORF50 und ORF59 (siehe Abbildung 33 B). Nach Bestätigung der erfolgreichen Suppression von Drosha wurde die Proteinextraktion der geernteten Zellen durchgeführt und 1,5 mg Gesamtprotein in einem präparativen Gel aufgetrennt. Parallel wurde mit mock-infizierten BCBL-1 Zellen verfahren. Die Visualisierung der aufgetrennten Proteine erfolgte

durch das Anfärben der Gele mit Coomassie-Blau. Die Suppression von Drosha in BCBL-1 Zellen führte im Vergleich zu mock-infizierten Kontrollzellen über einen Bereich von pH 4-7 zu einer deutlichen Zunahme der Intensität von fünf detektierten Proteinspots (siehe Abbildung 33 A). Die differentiell exprimierte Proteine wurden aus dem präparativen Gel ausgestochen und zur Identifizierung in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Friedrich Buck (UKE Hamburg) massenspektrometrisch untersucht. Zwei der fünf Proteine konnten nachfolgend als 14-3-3 zeta und 14-3-3 theta identifiziert werden. Das humane 14-3-3 zeta Protein wird vom Gen YWHAZ (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide) kodiert und gehört zusammen mit 14-3-3 theta zu einer Familie von konservierten regulatorischen Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 30 kDa, welche in allen eukaryontischen Organismen exprimiert werden (Aitken et al., 1992, Aitken, 1995). Durch Bindung an unterschiedliche Interaktionspartner sind sie unter anderem in der Lage in den Zellzyklus, in Signaltransduktionswegen und im Tumorwachstum regulierend einzugreifen (Übersicht in Tzivion und Avruch, 2002; Yaffe und Elia, 2001).

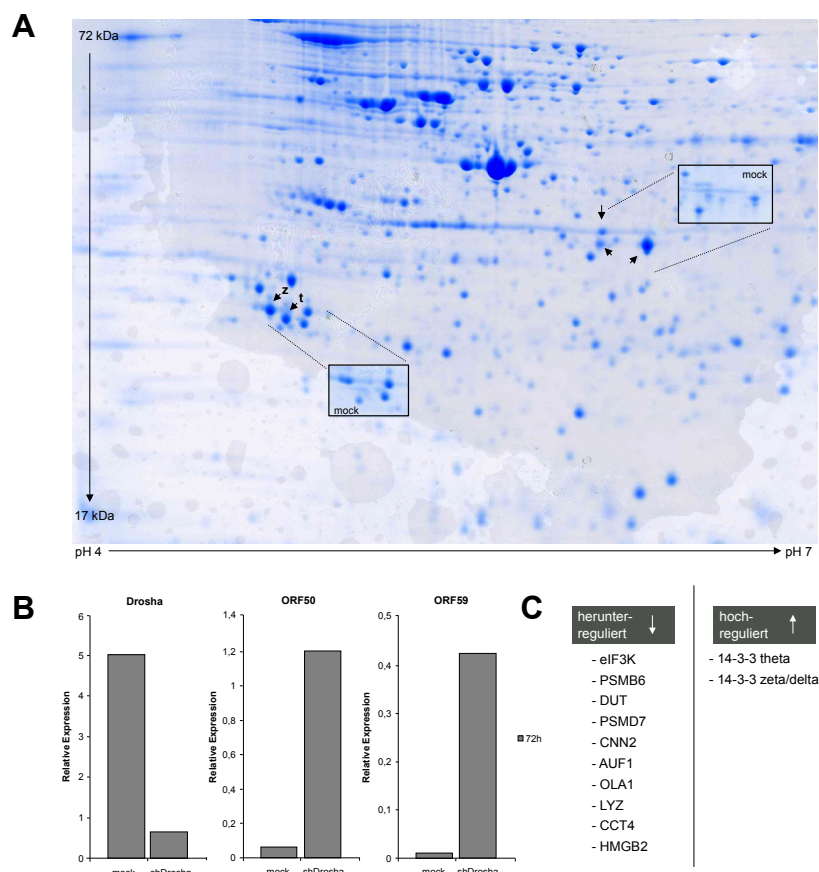


Abbildung 33: Proteomanalyse von BCBL-1 Zellen nach shRNA-vermittelter Suppression von Drosha mittels 2D-Gelelektrophorese. (A) BCBL-1 Zellen wurden mit einer shRNA gegen Drosha transduziert und die differentielle Proteinexpression nach 48 Stunden mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert. Proteine, die in ihrer Expression im Vergleich zu mock-infizierten BCBL-1 Zellen erhöht waren sind durch Pfeile gekennzeichnet (z= 14-3-3 zeta; t= 14-3-3 theta). Die entsprechenden Proteinspots der mock-infizierten Kontrollenzellen sind in Kästchen dargestellt. Die isoelektrische Fokussierung der Proteine erfolgte im pH-Bereich 4-7, wobei das Molekulargewicht dieser von 17 bis 72 kDa reichte. Das Ergebnis der 2D-Gelelektrophorese nach Coomassie-Blau Färbung ist repräsentativ dargestellt. (B) Analyse der relativen Drosha, ORF50 und ORF59 Transkriptmenge auf die Effizienz der Suppression von Drosha in BCBL-1 Zellen mittels RT-qPCR. (C) Liste aller mittels 2D-Gelelektrophorese identifizierten Proteine, welche im Vergleich zu BCBL-1 Kontrollzellen sowohl hoch- als auch herunterreguliert waren.

Durch Proteomanalysen von BCBL-1 Zellen nach shRNA-vermittelter Suppression von Drosha im Bereich pH 6-9 (Daten nicht gezeigt) konnten weitere Proteine identifiziert werden, welche eine Abnahme der Spotintensität im Vergleich zu BCBL-1 Kontrollzellen zeigten (siehe Abbildung 33 C). Eine vollständige Bezeichnung der identifizierten Proteine ist im Anhang zu finden. Aufgrund der Tatsache, dass Drosha an der Regulation von mRNAs direkt beteiligt sein kann, könnten die identifizierten Proteinen direkt oder indirekt in ihrer Expression durch den Mikroprozessor beeinflusst sein.

3.6.1 Verifizierung der differentiellen 14-3-3 zeta Expression in BCBL-1 Zellen

Um die Befunde der Proteomanalyse zu bestätigen, wurden BCBL-1 Zellen 48 Stunden nach erfolgter lentiviraler Transduktion von shDrosha mittels Immunoblot zum Nachweis der 14-3-3 zeta Expression untersucht. Zudem erfolgte die Expressionsanalyse des entsprechenden Transkripts mittels semi-quantitativer RT-PCR. Wie sich zeigte, führte die Suppression von Drosha sowohl auf Proteinebene als auch auf transkriptioneller Ebene zu einer verstärkten Expression von 14-3-3 zeta (siehe Abbildung 34 A und B). Darüber hinaus führte die Herabregulation von Dicer zu keiner Zunahme des 14-3-3 zeta Transkripts (siehe Abbildung 34 B). Semi-quantitative RT-PCR Analysen in BCBL-1 und Raji Zellen, eine KSHV-negative und EBV-positive B-Zelllinie, zeigten zudem nach Induktion der lytischen KSHV bzw. EBV Replikation durch

Natriumbutyrat Behandlung eine erhöhte Expression des 14-3-3 zeta Transkripts (siehe Abbildung 34 C).

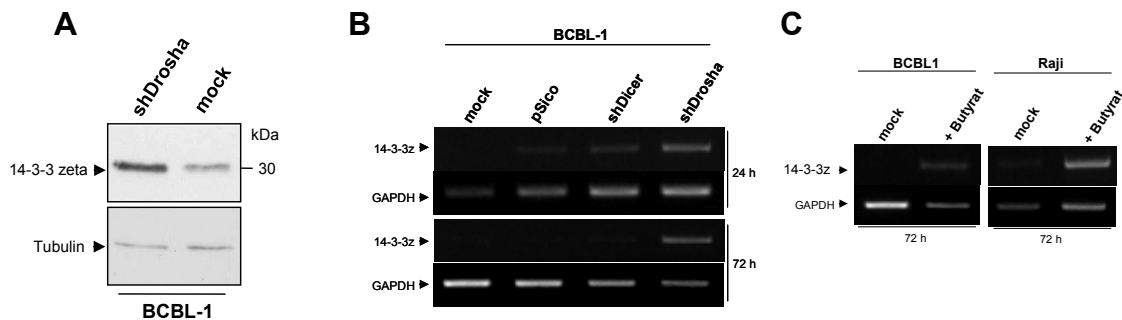


Abbildung 34: Expressionsnachweis der 14-3-3 zeta Expression. (A) Analyse des Expressionsniveaus von 14-3-3 zeta 48 Stunden nach lentiviraler Transduktion von BCBL-1 Zellen mit shDrosha. Die Detektion von 14-3-3 zeta erfolgte mit einem primären α -14-3-3 zeta Antikörper (1:1000, monoklonal) und einem sekundären α -Hase Antikörper. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. (B und C) Semi-quantitative RT-PCR zur Expressionsanalyse des 14-3-3 zeta Transkripts mit den angegebenen lentiviralen Überständen nach 24 und 72 Stunden in BCBL-1 Zellen. Ein Nachweis des 14-3-3 zeta Transkripts erfolgte zudem 72 Stunden nach Induktion der lytischen KSHV bzw. EBV Replikation durch Natriumbutyrat in BCBL-1 und Raji Zellen.

Diese Daten bestätigen die Befunde der Proteomanalysen hinsichtlich einer gesteigerten Proteinexpression von 14-3-3 zeta in an Drosha verarmten BCBL-1 Zellen. Inwieweit diese differenzielle Expression von 14-3-3 zeta, wie ebenso auf transkriptioneller Ebene gezeigt, im Zusammenhang mit einer Fehlregulation des Mikroprozessors steht und darüber hinaus eine funktionelle Relevanz in der Induktion der lytischen KSHV Replikation in BCBL-1 Zellen spielt, kann zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen nicht klärend beantwortet werden.

3.7 Identifizierung von zellulären Zieltranskripten KSHV-kodierter miRNAs

In den letzten Jahren wurden in mehreren Studien insgesamt 12 KSHV-kodierte miRNAs identifiziert (miR-K12-1-12, siehe Kapitel 1.3.1), welche koordiniert in infizierten Zellen exprimiert werden. Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Identifizierung von zellulären Zieltranskripten der KSHV-kodierten miRNAs. Da die Bindung von miRNAs an komplementäre Bereiche ihrer Ziel-mRNA nicht nur zu einer translationalen Inhibition, sondern oftmals auch zu einer Destabilisierung der Transkripte führt (Lim et al., 2005; Bagga et al., 2005), können Microarray Analysen prinzipiell zur Identifizierung möglicher miRNA Zieltranskripte genutzt werden. Auf Grundlage dieser Befunde wurden die KSHV-kodierten miRNAs stabil in Zellen exprimiert und die Veränderung des gesamten mRNA Expressionsprofils dieser Zellen mittels Microarray Analysen untersucht.

3.7.1 Generierung von Zellen mit einer stabilen Expression von KSHV-kodierten miRNAs

Um Zellen mit einer stabilen Expression aller KSHV-kodierten miRNAs herstellen zu können, wurde zunächst ein Expressionsvektor konstruiert. Hierzu erfolgte die Amplifikation der 12 KSHV-kodierten miRNAs mittels PCR aus genomischer BCBL-1 DNA, welche im Anschluss in den Expressionsvektor pcDNA3 eingefügt wurden. Der hergestellte Expressionsvektor wurde nachfolgend als pMIR-KSHV bezeichnet und kodierte zudem für das Reportergen GFP sowie für ein Neomycinresistenzgen zur Selektion in eukaryontischen Zellen (siehe Abbildung 35). Der als pcDNA3-GFP bezeichnete Leervektor diente in den nachfolgenden Untersuchungen als Negativkontrolle.

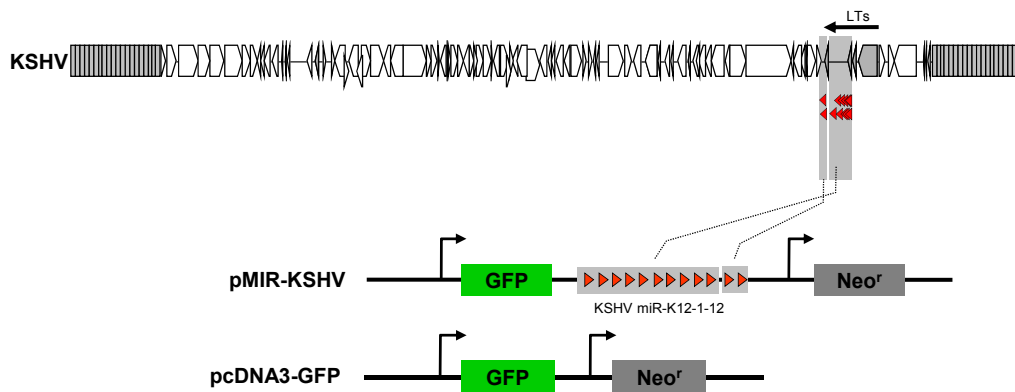


Abbildung 35: Herstellung eines Vektors zur Überexpression aller KSHV-kodierten miRNAs. Die KSHV-kodierten miRNAs miR-K12-1-9 wurden unter Verwendung der Oligonukleotidpaare miR-K12-1 Fw und miR-K12-9 Rv mittels PCR aus genomischer BCBL-1 DNA amplifiziert und in die BamHI/EcoRI Schnittstelle des pcDNA3 Expressionsvektors kloniert. Die Amplifikation der miRNAs miR-K12-10 und miR-K12-12 erfolgte mit Hilfe der Oligonukleotidpaare miR-K12-10 Fw und miR-K12-12 Rv, welche anschließend in die XhoI/EcoRI Schnittstelle des Vektors kloniert wurde. Im Anschluß erfolgte eine Sequenzierung der Fragmente. Das als pMIR-KSHV bezeichnete Expressionskonstrukt kodiert neben GFP, unter der Kontrolle eines CMV Promoters, zusätzlich für eine Neomycinresistenz. Als Negativkontrolle fungierte der mit pcDNA3-GFP bezeichnete Leervektor. Die Lage der KSHV-kodierten miRNAs (rote Pfeile) im schematisch dargestelltem KSHV Genom (oben) sind zur Orientierung angegeben (LT=Latente Transkripte, vergleiche Abbildung 3; modifiziert nach Grundhoff)

Für die Generierung von stabilen Zellen wurde die humane B-Zelllinie BJAB gewählt und die linearisierten Expressionsvektoren pMIR-KSHV sowie pcDNA3-GFP mittels Elektroporation in diese eingeschleust. Nach 48 Stunden erfolgte die Zugabe des Antibiotikums Neomycin zur Selektion auf resistente BJAB Zellen, welche die Expressionsvektoren in ihr Genom integriert hatten. Die erforderliche Antibiotikakonzentration für die Selektion wurde in Vorversuchen ermittelt, indem die mit pcDNA3-GFP elektroporierten BJAB Zellen mit steigenden Konzentrationen von Neomycin behandelt wurden. Die Konzentration wurde zur Selektion verwendet, bei der nach zweiwöchiger Inkubation nur noch GFP-exprimierende Zellen nachgewiesen werden konnten. Um den Erfolg der Selektion zu überprüfen, wurden die Zellen anhand ihrer GFP Expression durchflusszytometrisch sortiert und die Gesamt-RNA auf eine koordinierte Expression aller KSHV-kodierter miRNAs mittels Northern Blot analysiert.

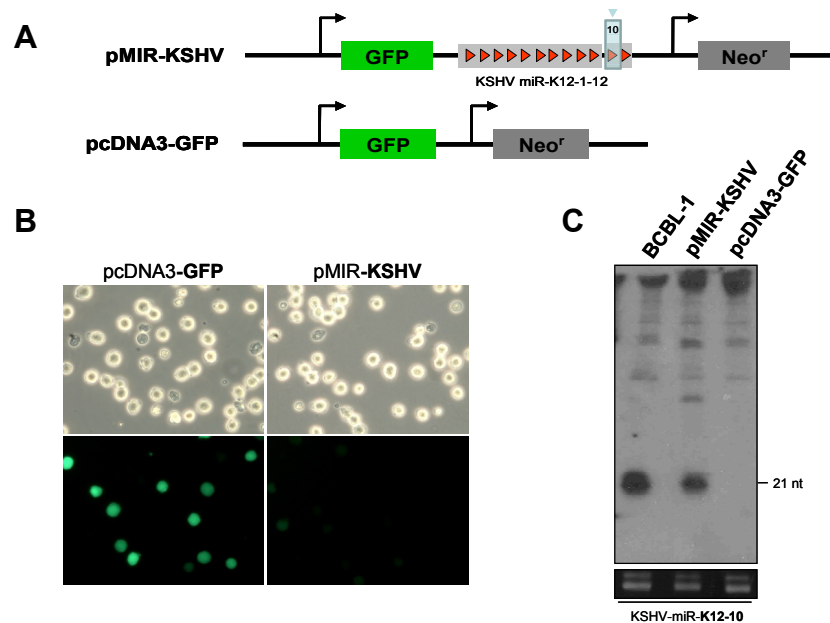


Abbildung 36: Stabile Expression KSHV-kodierter miRNAs und GFP in BJAB Zellen. (A) Schematische Darstellung der verwendeten Expressionsvektoren. (B) BJAB Zellen wurden mit den Expressionsvektoren pMIR-KSHV und pcDNA3-GFP elektroporiert und selektioniert (siehe Kapitel 2.2.7). Der Erfolg der Selektionierung wurde anhand der GFP Expression nach zweiwöchiger Inkubation der Zellen mit 100 µg/ml Neomycin am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. (B) Nachweis einer stabilen Expression der KSHV-kodierten miR-K12-10 in BJAB Zellen nach zweiwöchigem Selektionsdruck mittels Northern Blot Analyse (siehe Kapitel 2.5.13). Als Positivkontrolle wurden latent infizierte BCBL-1 Zellen verwendet. Von jeder Probe wurden 14 µg Gesamt-RNA analysiert. Die angegebene Marker-Größe von 21 Nukleotiden gibt die Größe der reifen miRNA an. Der Northern Blot ist repräsentativ gezeigt. In Abbildung 33 ist der Expressionsnachweis der miR-K12-11 für das pMIR-KSHV Konstrukt dargestellt.

Wie in Abbildung 36 dargestellt, resultierte die Elektroporation und Selektion von BJAB Zellen mit dem generierten Expressionsvektor pMIR-KSHV sowohl in einer stabilen Expression von GFP als auch der virusspezifischen miR-K12-10. Beim Vergleich mit latent infizierten BCBL-1 Zellen konnte ein leicht verringertes Expressionsniveau der KSHV-kodierten miR-K12-10 festgestellt werden. Die stabile Expression von pcDNA3-GFP in BJAB Zellen führte erwartungsgemäß zu keiner Expression der untersuchten miRNA. Anhand von fluoreszenz-mikroskopischen Analysen ließ sich jedoch im Vergleich zu pMIR-KSHV exprimierenden Zellen eine deutlich gesteigerte GFP Expression in diesen Zellen nachweisen, welche sich ferner mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestätigte (Daten nicht gezeigt). Es stellte sich daher die Frage, inwieweit die erhöhte GFP Expression in pcDNA3-GFP exprimierenden Zellen durch

mögliche sekundäre oder unspezifische Effekte einen Einfluss auf das zelluläre Genexpressionsprofil von BJAB Zellen haben könnte. Um eine Verfälschung der DNA-Microarray Untersuchungen zu minimieren, wurde ein IRES- (internal ribosome entry site) Element in den pcDNA3-GFP Expressionsvektor eingefügt und der erzeugte Kontrollvektor als pcDNA3-IRESGFP bezeichnet. Nach Generierung von stabilen pcDNA3-IRESGFP sowie pMIR-KSHV exprimierenden BJAB Zellen, in Analogie zur eingangs beschriebenen Durchführung, wurden die Zellen hinsichtlich ihrer GFP Expression fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Ein Nachweis der virusspezifischen miRNA Expression erfolgte zudem mittels Northern Blot Analysen. Nach Modifikation des pcDNA3-GFP Kontrollvektors durch das Einfügen eines IRES-Elements konnte eine erniedrigte GFP Expression, welche vergleichbar zu pMIR-GFP exprimierenden BJAB Zellen war, nachgewiesen werden (siehe Abbildung 37). Die Elektroporation und Selektion von BJAB Zellen mit pMIR-KSHV führte zu einer nachweisbaren und stabilen Expression der KSHV-kodierten miR-K12-11 (siehe Abbildung 37 C). Auch hier zeigte sich im Vergleich zu BCBL-1 Zellen ein leicht erniedrigtes Expressionsniveau der analysierten miRNA. Die Insertion der 12 von KSHV-kodierten miRNAs in den pMIR-KSHV Vektor erfolgte in zwei Klonierungsschritten. Da anhand von Northern Blot Analysen die Expression von je einer miRNA aus den entsprechenden Fragmenten gezeigt werden konnte (siehe Abbildungen 36 und 37), kann von einer koordinierten Expression der miRNAs ausgegangen werden.

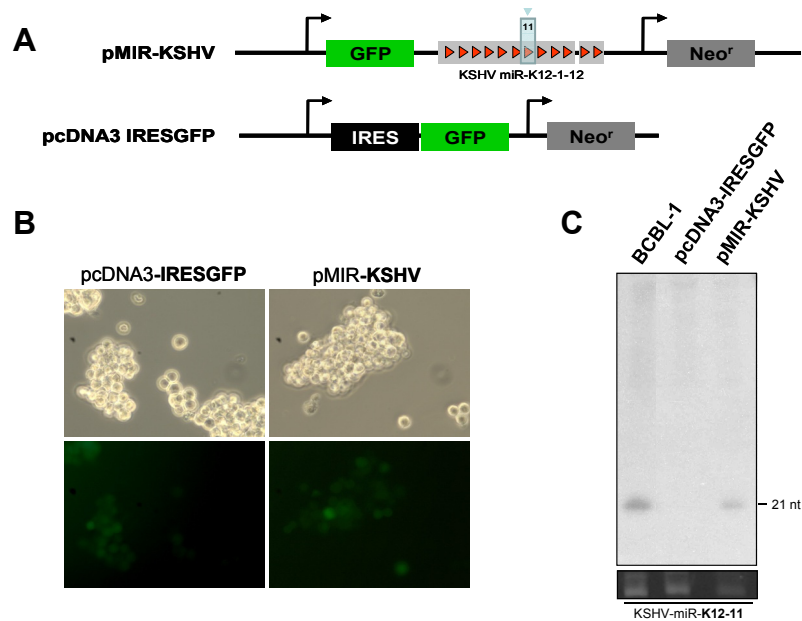


Abbildung 37: Stabile Expression KSHV-kodierter miRNAs und vergleichbare GFP-Expressionsniveaus in BJAB Zellen. (A) Darstellung des als pcDNA3-IRESGFP bezeichneten Kontrollvektors nach Modifikation durch das Einfügen eines IRES-Elements. (B) Nachweis und Vergleich der GFP Expression nach Herstellung von BJAB Zellen mit stabiler Expression von pcDNA3-IRESGFP und pMIR-KSHV mittels Fluoreszenz-Mikroskopie. (C) Expressionsnachweis der miR-K12-11 in BJAB Zellen (vergleiche Abbildung 32).

Zusammenfassend ist es gelungen BJAB Zellen mit einer stabilen Expression von allen KSHV-kodierten miRNAs zu generieren, deren gesamtes mRNA Expressionsprofil nachfolgend im Vergleich mit parallel hergestellten pcDNA3-GFP bzw. pcDNA3-IRESGFP exprimierenden Zellen mittels DNA-Microarray Analysen untersucht wurde.

3.7.2 Analyse von KSHV-kodierten miRNAs auf das zelluläre Genexpressionsprofil in BJAB Zellen

Die Analyse einer stabilen ektoptischen Expression der KSHV-kodierten miRNAs auf das mRNA Expressionsprofil von BJAB Zellen erfolgte mittels Zweikanal-DNA-Microarray Analysen in Analogie zur Identifizierung von zellulären Transkripten nach Suppression von Drosha (siehe Kapitel 2.7 und Kapitel 3.4). Hierzu wurde die cRNA aus den generierten pMIR-KSHV exprimierenden BJAB Zellen durch den Einbau von Cy5-markiertem CTP markiert. Eine Markierung der cRNA aus pcDNA3-GFP bzw. pcDNA3-IRESGFP

exprimierenden Zellen erfolgte mit Cy3-markiertem CTP. Anschließend wurden die Expressionsprofile unter Verwendung des Whole Human Genome Microarrays der Firma Agilent miteinander verglichen. In Abbildung 38 sind die Auswertungen der Genexpressionsanalysen nach einer Normalisierung in einem Scatter Plot dargestellt (siehe Kapitel 2.7).

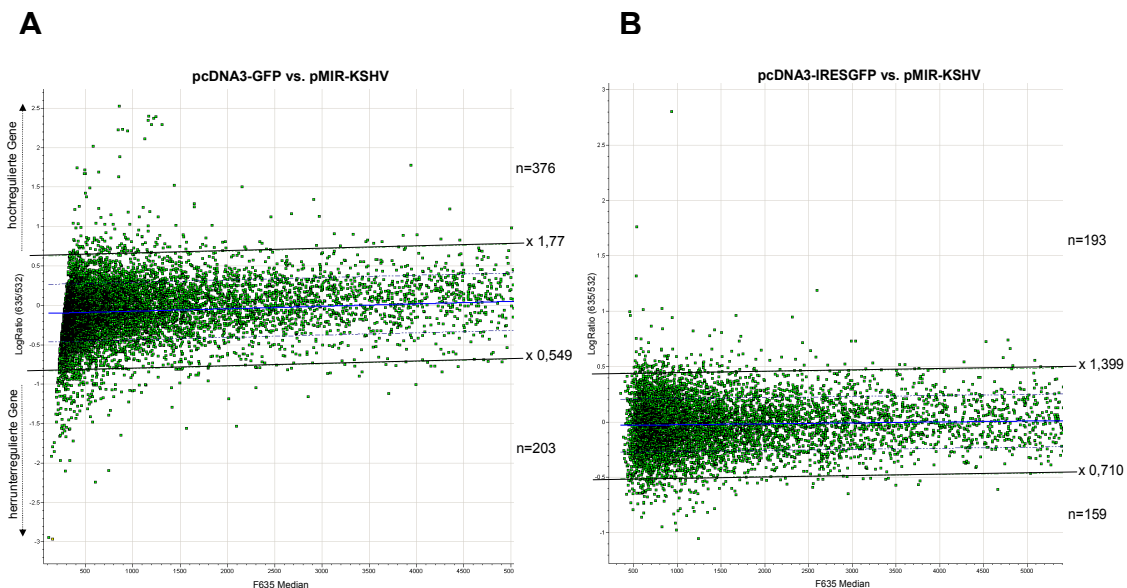


Abbildung 38: Scatter Plot der normalisierten Genexpressionsdaten aus BJAB Zellen mit einer stabilen Expression aller KSHV-kodierten miRNAs. Das Expressionsprofil von pMIR-GFP exprimierenden BJAB Zellen, welche sich durch eine stabile Expression der virusspezifischen miR-K12-1-12 auszeichnen, wurde mit stabil pcDNA3-GFP (A) oder pcDNA3-IRESGFP (B) exprimierenden BJAB Zellen verglichen. Der zur Basis 2 logarithmierte Quotient der korrigierten Expressionswerte (logRatio 635/532, y-Achse) ist gegen den Median der Signalintensität der Cy-5 markierten cRNA aus pMIR-KSHV exprimierenden Zellen (x-Achse) aufgetragen und gibt die relative Expressionsänderung an. Ein logarithmisches Verhältnis von 0 (blaue Linie) steht für eine balancierte Genexpression in beiden Proben und erhält einen fold-change von 1. Der Schwellenwert (cut-off) gibt den zur Basis 2 logarithmierten Wert der 2-fachen Standardabweichung der korrigierten Expressionswerte für die beiden Kanäle an und ist durch eine durchgezogene schwarze Linie repräsentiert, welche zudem den fold-change angibt. Gene, welche sich über oder unter dem Schwellenwert befinden sind potentiell hoch- bzw herunterreguliert und deren Anzahl angegeben.

Wie aus Abbildung 38 ersichtlich, führte die stabile Expression von allen KSHV-kodierten miRNAs in BJAB Zellen im Vergleich zu pcDNA-GFP exprimierenden Kontrollzellen unter Berücksichtigung der 2-fachen Standardabweichung zu einem erhöhten Expressionsniveau von 376 Genen. Eine verminderte

Expression konnte für 203 Gene in diesen Zellen mittels Microarray Analysen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 38 A). Beim Vergleich der mRNA Expressionsprofile von pMIR-KSHV mit pcDNA3-IRESGFP exprimierenden Zellen zeigten 193 Gene eine erhöhte Expression während 159 Gene in ihrer Expression reduziert waren (siehe Abbildung 40 B). Um den herunterregulierten Genen, welche potentielle Zieltranskripte KSHV-kodierter miRNAs darstellen, biologisch relevanten Prozessen zuordnen zu können, wurden diese mit den Gen-Orthologie (GO) Annotationen des GO-Konsortiums verknüpft. Bei der Analyse der GO-Kategorien ergaben sich statistisch signifikante Häufungen von Genen, die interessanterweise mit Antworten auf virale Infektionen, anderen Organismen sowie mit der Antwort auf biotische Stimuli assoziiert sind (siehe Abbildung 39). Darüber hinaus zeigte sich, dass einige Gene an dem Prozess der Immunantwort beteiligt sind sowie eine wichtige Rolle im Immunsystem spielen.

GO-Kategorie	Anzahl der Gene in dieser Kategorie	Anzahl aller Gene in dieser Kategorie	p-Wert
Antwort auf Viren	14	143	<0,001
Antwort auf andere Organismen	15	275	<0,001
Antwort auf biotischen Stimuli	20	438	<0,001
Multi-Organismus Prozess	23	671	<0,001
Immunantwort	17	547	0,003
Immunsystem-Prozesse	19	798	0,014
Antwort auf Stimulus	48	3341	0,005

Abbildung 39: Funktionelle Annotation der nach ektopischen Expression der KSHV-kodierten miRNAs herunterregulierten Gene. Die unter Berücksichtigung der 2-fachen Standardabweichung herunterregulierten Gene aus Microarray Analysen von pcDNA3-GFP und pMIR-GFP exprimierenden BJAB Zellen, wurden mittels GO-Annotationen hinsichtlich ihrer Signifikanz in biologischen Prozessen analysiert (www.llama.med.harvard.edu/func-associate.com). Angegeben ist die Anzahl der aus insgesamt 130 analysierten Gene, die eine Assoziation zu der jeweiligen GO-Kategorie zulassen. Zudem ist die Anzahl aller Gene, welche sich in der jeweiligen Kategorie annotiert finden lassen, dargestellt. Die Ergebnisse der GO-Zuordnung sind statistisch signifikant.

Nachfolgend sind 40 Gene dargestellt, welche in einem Vergleich der Expressionsprofile von pcDNA3-GFP mit pMIR-KSHV sowie von pcDNA3-

IRESGFP mit pMIR-KSHV herunterreguliert waren und somit potentielle Zieltranskripte KSHV-kodierter miRNAs darstellen. Eine vollständige Liste der potentiellen miR-K12-1-12 Zieltranskripte kann im Kapitel Anlagen eingesehen werden.

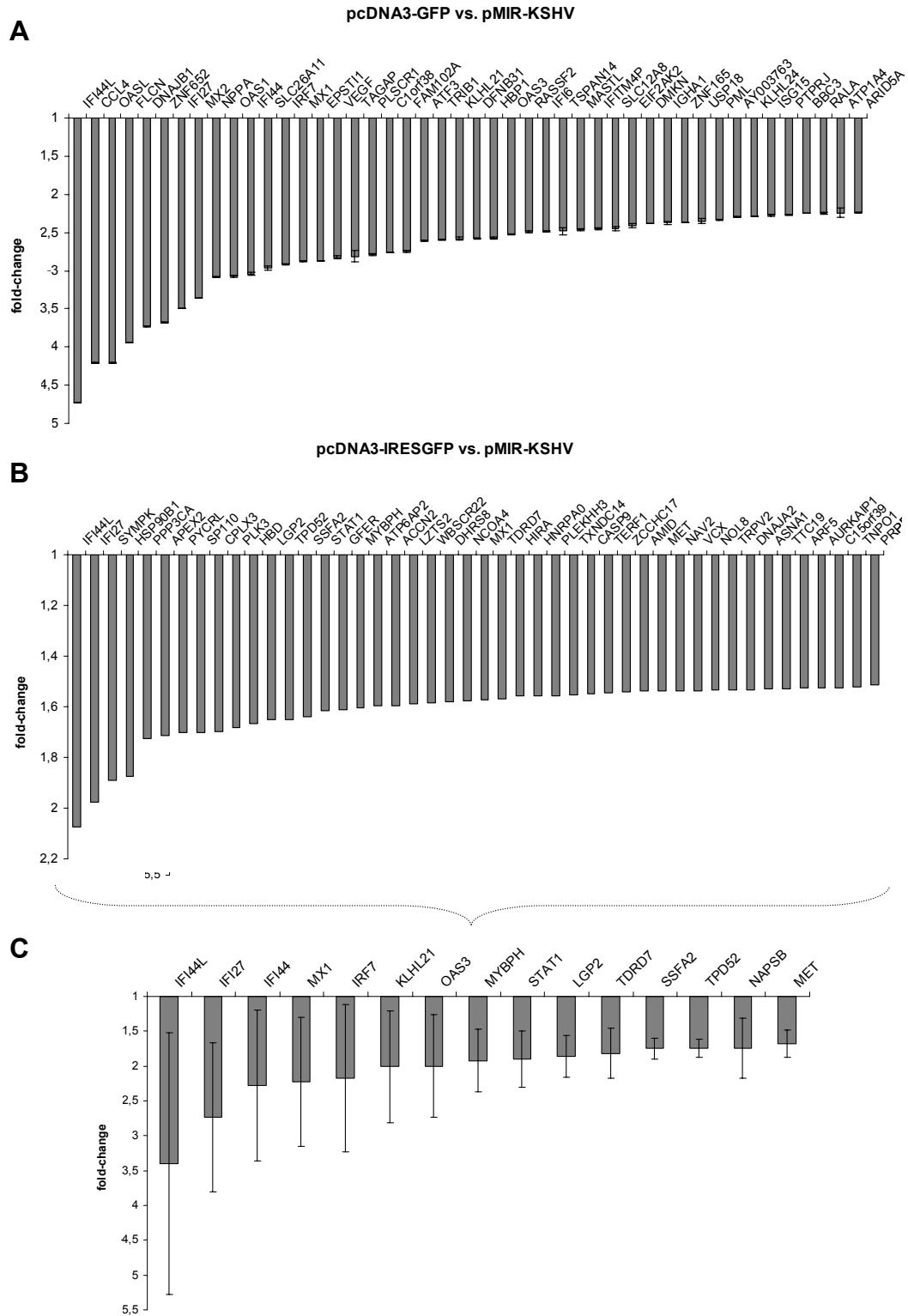


Abbildung 40: Eine stabile ektopische Expression aller KSHV-kodierten miRNAs führt zu einer verminderten Expression von zellulären Genen in BJAB Zellen. Potentielle Zieltranskripte KSHV-kodierter miRNAs. Gezeigt sind jeweils 40 mittels Microarray Analysen identifizierte Gene, deren relative Expression nach stabiler ektopischer Expression von miR-K12-1-12 in BJAB Zellen im Vergleich zu pcDNA-GFP (A, technische Replikate) oder pcDNA-IRESGFP (B, n=1) am Stärksten verringert wurden. (C) Darstellung der Gene, welche in allen durchgeführten Microarray Analysen in ihrer Expression verringert waren. Die Gene sind in Abhängigkeit ihres fold-change aufsteigend sortiert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Eine vollständige Liste der potentiellen miR-K12-1-12 Zieltranskripte kann im Kapitel Anlagen eingesehen werden.

In Abbildung 40 sind die Ergebnisse der DNA-Microarray Analysen dargestellt, welche hinsichtlich des technischen Replikats von pMIR-KSHV und pcDNA3-GFP insgesamt eine sehr gute Übereinstimmung aufzeigten (siehe Abbildung 40 A). In den gezeigten Diagrammen sind 40 Gene abgebildet, deren Transkriptmenge durch eine stabile ektopische Expression der KSHV-spezifischen miRNAs im Vergleich zu pcDNA3-GFP bzw. pcDNA3-IRESGFP Kontrollzellen am Stärksten verringert wurde (siehe Abbildung 40 A und B). Erstaunlicherweise zeigte sich in der Schnittmenge der durchgeführten Microarrays, dass überwiegend solche Gene herunterreguliert waren, welche von Zellen im Rahmen der Immunantwort auf virale Infektionen induziert werden (siehe Abbildung 40 C). Mit einer 3,4-fachen Reduktion der Expression war IFI44L (interferon-induced protein 44-like) am Stärksten reguliert. Beim zweiten am höchsten herunterregulierten Gen (2,7-fach) handelte es sich um IFI27 (interferon alpha-inducible protein 27). Das Gen mit der dritthöchsten verringerten Expression (2,3-fach) war IFI44 (interferon-induced protein 44). Weitere in allen durchgeführten DNA-Microarray Analysen nach ektopischer Expression von KSHV-kodierten miRNAs herunterregulierten Gene waren: IRF7 (interferon regulatory factor 7), MX1 (interferon-inducible protein p78), KLHL21 (kelch-like 21), OAS3 (2'-5'-oligoadenylate synthetase 3), MYBPH (myosin binding protein H), STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1), LGP2 (likely ortholog of mouse D11lgp2), TDRD7 (tudor domain containing 7), NAPS2 (napsin B aspartic peptidase pseudogene), SSFA2 (sperm specific antigen 2), TPD52 (tumor protein D52) sowie MET (met proto-oncogene, hepatocyte growth factor receptor). Auffällig an den hier präsentierten

Microarraydaten war die deutliche überrepräsentierte Anzahl an Genen, welche durch Interferone in ihrer Expression reguliert werden und von denen einige im Folgenden näher beleuchtet werden. Die Interferone werden als früheste Abwehrmaßnahme bei einer viralen Infektion von infizierten Zellen synthetisiert und sezerniert. Die Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren löst in der Zelle eine Signalkaskade aus, die zum Aufbau eines antiviralen Status, zur Hemmung der Zellteilung und zur Freisetzung von weiteren Cytokinen führt. Mit an erster Stelle der Kaskade steht die Aktivierung des JAK-STAT Signalwegs, in dessen Verlauf die STAT-Proteine modifiziert werden und nach Transport in den Zellkern die Expression von Interferon-stimulierten Genen (ISG) regulieren. Dazu gehören unter anderem die identifizierten Gene IFI44, IFI27, IRF7, OAS3 und MX1. Das OAS3 Gen kodiert für eine 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase, dessen wichtige Funktion der Abbau sowohl von zellulären als auch von viralen mRNA-Spezies darstellt und mit einer Hemmung der Proteinsynthese einhergeht. Das MX1 kodiert für ein Protein mit GTPase-Aktivität, welches nach der Aktivierung durch Interferone in der Lage ist die Transkription und Translation viraler Proteine zu inhibieren. Das MET Gen enthält die Informationen für einen transmembranen Tyrosinkinase-Rezeptor namens c-Met, welcher in vielen Geweben epithelialer Herkunft exprimiert wird. Die Fehlregulation c-Met-abhängiger Prozesse kann zur Transformation von Zellen und zur Metastasierung führen, weswegen es als Proto-Onkogen klassifiziert wurde.

3.7.3 Computergestützte Analyse einer potentiellen miRNA Bindung an die putativen Zieltranskripte

MiRNAs üben ihre Wirkung durch die Bindung an partiell komplementäre Bereiche ihrer Ziel-mRNA aus. Nach den derzeitigen experimentell bestätigten Befunden liegen die Zielsequenzen von miRNAs überwiegend innerhalb der 3'-UTR von mRNAs (Bartel et al., 2009). Es sind jedoch auch einzelne Ausnahmen bekannt, bei denen die miRNA mit dem ORF oder der 5'-UTR interagiert (Lytle et al., 2007; Kloosterman et al., 2004). Für eine negative Regulation ist die sogenannte seed-Sequenz am 5'-Ende der miRNA

notwendig, wobei die Effizienz durch eine kooperative Wirkung mehrerer Zielsequenzen verstärkt werden kann (Lewis et al., 2003; Brennecke et al., 2005). Um zu überprüfen, ob die KSHV-kodierten miRNAs in der Lage sind an die anhand von DNA-Microarray Analysen identifizierten Zieltranskripte zu binden, wurde eine bioinformatische Vorhersage durch Algorithmen durchgeführt. Zum Einsatz kam ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes Programm namens GenomeBrowser, welches unter anderem nach seed-Sequenz Interaktionen der entsprechenden miRNA mit ihrer Ziel-mRNA sucht. Die Abbildung 41 zeigt die Ergebnisse des Vorhersage-Algorithmus für einige der potentiellen Zieltranskripte.

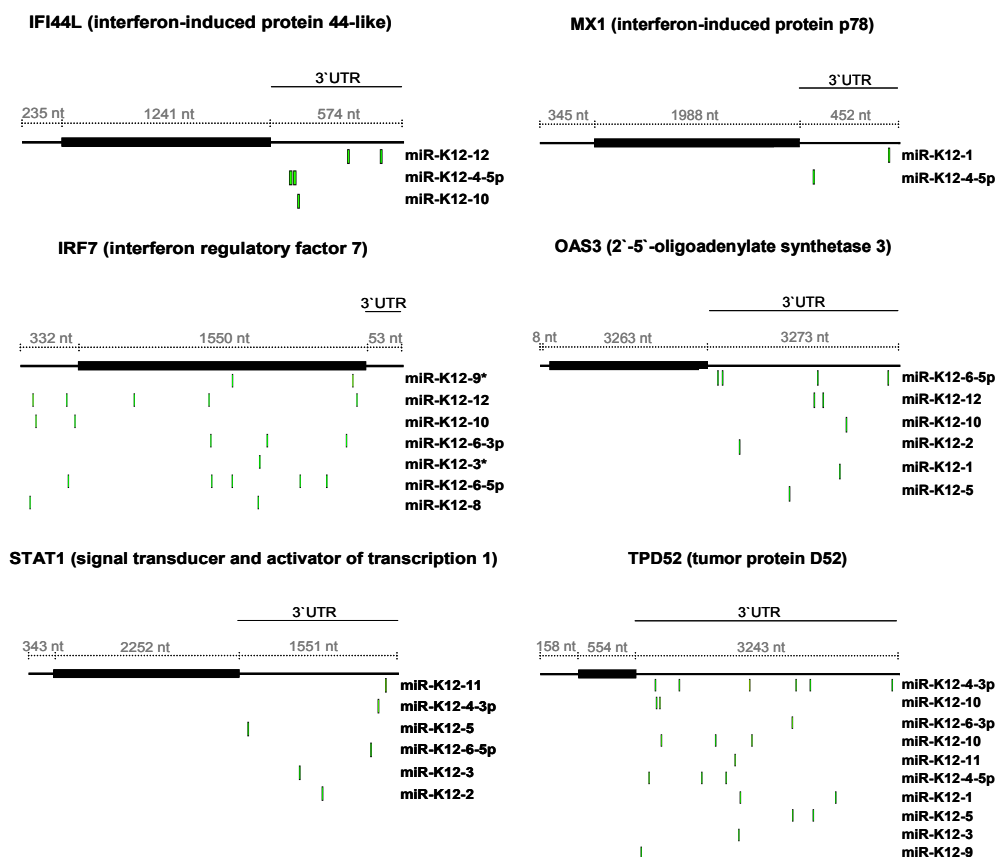


Abbildung 41: MiRNA-Zielgen-Vorhersage mit dem Programm GenomeBrowser. Die 3'-UTRs der anhand von DNA-Microarray Analysen identifizierten Zieltranskripte (siehe Abbildung 34 C) wurden nach Interaktionen mit den seed-Sequenzen aller KSHV-kodierten miRNAs überprüft. Für eine Auswahl von Genen sind die jeweiligen Transkripte mit der Länge ihrer 5'-UTR, ORF (schwarze Balken) und 3'-UTR schematisch dargestellt. Eine seed-Interaktion der entsprechenden virusspezifischen miRNAs (grüne Balken) mit der 3'-UTR ihrer potentiellen Zielgene sowie ihre Lage innerhalb dieser ist vereinfacht gezeigt. Für das IRF7 ist die Interaktion für die 5'-UTR und den ORF angegeben, da keine Bindung der miRNAs in der 3'-UTR dieses Transkripts vorhergesagt werden konnte.

Wie aus Abbildung 41 hervorgeht, konnte für die gezeigten Zieltranskripte, mit Ausnahme von IRF7, eine seed-Interaktion der virusspezifischen miRNAs mit der 3'-UTR der entsprechenden mRNAs vorhergesagt werden. Für die nach ektopischer Überexpression aller KSHV-kodierter miRNAs am stärksten herunterregulierte IFI44L mRNA (siehe Abbildung 40 C) ergaben die miRNA-Zielgen Analysen eine mögliche kooperative seed-Bindung der miR-K12-12, -4 und -10 in der 3'-UTR. Für die MX1 mRNA konnte die Bindung von miR-K12-1 und miR-K12-4 vorhergesagt werden. Im Vergleich zu den weiteren dargestellten Transkripten war die 3'-UTR dieser mRNAs relativ kurz. Sowohl für die OAS3 und STAT1 mRNA als auch für die TPD52 mRNA konnten aufgrund ihrer relativ langen 3'-UTR die kooperative Bindung von mehreren virusspezifischen miRNAs festgestellt werden. Bis auf die IRF7 mRNA konnten für alle mittels Microarray Analysen identifizierte Transkripte eine Bindung der miR-K12-1-12 innerhalb der 3'-UTR vorhergesagt werden. Die IRF7 mRNA zeigte keine Bindung von miRNAs in diesem Bereich, während die Analyse der 5'-UTR sowie des ORF dieses Transkripts eine seed-Interaktion von zahlreichen miRNAs ergab.

3.7.4 Proteomanalyse von BJAB Zellen mit einer stabilen Expression KSHV-kodierter miRNAs

Die vornehmliche Wirkungsweise von miRNAs nach Bindung an komplementäre Bereiche ihrer Ziel-mRNA besteht in der translationalen Inhibierung. In Analogie zu den Proteomanalysen nach Suppression von Drosha (siehe Kapitel 3.6), wurde die Auswirkung einer stabilen ektopischen Expression der KSHV-kodierten miRNAs auf die Proteinexpression in BJAB Zellen mittels 2D-Gelelektrophorese untersucht. Hierzu erfolgte die Auftrennung von 1,5 mg Gesamtprotein aus pMIR-KSHV und pcDNA3-GFP exprimierenden BJAB Zellen in präparativen Gelen, welche zur Visualisierung mit Coomassie-Blau angefärbt wurden. Über einen pH-Bereich von 4-7 konnte eine deutliche Abnahme der Intensität von vier detektierten Proteinspots und eine Zunahme der Intensität von zwei Proteinspots in pMIR-KSHV exprimierenden BJAB Zellen im Vergleich zu pcDNA3-GFP Kontrollzellen beobachtet werden (siehe

Abbildung 42). Die Proteinspots wurden aus dem präparativen Gel ausgestochen und in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Friedrich Buck (UKE Hamburg) massenspektrometrisch untersucht. Wie sich zeigte war eine eindeutige Zuordnung aller analysierten Peptide möglich. Bei den Proteinen, welche eine Abnahme der Spotintensität im Vergleich zu Kontrollzellen zeigten, handelte es sich um: TPI1 (Triosephosphatase Isomerase), ECH1 (Delta-Delta-dienoyl-CoA Isomerase), PCBP1 (Poly-rC-binde Protein 1), TPD52 (tumor protein D52) sowie NCL (Nukleolin) auf die im Folgenden genauer eingegangen wird. Das Enzym Triosephosphat-Isomerase ist ein Dimer und katalysiert die intramolekulare Umstrukturierung von Dihydroxy-acetonphosphat (DHAP) und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) in den Stoffwechselwegen der Glykolyse. Mutationen im entsprechendem Gen sind Auslöser einer Triosephosphat-Isomerase Defizienz, welche zu einer autosomal rezessiven Stoffwechselkrankung führen. Das Gen ECH1 kodiert für ein Mitglied der Isomerase/ Hydratase Proteinfamilie und ist in Peroxisomen lokalisiert. Das Poly(rC)-binde Protein ist in der Lage an RNA zu binden und stellt zudem einen post-transkriptionellen Regulator dar (Übersicht in Choi et al., 2009). Das Tumor Protein D52 ist ein Mitglied einer hochkonservierten Proteinfamilie von kleinen hydrophilen Polypeptiden, welches initial in humanen Brust-, Lungen- und Prostata-Karzinomen mit erhöhter Expression identifiziert werden konnte (Balleine et al., 2000; Pollack et al., 2002; Rubin et al., 2004). An dieser Stelle ist zu bemerken, dass das Tumor Protein D52 sowohl in den hier präsentierten Proteinexpressionsanalysen als auch in den Microarray Analysen in seiner Expression reduziert nachgewiesen werden konnte (vergleiche Abbildung 34 C). Bei Nucleolin handelt es sich um ein multifunktionales Protein, welches in der Lage ist an verschiedene Proteine, RNA- sowie DNA-Sequenzen zu binden und dadurch an der Regulation von zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt ist. So fördert es die Zellproliferation und führt als Folge einer deregulierten Überexpression zu einer Zelltransformation. Darüber hinaus scheint Nucleolin eine Rolle im PLAU und uPAR System zu spielen (Dumler et al., 1999).

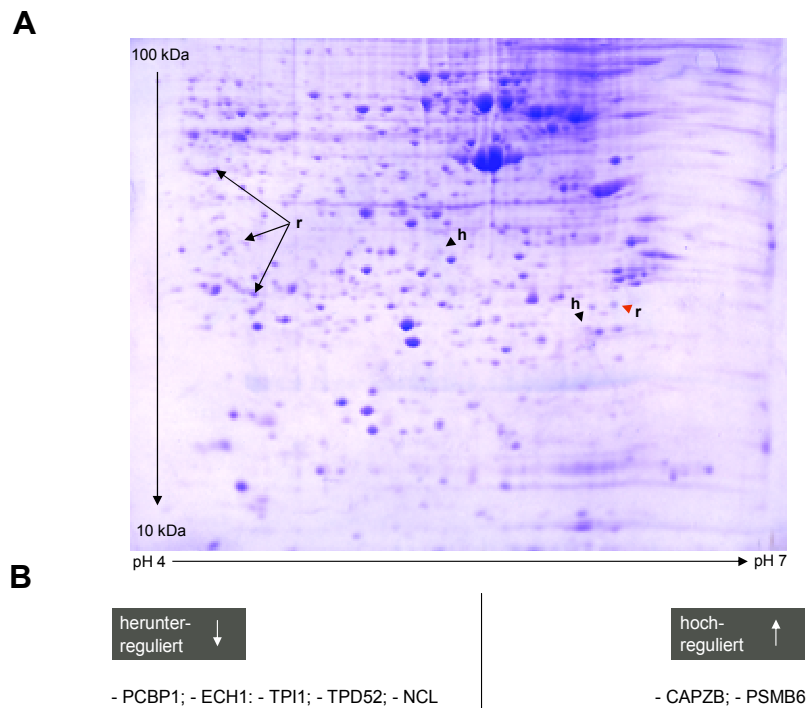


Abbildung 42: Proteomanalyse von BJAB Zellen mit stabiler Expression aller KSHV-kodierten miRNAs. (A) BJAB Zellen, welche alle KSHV-kodierten miRNAs exprimieren, wurden mittels 2D-Gelelektrophorese auf eine differentielle Proteinexpression analysiert. Proteine, die in ihrer Expression im Vergleich zu pcDNA3-GFP exprimierenden BJAB Zellen sowohl erhöht (h) als auch erniedrigt (r) waren sind durch Pfeile angegeben. Der rote Pfeil zeigt den Proteinspot des TPD52 Proteins an. Die isoelektrische Fokussierung der Proteine erfolgte im pH-Bereich 4-7, wobei das Molekulargewicht dieser von 10 bis 100 kDa reichte. Das Ergebnis der 2D-Gelelektrophorese nach Coomassie-Blau Färbung ist repräsentativ dargestellt. (B) Liste aller identifizierten Proteine, welche im Vergleich zu pcDNA3-GFP exprimierenden BJAB Kontrollzellen differentiell reguliert waren. Das Nucleolin wurde in einer weiteren Proteomanalyse identifiziert (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass anhand einer stabilen ektopischen Expression der KSHV-kodierten miRNAs in BJAB Zellen potentielle Zielproteine mittels 2D-Gelelektrophorese identifiziert werden konnten. Bis auf ECH1 zeigen diese auch eine Übereinstimmung mit dem Vorhersage-Algorithmus. Das Tumor Protein D52 konnte zudem zuvor in den Microarray Analysen auf Transkriptebene als herunterreguliert identifiziert werden und soll in weiterführenden Analysen genauer untersucht werden. Insgesamt war die Anzahl der regulierten Proteine sehr klein, da anzunehmen ist, dass die KSHV-kodierten miRNAs auf eine größere Anzahl von Proteinen Einfluss haben. Um dies zu überprüfen wird derzeit mit der SILAC (stable isotope in-gel

electrophoresis) Methode, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hartmut Schlüter (UKE Hamburg), eine potentiell sensitivere Technik angewendet.

4 Diskussion

Mit der Entdeckung von viralen miRNAs im Genom des zu den γ -Herpesviren gehörenden Epstein-Barr-Virus (EBV) wurde die Grundlage für ein neues Forschungsfeld in der Virologie geschaffen (Pfeffer et al., 2004). Im Folgenden konnten anhand von miRNA Klonierungsstrategien sowie bioinformatischen Analysen weitere miRNAs in den Genomen verschiedener Viren identifiziert werden. Wie sich zeigt, ist die überwiegende Mehrheit der Herpesviren in der Lage für miRNAs zu kodieren. Unsere und weitere Arbeitsgruppen konnten hierbei 12 KSHV-kodierte miRNAs identifizieren, welche während der latenten Infektionsform von allen KSHV-infizierten Zellen exprimiert werden.

Wie sich zu Beginn dieser Arbeit bereits abzeichnete schien die molekulare Pathogenese vieler humaner Erkrankungen ursächlich mit miRNAs verknüpft zu sein. Das Wissen um die Rolle der KSHV-kodierten miRNAs im viralen Lebenszyklus war zu diesem Zeitpunkt allerdings begrenzt. Ihre Assoziation mit der latenten Infektionsform führt zu der Hypothese, dass die virusspezifischen miRNAs nicht nur in der Aufrechterhaltung der Latenz sondern auch bei der Entstehung der mit KSHV-verbundenen Erkrankungen beteiligt sein könnten. Ein denkbarer Wirkmechanismus der KSHV-kodierten miRNAs könnte eine negative Regulation der viralen lytischen Gene sowie eine Modulation der zellulären Genexpression darstellen.

Das KSHV ist ein humanes Pathogen, welches insbesondere in immunsupprimierten Individuen von Bedeutung ist. Es ist das ursächliche Agens des Kaposi Sarkoms (KS) sowie des primären Effusionslymphoms (PEL). In der hier präsentierten Arbeit wurden zwei Aspekte behandelt. Zum einen wurde die Rolle der KSHV-kodierten miRNAs in der Aufrechterhaltung der latenten Infektionsform durch die Analyse phänotypischer Veränderungen der latent infizierten PEL-Zelllinien BCBL-1 und AP3 nach Suppression von Drosha und Dicer untersucht. Zum anderen erfolgten Versuche zur Identifizierung zellulärer Zieltranskripte KSHV-kodierter miRNAs mit dem Ziel, die Bedeutung dieser kleinen RNAs in der Biologie von KSHV aufzuklären und besser verstehen zu können.

4.1 Spezifische Suppression der RNase III Enzyme Dicer und Drosha durch shRNAs

Sowohl Drosha als auch Dicer sind Schlüsselenzyme bei der Biogenese von miRNAs zu reifen, wirksamen Molekülen. Drosha ist ein nukleäres RNase III Enzym und initiiert, als Bestandteil des Mikroprozessors, den Prozess der miRNA Reifung, in dem es die pre-miRNAs aus ihren Vorläufertranskripten schneidet (Lee et al., 2003; Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004; Landthaler et al., 2004; Zeng et al., 2005). Dicer, ebenfalls ein RNase III Enzym, agiert im Zytoplasma und wird für die Herstellung von reifen miRNAs benötigt (Bernstein et al., 2001; Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001). Initial wurde Dicer wegen seiner Rolle bei der Erzeugung von siRNAs (short interfering RNA) identifiziert (Bernstein et al., 2001). Eine genaue Kontrolle der miRNA-Biogenese hat dabei eine fundamentale Bedeutung für die Aufrechterhaltung normaler Zellfunktionen (Bernstein et al., 2003; Fukagawa et al., 2004; Cobb et al., 2005; Kanellopoulou et al., 2005; Murchison et al., 2005; Harfe et al., 2005; Muljo et al., 2005; Wang et al., 2007; Koralov et al., 2008; Sand et al., 2010).

Um die Bedeutung der KSHV-kodierten miRNAs für die Aufrechterhaltung der latenten Infektionsform zu untersuchen, wurden die beiden Proteine Drosha und Dicer durch den Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) in latent infizierten PEL-Zelllinien supprimiert und damit der miRNA-Biogeneseweg gestört (Fire et al., 1998). Diese Strategie wird weithin angewandt, um miRNA-regulierte Zielgene zu identifizieren oder die hervorgerufenen Veränderungen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu untersuchen (Rehwinkel et al., 2006; Kumar et al., 2007; Kuehbacher et al., 2007; Tang et al., 2007). In der Regel kommen bei der Anwendung der RNAi entweder synthetische siRNAs oder shRNAs (short hairpin RNA), welche von Expressionsvektoren endogen transkribiert werden zum Einsatz (Elbashir et al., 2001; Brummelkamp et al., 2002). Die Expression von shRNAs erfordert hierbei spezielle Promotoren (RNA-Polymerase III U6 Promotor oder H1 Promotor), unter deren Einfluss eine post-transkriptionelle Modifikation wie Cap-Struktur und poly(A)-Ende unterbleibt (Brummelkamp et al., 2002). Ein entscheidender Vorteil von RNA Polymerase III Promotoren liegt darin, dass die shRNA konstitutiv und ubiquitär exprimiert werden kann

(Brummelkamp et al., 2002). Die in dieser Arbeit verwendeten shRNA tragenden Expressionsvektoren gegen Drosha (shDrosha) und Dicer (shDicer) wurden kommerziell erworben und durch einen lentiviralen Gentransfer sowohl in latent infizierte BCBL-1 Zellen als auch in latent infizierte AP3 Zellen eingebracht. Die Wirksamkeit der U6 Promotor getriebenen shRNA Expression konnte bereits eindeutig in der Literatur gezeigt werden (Ventura et al., 2004; Kumar et al., 2007). Zum Nachweis der erfolgreichen Suppression von Drosha und Dicer wurde einerseits die Reduktion der mRNA Transkripte der zu supprimierenden Proteine in einer RT-qPCR gezeigt und zum anderen eine deutliche Verminderung der Proteinexpression mittels Immunoblot in BCBL-1 Zellen nachgewiesen (siehe Abbildungen 12, 13 und 21). Sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene konnte für Drosha und Dicer eine robuste und vergleichbare Suppression durch die Expression der entsprechenden shRNAs erreicht werden. Darüber hinaus konnte auch in latent infizierten AP3 Zellen, einer weiteren PEL-Zelllinie, eine effiziente und robuste Suppression des miRNA-prozessierenden Enzyms Drosha demonstriert werden (siehe Abbildung 17).

Grundsätzlich ist jedoch anzumerken, dass es bei der Anwendung einer shRNA-vermittelten Suppression durch den Mechanismus der RNAi erforderlich ist unspezifische Effekte auszuschließen, welche als sogenannte off-target Effekte bezeichnet werden. Diese können durch eine zufällige Komplementarität zwischen Teilbereichen der shRNA, insbesondere innerhalb der seed-Region, sowie der 3'-UTR unerwünschter Ziel-mRNAs ausgelöst werden. In diesem Fall kann die shRNA gegebenenfalls wie eine miRNA wirken und somit zu einer Inhibition der mRNA-Translation führen (Birmingham et al., 2006). Als unspezifischer Effekt ist darüber hinaus eine Aktivierung des Interferonsystems möglich, welche in Abhängigkeit der shRNA-Sequenz, der Sequenzlänge und des Zelltyps auftreten kann (Bridge et al., 2003; Sledz et al., 2003). So führte die starke Expression von shRNAs in einigen Studien zu einer Induktion der Interferon-induzierten Gene 2'-5'-Oligoadenylsynthetase (OAS-1) und IFN- β (Sledz et al., 2003; Stewart et al., 2008). Die Aktivierung von OAS-1 wirkt stimulierend auf die Ribonuklease L (RNase L), was zu einer unspezifischen Inhibition der Proteinbiosynthese und damit einhergehend zur

Induktion von apoptotischen Prozessen führen kann (Sledz et al., 2003). Um einen sequenz-spezifischen Effekt der verwendeten shRNAs auf die mRNAs der Zielgene zu detektieren, wurde aus diesem Grunde in initialen Experimenten eine sogenannte scrambled shRNA mitgeführt, welche keine Sequenzhomologien im humanen oder im viralen Genom aufzeigte. Diese hatte nach lentiviraler Infektion von BCBL-1 Zellen keinen Einfluss auf die Transkriptmenge von Drosha sowie Dicer und darüber hinaus keine Auswirkung auf die Induktion der lytischen KSHV Reaktivierung (Daten nicht gezeigt). In allen darauffolgenden Experimenten wurde daher die Entscheidung getroffen einen Expressionsvektor mit gleichem Vektorhintergrund zu den shDrosha und shDicer Expressionsvektoren einzusetzen. Dieser kodierte anstelle einer shRNA für das Markergen GFP, so dass die Infektions-Effizienz von Zielzellen in jedem Experiment überprüft werden konnte. Die durchgeführten Kontrollanalysen zeigen, dass die nachgewiesene Reduktion der Drosha und Dicer Expression sowie die in dieser Arbeit beobachteten Phänotypen nicht auf unspezifischen shRNA-vermittelten Effekten beruhen. In naher Zukunft soll die Verwendung von weiteren shRNAs, welche gegen andere Ziel-Sequenzen der Drosha und Dicer Transkripte gerichtet sein sollen, die Spezifität der hier beobachteten Effekte bestätigen.

4.2 Induktion der lytischen KSHV Reaktivierung in BCBL-1 und AP3 Zellen nach Suppression von Drosha

Da ein zentraler Aspekt dieser Arbeit darin bestand, die Rolle der KSHV-kodierten miRNAs für die Aufrechterhaltung der latenten Infektion zu untersuchen, wurde die Auswirkung der Inhibition der miRNA-prozessierenden Enzyme Drosha und Dicer auf den Prozess der miRNA-Biogenese analysiert. Wie sich zeigte, führte die sequenzspezifische Suppression von Drosha und Dicer zu einer deutlichen Reduktion der reifen miRNA Expression in BCBL-1 Zellen, wie anhand von Northern Blot Analysen von KSHV-kodierten miRNAs veranschaulicht (siehe Abbildung 17). Bei einem Vergleich der Expressionsniveaus der untersuchten miRNAs konnte zwischen shDrosha und shDicer

behandelten Zellen eine annähernd gleiche Verringerung der reifen miRNA Expression festgestellt werden (siehe Abbildung 17).

Nachdem eine spezifische und effiziente Suppression der miRNA-prozessierenden Enzyme Drosha und Dicer gezeigt werden konnte, welche mit einer starken Beeinträchtigung der viralen miRNA Expression einherging, interessierte uns die Frage inwieweit dies Auswirkungen auf die Induktion der lytischen Reaktivierung in PEL-Zelllinien hat. Eine Induktion der lytischen KSHV Reaktivierung kann in latent infizierten Zellen durch eine Reihe von chemischen sowie genetischen Stimuli ausgelöst werden (Yu et al., 1999; Miller et al., 1997). Die Initiation ist dabei von der Expression eines einzigen multifunktionalen Proteins, welches als RTA/ORF50 bezeichnet wird, abhängig. Eine ektopische Expression von RTA ist in der Lage die komplette virale lytische Kaskade einzuleiten, welche zur Produktion und Freisetzung von viralen Partikeln führt, während eine mutationelle Inaktivierung von RTA eine Reaktivierung von KSHV verhindert (Lukac et al., 1998, 1999; Sun et al., 1998; Gradoville et al., 2000; Xu et al., 2005). Die Expression von RTA stellt somit ein notwendiges und ausreichendes Ereignis dar, um die Reaktivierung von KSHV aus der Latenz einzuleiten.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transduktions-Experimente führten zur Ausbildung eines interessanten Phänotyps. Unter Verwendung unterschiedlicher Methoden konnte nach shRNA-vermittelter Suppression von Drosha eine Induktion der ORF50 und ORF59 Expression in BCBL-1 Zellen demonstriert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass RTA durch sequenzspezifische Bindung innerhalb von lytischen viralen Promotoren sowie im Zusammenspiel mit anderen zellulären Faktoren aktivierend auf die Expression von viralen Genen, wie unter anderem ORF59, wirken kann (Sun et al., 1998; Chan et al., 1998; Lin et al., 1998; Deng et al., 2000, 2002; Gwack et al., 2002; Liu et al., 2008; Chen et al., 2009). Die Expression von ORF59 ist essentiell für die Replikation des viralen Genoms während der lytischen Reaktivierung (Chan et al., 1998; Chan und Chandran, 2000; Chen et al., 2004, 2005). Wie sich anhand von RT-qPCR Analysen zeigte, war die Induktions-Effizienz der lytischen KSHV Reaktivierung nach Herabregulation von Drosha mit der nach Natriumbutyrat Behandlung von BCBL-1 Zellen vergleichbar (siehe Abbildung

14). Bei Natriumbutyrat handelt es sich um ein pleiotrop wirkendes Agens, welches in erster Linie zu einer Hyperacetylierung der Histone H3 und H4 durch die Inhibition der HDAC (Histon-Deacetylase)-Aktivität führt (Luka et al., 1979; Lu et al., 2003). Die sich daraus ergebende Chromatinumordnung hat eine modulierende Wirkung auf die globale Genexpression einer Zelle und resultiert in einer transkriptionellen Aktivierung von ORF50 (Miller et al., 1996; Lu et al., 2003). In der Zellkultur wird Natriumbutyrat weithin angewandt, um eine effektive KSHV Reaktivierung in PEL-Zelllinien zu initiieren und infektiöse Viruspartikel zu generieren (Miller et al., 1997). Erstaunlich war in diesem Zusammenhang zudem, dass die spezifische Herabregulation von Dicer keine Auswirkung auf die lytische KSHV Reaktivierung zeigte (siehe Abbildung 13). Untermuert wurde diese Beobachtung dadurch, dass nach Inkubation von endothelialen SLK-Zellen mit Überständen aus shDicer behandelten BCBL-1 Zellen keine LANA-1 positiven Zellen nachzuweisen waren (siehe Abbildung 16). Da das LANA-1 Protein in allen KSHV-infizierten Zellen exprimiert wird, kann es auf Grundlage dessen als universeller Marker für eine Infektion mit KSHV herangezogen werden (Rainbow et al., 1999; Dupin et al., 1999). Im Gegensatz dazu, führte die Suppression von Drosha zu einer effizienten Induktion der kompletten lytischen viralen Kaskade, welche in der Produktion und Freisetzung von infektiösen Partikeln resultierte (siehe Abbildung 16). Die in latent infizierten BCBL-1 Zellen gemachten Befunde nach shRNA-vermittelter Suppression von Drosha konnten hinsichtlich der erhöhten Expression von ORF50 und ORF59 auf eine weitere PEL-Zelllinie ausgeweitet werden (siehe Abbildung 17). Somit sind die hier beobachteten Effekte nicht auf eine Besonderheit der BCBL-1 Zellen zurückzuführen, sondern es scheint sich vielmehr um einen für PEL-Zellen allgemein gültigen Mechanismus zu handeln.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass es sich bei der Induktion der lytischen KSHV Reaktivierung nach Suppression von Drosha um einen miRNA-unabhängigen Mechanismus handeln könnte. In Einklang mit der Feststellung, dass für die meisten Interaktionen miRNAs sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene vorzugsweise als Feinregulatoren, sogenannte Rheostats, agieren (Sevignani et al., 2006; Vinther et al., 2006; Baek et al., 2008; Ying und

Lin, 2010; Bartel, 2009), ist auch die Arbeit von Bellare und Ganem zu sehen (Bellare und Ganem, 2009). Sie konnten zeigen, dass die Behandlung von latent infizierten Zellen mit spezifischen Antagonisten (Antagomirs) der virus-spezifischen miR-K12-9* zu einer Induktion des ORF50 Transkripts führte (Krüzfeldt et al., 2005; Bellare und Ganem, 2009). In ihren Experimenten kamen primäre Fibroblasten zum Einsatz, die ein rekombinantes KSHV Genom trugen, in welchem die Expression eines Reportergens unter der Kontrolle eines ORF50-abhängigen lytischen Promotors steht (Vieira und O'Hearn, 2004). Die induzierende Wirkung auf die ORF50 mRNA (~3-fach) war im Vergleich zur Induktion nach Suppression von Drosha (14-fach) in der hier präsentierten Arbeit eher gering. Zudem zeigte die Northern Blot Analyse nach Herabregulation von Drosha und Dicer eine vergleichbare Reduktion der miR-K12-9* Expression in BCBL-1 Zellen (siehe Abbildung 18). In Bezug auf die Produktion von infektiösen Viruspartikeln nach Inhibition der miR-K12-9* machten die Autoren leider keine Aussagen.

In einer weiteren Studie führte die Deletion von 10 der 12 durch KSHV-kodierten miRNAs (miR-K12-1-9, einschließlich miR-K12-11) in einem bakteriellen künstlichen KSHV-Chromosom ebenfalls nur zu einer mäßigen Induktion der ORF50 Transkriptmenge (2- bis 4-fach) (Lu et al.; 2010). Auch hier machten die Autoren keine Aussagen bezüglich der Induktion der kompletten lytischen KSHV Kaskade. Möglicherweise ist eine 2-4-fache Induktion der ORF50 mRNA nicht ausreichend, um eine effiziente lytische KSHV Reaktivierung aus der Latenz einzuleiten.

Die Anwendung von bioinformatischen Algorithmen führte in einer Studie zu der Hypothese, dass die ORF50 Expression durch die virusspezifische miR-K12-6-3p negativ reguliert werden könnte (Murphy et al., 2008). Experimentell ist es nicht gelungen diese Vermutung zu bestätigen (Bellare und Ganem, 2009; Lei et al., 2010). Interessanterweise konnte in einer Studie durch die Anwendung von 3'UTR Reporter Analysen kein Effekt der KSHV-kodierten miRNAs auf das ORF50 Transkript detektiert werden (Lei et al., 2010). In diesem Bezug ist zu bemerken, dass durch die Transfektion von spezifischen Antagomirs der KSHV-kodierten miRNAs in immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen kein induzierender Effekt auf die ORF50 Expression in BCBL-1 Zellen nachgewiesen

werden konnte (Daten nicht gezeigt). Auch unter Nutzung des rekombinanten KSHV Genoms in Vero-Zellen (Nierenzellen von Grünen Meerkatzen), welches in den Studien von Bellare und Ganem Verwendung fand, konnte unter Nutzung von Antagomirs keine erhöhte Expression von ORF50 beobachtet werden (Vieira und O`Hearn, 2004; Bellare und Ganem, 2009) (Daten nicht gezeigt).

Wie sieht der aktuelle Wissensstand hinsichtlich der Modulation des latent-lytischen Schalters durch virale miRNAs für andere Herpesviren aus? Obwohl beinahe alle bisher untersuchten Herpesviren für miRNAs kodieren und die Identifizierung der ersten viralen miRNA im Genom des Epstein-Barr-Virus (EBV) mittlerweile sechs Jahre zurückliegt (Pfeffer et al., 2004) ist wenig darüber bekannt. Erst kürzlich durchgeführte Untersuchungen haben zu der Identifizierung von viralen miRNAs im Herpes-simplex-Virus (HSV) und im humanen Cytomegalievirus (HCMV) geführt, die in der Lage sind sehr frühe regulatorische Proteine zu regulieren (Umbach et al., 2008; Murphy et al., 2008; Grey et al., 2007). Aufgrund von fehlenden Zellkultur-basierten Modellen für diese Viren, um die latente Infektionsform zu studieren, ist es bis heute allerdings noch nicht möglich die funktionelle Konsequenz dieser Interaktionen hinsichtlich der latent-lytischen Entscheidung zu analysieren.

Neben einer direkten Wirkung von miRNAs auf ihre Zieltranskripte dürfen mögliche indirekte Effekte nicht außer Acht gelassen werden. Hierbei sind viele Szenarien möglich in denen die spezifische Herabregulation eines bestimmten Proteins durch eine miRNA zur Regulation eines weiteren Proteins führt, welches somit indirekt durch die miRNA in seiner Expression beeinflusst wäre. Um nur ein Beispiel zu nennen inhibiert die zelluläre miR-155 die p38/MAPK Aktivität, was wiederum zu einer negativen Regulation des IL-1 (Interleukin-1) Transkripts sowie weiterer inflammatorischer Zytokine führt (Ceppi et al., 2008). Die Möglichkeit einer indirekten Regulation des latent-lytischen Schalters durch KSHV-kodierte miRNAs wurde aufgrund der vergleichbaren Beeinträchtigung der miRNA Expression nach Suppression von Drosha und Dicer nicht in Erwägung gezogen.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die miRNA-abhängige Modulation der lytischen Reaktivierung in den hier

untersuchten Modellen viraler Latenz nicht der zentrale und bestimmende Faktor des latent-lytischen Schalters zu sein scheint. Des Weiteren lassen die Untersuchungen in einer weiteren PEL-Zelllinie vermuten, dass die präzise Kontrolle des Mikroprozessors von genereller Bedeutung in der Biologie von KSHV sein könnte.

Die Frage, welche weiteren molekularen Mechanismen dem beobachteten Phänotyp zugrunde liegen könnten, führte zu der Vermutung, dass Drosha neben seiner Funktion in der miRNA-Biogenese eine zusätzliche Rolle in zellulären Prozessen spielen könnte. Annähernd zeitgleich mit dieser formulierten Hypothese konnte Han et al. zeigen, dass Drosha in der Lage ist zwei pri-miRNA-ähnliche Haarnadelstrukturen seines Kofaktors DGCR8 zu schneiden und daher direkt an der post-transkriptionellen Regulation dieses Transkriptes beteiligt ist (siehe Kapitel 1.4.2) (Han et al., 2009). Dieser Befund unterstützte unsere Vermutung eines miRNA-unabhängigen Mechanismus in der Induktion der lytischen KSHV Reaktivierung, so dass mittels eigenständig durchgeführten DNA-Microarray Analysen weitere potenzielle Zieltranskripte von Drosha identifiziert werden sollten, welche an der Aufrechterhaltung der Balance zwischen der latenten und lytischen Infektionsform beteiligt sein könnten.

Für die Expressionsanalysen von BCBL-1 Zellen nach Suppression von Drosha und Dicer kamen Whole Human Genome Microarrays der neuesten Generation zum Einsatz (siehe Kapitel 2.7) (Kronick, 2004). Bei der vergleichenden Expressionsanalyse wurden für die Berechnung des fold-change nur innerhalb des linearen Bereichs liegende Signale einbezogen und ein aussagekräftiger Schwellenwert für die Hoch- bzw. Herunterregulierten Gene definiert. Anhand der Durchführung einer Gen-Orthologie Analyse konnten die nach Suppression von Drosha hochregulierten Gene immunologisch relevanten Prozessen zugeordnet werden (siehe Abbildung 26).

Die Analyse der mRNA Expressionsprofile zu jeweils zwei unterschiedlichen Zeitpunkten nach shRNA-vermittelter Suppression von Drosha hat dabei zur Identifizierung von sechs hochregulierten Genen in BCBL-1 Zellen geführt: PLAU, CCL3, FAM3C, ITGA6, ANKRA2 und CDKN1A (siehe Abbildung 27 C). Die aufgeführten Gene konnten nach Suppression von Dicer nicht als

differentiell reguliert nachgewiesen werden (siehe Anhang). Obwohl die Reproduzierbarkeit der DNA-Microarray Ergebnisse einzelner Zeitpunkte zufriedenstellend war, war die Anzahl der Gene, welche über alle Zeitpunkte gerechnet positiv reguliert waren, insgesamt gering. Dabei ist hervorzuheben, dass eine signifikante Anzahl der zu späteren Zeitpunkten identifizierten Gene sehr wahrscheinlich keine direkt durch Drosha regulierten Transkripte darstellen, sondern vielmehr durch indirekte, sekundäre Effekte der Drosha Inhibition und/oder frühen lytischen KSHV Reaktivierung in ihrer Expression verändert wurden. Mit Hilfe von weiteren Microarray Analysen könnte die Aussagekraft der Ergebnisse weiter erhöht werden, wobei nochmals angesprochen werden sollte, dass die Suppression von Drosha sowie von Dicer zu einer deutlichen Reduktion der entsprechenden Transkripte führte, was die Relevanz der hier präsentierten Microarraydaten unterstreicht (siehe Abbildung 25). Eine Induktion der Interferonantwort, wie sie als Folge einer unspezifisch wirkenden shRNA auftreten kann, konnte in den Expressionsanalysen nicht beobachtet werden (siehe Anhang). Eine genaue Beschreibung der oben angeführten Gene ist bereits im Kapitel 3.4 erfolgt. PLAU (urokinase plasminogen activator, uPA) und CCL3 (chemokine C-C motif ligand 3) sind nicht nur aufgrund ihrer stark erhöhten Expressionswerte nach Suppression von Drosha sondern auch aufgrund ihrer Assoziation in der Biologie von KSHV interessant.

Das Tumor-assoziierte PLAU-System ist durch die Aktivierung von Plasmin an der Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt (Dano et al., 1985; Jessup et al., 1994). Neben ihrer strukturellen Funktion dient die ECM auch als Reservoir für Zytokine und Wachstumsfaktoren. So wird im Zusammenspiel mit Metalloproteinasen (MMPs) die weitere Invasion von Tumorzellen und der Prozess der Angiogenese durch die Freisetzung von pro-angiogenetischen Faktoren wie beispielsweise EGF (epidermal growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), HGF (hepatocyte growth factor) sowie VEGF (vascular endothelial growth factor) begünstigt (Rundhaug, 2003; Houck et al., 1992; Park et al., 1993; Birkedal-Hansen et al., 1993; Chen, 1996; Whitelock et al., 1996; Ferrara, 2002). Aus der Literatur ist bekannt, dass aktiviertes Plasmin in der Lage ist die unreifen Propeptide VEGF-C und VEGF-D in die reife und

wirksame Form von VEGF zu spalten (McColl et al., 2003). VEGF-C und VEGF-D sind für den Prozess der Lymph-Angiogenese verantwortlich und in KS-Läsionen zusammen mit weiteren exprimierten pro-inflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Chemokinen wie CCL3 ein entscheidender Faktor in der *in vivo* AIDS-KS Pathogenese (Wang et al., 2004; Sivakumar et al., 2008). Bei KS handelt es sich um einen sehr stark vaskularisierten soliden Tumor, in dem neben den latent infizierten Tumorzellen auch eine relativ hohe Anzahl lytisch infizierter Zellen vorhanden ist, welche über parakrine Mechanismen, insbesondere über die Ausschüttung von Cytokinen, zur Angiogenese und Tumorprogression des KS beitragen (Staskus et al., 1997; Dupin et al., 1999; Parravicini et al., 2000; Katano et al., 2000). Obwohl die Expression von PLAU in KS Tumoren noch nicht untersucht wurde, ist aufgrund der verstärkten Neovaskularisierung von signifikanten Expressionsgehalten auszugehen. Die lytische Replikation KSHV-infizierter Zellen in KS könnte daher durchaus mit der Expression von PLAU *in vivo* korrelieren und den Prozess der Vaskularisierung begünstigen.

Zur Verifizierung der nach Suppression von Drosha erhöhten Transkriptmenge von PLAU wurden quantitative sowie semi-quantitative RT-PCR Analysen durchgeführt. In Einklang mit den DNA-Microarraydaten konnte eine Zunahme der PLAU mRNA in BCBL-1 Zellen festgestellt werden, welche nach Herabregulation von Dicer keiner differentiellen Regulation unterlag (siehe Abbildung 28 und 29). In diesen Kotransduktionsstudien zeigte sich mit zunehmender Verdünnung der lentiviralen Überstände eine verringerte Zunahme der PLAU Transkriptmenge. Da die Aktivität von Dicer für die Prozessierung von shRNAs zu funktionellen siRNA-Molekülen essentiell ist (Bernstein et al., 2001) resultierte die gleichzeitige Transduktion von shDrosha und shDicer in einer verringerten Suppressions-Effizienz von Drosha, was wahrscheinlich die verminderte Zunahme des PLAU Transkripts erklärt. Eine Induktion der PLAU mRNA nach Herabregulation von Drosha konnte des Weiteren mittels semi-quantitativer RT-PCR Analysen auch in AP3 Zellen bestätigt werden (siehe Abbildung 29) und darüber hinaus in der EBV-positiven Zelllinie Jijoye beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund könnte auf einen konservierten Mechanismus hindeuten und soll zur Unterstützung

dieser Vermutung in weiteren von PEL-abgeleiteten und EBV-positiven Zellen sowie in nicht-infizierten Zellen untersucht werden.

Die vom Mikroprozessor geschnittenen pri-miRNA-ähnlichen Haarnadelstrukturen seines Interaktionspartners DGCR8 sind in der 5'UTR und in der kodierenden Region dieses Transkripts lokalisiert (Pedersen et al., 2006; Triboulet et al., 2009; Han et al., 2009). Es stellte sich an dieser Stelle die Frage, ob die PLAU und CCL3 Transkripte ebenso in der Lage sind pri-miRNA-ähnliche Sekundärstrukturen auszubilden. Computergestützte Analysen führten zur Vorhersage von zwei möglichen pri-miRNA-ähnlichen Strukturen in der PLAU mRNA sowie von einer möglichen pri-miRNA-ähnlichen Struktur in der CCL3 mRNA (siehe Abbildung 30). Diese Haarnadelstrukturen könnten vom Mikroprozessor geschnitten werden, was die Formulierung der folgenden Hypothese erlaubt:

Die Suppression von Drosha könnte zur Stabilisierung und Akkumulation der PLAU und CCL3 Transkripte führen, welche wiederum zur Induktion der lytischen KSHV Reaktivierung führen könnten. Um dieser Hypothese nachzugehen wurden lentivirale PLAU und CCL3 Expressionsvektoren hergestellt und zur Transduktion von BCBL-1 Zellen verwendet. Da sowohl für PLAU als auch für CCL3 keine Antikörper zur Verfügung standen, wurde an ihrem C-terminalen Ende ein AU1-Epitop angefügt. Die Expression des AU1-Epitop markierten CCL3 Proteins konnte mittels Immunoblot sowie anhand von fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen an der Oberfläche transduzierter BCBL-1 Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 31 C). Obwohl die Transduktions-Effizienz mit dem lentiviralen Überstand zur Expression von PLAU hoch war, konnte das AU1-Epitop markierte PLAU Protein nur in einigen wenigen Zellen im Fluoreszenz-Mikroskop detektiert werden (siehe Abbildung 31 C). Die Frage nach der Ursache dieser geringen Expression konnte nicht klärend beantwortet werden. Möglicherweise war das AU1-Epitop im Kontext des Fusionsproteins maskiert, so dass der Expressionsnachweis in der Immunfluoreszenz nicht möglich war. Unter den denaturierenden Bedingungen im Immunoblot hätte die Expression des AU1-Epitops detektiert werden können, was aufgrund der geringen PLAU Expression jedoch nicht möglich war. Eine erhöhte Transkriptmenge von PLAU konnte mittels RT-qPCR nach

lentiviraler Transfektion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), so dass ein Problem bei der C-terminalen Markierung oder bei der extrazellulären Lokalisation von PLAU nicht ausgeschlossen werden kann.

Eine wichtige Frage dieser Arbeit war nun, ob eine Transfektion von PLAU sowie eine Überexpression von CCL3 in BCBL-1 Zellen zur Induktion der lytischen KSHV Reaktivierung führt und damit den nach Suppression von Drosha auftretenden Phänotyp erklären würde. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden BCBL-1 Zellen mit den lentiviralen Überständen zur Expression von PLAU und CCL3 infiziert und mittels konfokaler Mikroskopie hinsichtlich einer Koexpression mit ORF50 untersucht. Wie sich zeigte, führte weder die Transfektion von PLAU noch die Überexpression von CCL3 zu einer Induktion der ORF50 Expression (siehe Abbildung 32). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt können allerdings keine Aussagen darüber getroffen werden, ob die Transduktion von BCBL-1 Zellen mit den entsprechenden lentiviralen Überständen auch zur Expression von funktionalen PLAU und CCL3 Proteinen geführt hat. Zudem kann nicht beantwortet werden, inwieweit die Hochregulation von PLAU und CCL3 auf transkriptioneller Ebene nach Suppression von Drosha mit einer erhöhten Expression auf Proteinebene korreliert. Hierzu wären spezifische Antikörper notwendig.

Obwohl die Transfektion von PLAU sowie die Überexpression von CCL3 in dieser Arbeit keine Auswirkung auf die Induktion der lytischen KSHV Reaktivierung zeigt, wäre es nachwievor möglich, dass die entsprechenden Transkripte durch Drosha geschnitten werden könnten. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christopher Sullivan (Universität Texas, USA) soll dieser Vermutung nun in *in vitro* Analysen nachgegangen werden.

Fast zeitgleich mit der Fertigstellung dieser Arbeit konnte Chandriani et al. anhand von sogenannten Tiling Microarrays zeigen, dass es während der lytischen KSHV Reaktivierung zu einer ausgedehnten Transkription von RNAs in Antisense (AS)-Orientierung zu bekannten ORF innerhalb des KSHV Genoms kommt (Chandriani et al., 2010). Interessanterweise führten die Transkriptom-Analysen in BCBL-1 Zellen zur Identifizierung einer RNA, welche in AS-Orientierung zur Latenz-assoziierten Region verläuft und ORF71-73 sowie einige virusspezifische miRNAs mit einschließt. Auf Grundlage dieser

Befunde könnte sich ein weiteres Modell der Zusammenhänge entwerfen lassen:

Der Sense- als auch der AS-Strang beinhalten pri-miRNA Haarnadelstrukturen (Lin et al., 2010), welche vom Mikroprozessor erkannt und prozessiert werden. Diese Strukturen können nach Suppression von Drosha nicht mehr geschnitten werden, was eine Akkumulation des AS-Stranges zur Folge hätte, welches zur Induktion der lytischen KSHV Reaktivierung führen könnte.

Eine genomweite Akkumulation von AS-Transkripten während der lytischen Infektion konnte zuvor im Genom des zur Unterfamilie der β -Herpesviren gehörenden HCMV gezeigt werden (Zhang et al., 2007), wobei einzelne AS-Transkripte bereits für EBV und HSV beschrieben werden konnten (Prang et al., 1995, 1999; Segouffin et al., 1996; Bohenzky et al., 1995; Carter et al., 1996). Diese Befunde lassen vermuten, dass die Regulation von herpesviralen Genprodukten wesentlich komplexer sein könnte als bisher angenommen. Die Existenz von AS-miRNAs, welche sich aus AS-Transkripten ableiten, und ihre Rolle in der homöostatischen Genregulation konnte erst kürzlich in *Drosophila* demonstriert werden (Stark et al., 2008; Tyler et al., 2008) und zudem in den Herpesviren MCMV (Maus-Cytomegalievirus), HSV sowie jüngst in KSHV gezeigt werden (Buck et al., 2007; Dölken et al., 2007; Umbach et al., 2008; Lin et al., 2010). Diesbezüglich kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese AS-Transkripte sowohl eine Rolle im Lebenszyklus von KSHV als auch in der Expressionskontrolle viraler Gene spielen und somit zur KSHV Pathogenese beitragen könnten. Nicht minder interessant ist die Tatsache, dass herpesvirale miRNA Sequenzen zwar insgesamt wenig konserviert sind, sich aber eine auffallend hohe Anzahl von ihnen an konservierten Bereichen des viralen Genoms finden lassen (Walz et al., 2010). So könnte eine durch AS-Transkripte vermittelte Regulation der Latenz-assoziierten Transkripte und damit einhergehend eine Inhibition der miRNA Akkumulation sowie eine Funktion der AS-Transkripte während der lytischen Infektion gleichermaßen auf alle Herpesviren zutreffen.

Die Daten dieser Arbeit zeigen erstmalig, dass Drosha über einen miRNA-unabhängigen Mechanismus an der Regulation der lytischen KSHV

Reaktivierung beteiligt sein könnte. Obwohl *in vivo* nur eine Minderheit der Zellen in KS eine lytische Replikation aufzeigen, spielt die Reaktivierung von KSHV und die durch KSHV-induzierte Sekretion von zahlreichen angiogenetischen Faktoren und Chemokinen (siehe oben) wahrscheinlich eine kritische Rolle bei der effizienten Übertragung und Verbreitung des Virus sowie bei der möglichen Pathogenese durch parakrine Mechanismen (Grundhoff und Ganem, 2004; Greene et al., 2007). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von VEGF die Aktivität von PLAU und seinem Rezeptor uPAR auf endothelialen Zellen *in vitro* erhöht und zudem mit der Expression von PLAU und uPAR *in vivo* korreliert (Pepper et al., 1991; Berney et al., 1998; Nakata et al., 1998; Mandriota et al., 1995; Baker et al., 2000). Interessanterweise wird das anhand der vergleichenden Expressionsanalysen identifizierte ITGA6 (integrin alpha 6) auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert, wo es nach der durch PLAU-vermittelten Spaltung an dem Prozess der Tumorzell-Invasion sowie Migration beteiligt ist (Demetriou et al., 2004; Pawar et al., 2007) und des Weiteren die VEGF Translation in Tumorzellen erhöhen kann (Chung et al., 2002).

Eine Induktion von PLAU sowie von angiogenetischen Faktoren und Chemokinen konnte in einigen Studien in *de novo* infizierten Zellen beobachtet werden (Naranatt et al., 2004; Sadagopan et al., 2009). Es könnte hierbei vielversprechend sein die Kinetik der Drosha Expression in endothelialen *de novo* infizierten Zellen zu untersuchen (beispielsweise in HUVEC Zellen) und zu überprüfen, ob der Hochregulation der PLAU und CCL3 sowie der weiteren identifizierten Transkripte in diesen Zellen eine Fehlregulation des Mikroprozessors zugrunde liegt. Weiterführende Untersuchungen sind hierbei vonnöten, um die aufgestellten Vermutungen zu verifizieren, die in naher Zukunft erfolgen sollen. So soll unter anderem eine Herabregulation der Ago Proteine, als Bestandteile des RISC, durchgeführt werden und dadurch die identifizierten Transkripte als direkte Drosha-Ziele bestätigt werden (siehe Kapitel 1.4.1).

In allen Transduktionsexperimenten konnte nach Suppression von Drosha und Dicer die Ausbildung eines apoptotischen Phänotyps beobachtet werden, wie

anhand der Annexin V-Färbung von BCBL-1 Zellen veranschaulicht (siehe Abbildung 20). Die Induktion von apoptotischen Prozessen nach Suppression von Drosha war zu vermuten gewesen, da die virale lytische Reaktivierung mit einer Amplifikation des viralen Genoms sowie mit einer starken Beeinträchtigung der zellulären Überlebensmechanismen einhergeht und schlussendlich zum Tod der infizierten Zelle führt. Um zunächst auszuschließen, dass die Induktion von apoptotischen Prozessen einen Einfluss auf die Initiation der lytischen Reaktivierung in BCBL-1 Zellen haben könnte, wurde die Apoptose in diesen Zellen durch unterschiedliche Stimuli eingeleitet. Weder die Schädigung der DNA nach Gamma-Strahlen Exposition (siehe Abbildung 22) noch die Behandlung mit FasL (CD95L, Daten nicht gezeigt) führte zur Induktion der lytischen KSHV Reaktivierung. In diesem Zusammenhang ist allerdings zu erwähnen, dass die Anwendung der Gamma-Bestrahlung nicht nur in einer Schädigung der zellulären DNA sondern auch in einer Schädigung des viralen Episoms resultiert haben könnte, was die Induktion der lytischen Reaktivierung bei der hohen Strahlendosis von 12 Grey verhindert haben könnte.

Wie sich anhand der Annexin V-Färbung zeigte, war die Apoptoserate der BCBL-1 Zellen nach Herabregulation von Dicer im Vergleich zur Apoptoserate der shDrosha behandelten Zellen stark erhöht. Dies wurde zudem durch eine stärkere Aktivierung von Caspase-3 bestätigt (siehe Abbildung 20 B). In Anbetracht dessen stellte sich die Frage, ob die Suppression von Dicer ebenfalls zu einer Induktion der lytischen Reaktivierung führen könnte, diese aber aufgrund der raschen Apoptoseinduktion nicht nachzuweisen war. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden BCBL-1 Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungen der lentiviralen Überstände zur Suppression von Drosha und Dicer kotransduziert (siehe Abbildung 23). Unter Verwendung der gleichen Konzentration der lentiviralen Überstände wie bei den Kontrolltransduktionen mit pSico konnte eine verringerte Zunahme der ORF50 sowie ORF59 Transkriptmenge nachgewiesen werden. Dies kann damit begründet werden, dass die Aktivität von Dicer für die Herstellung von funktionalen siRNAs notwendig ist (Bernstein et al., 2001), weshalb die gleichzeitige Transduktion eine verringerte Suppression-Effizienz von Drosha

und damit eine verringerte Induktion der lytischen Reaktivierung zur Folge hatte. Mit zunehmender Verdünnung der Überstände konnte eine verringerte Zunahme der ORF50 sowie der ORF59 Transkriptmenge nachgewiesen werden. Die Kotransduktion von shDicer mit dem Kontrollvektor hatte in den Kotransduktionsstudien keinen Einfluss auf die Transkriptmenge von ORF50 und ORF59. Darüber hinaus führte die alleinige Suppression von Dicer mit unterschiedlichen Verdünnungen des lentiviralen Überstands zur Ausbildung eines apoptotischen Phänotyps, jedoch zu keiner Induktion der lytischen Reaktivierung (Daten nicht gezeigt). Demzufolge hat die Suppression von Dicer keine Auswirkung auf die Induktion der lytischen Reaktivierung, könnte allerdings aufgrund der raschen Apoptoseinduktion die Ausdehnung der lytischen Reaktivierung in den Kotransduktionsexperimenten limitiert haben.

Um eine Verbindung zwischen der viralen Reaktivierung und der Suppression von Drosha zu knüpfen, sind neben den Genexpressionsanalysen auch Proteomanalysen durchgeführt worden, da Drosha durch Destabilisierung seines Kofaktors DGCR8 direkt an der post-transkriptionellen Regulation beteiligt ist (siehe Kapitel 1.4.2). Diese führten zur Identifizierung der Proteine 14-3-3 zeta sowie 14-3-3 theta, welche im Vergleich zu mock-infizierten BCBL-1 Zellen eine deutliche Zunahme der Spotintensität aufwiesen. Da das 14-3-3 zeta Protein bereits in EBV-positiven Raji Zellen eine induzierende Wirkung auf BZLF1 zeigte, welches ähnlich zu RTA den Übergang aus der latenten zur lytischen Infektionsform in EBV kontrolliert, wurde das 14-3-3 zeta genauer untersucht (Adamson et al., 2005; Wen et al., 2007; Maas et al., 2006). In Einklang mit den Ergebnissen der 2D-Gelelektrophorese konnte die Induktion der 14-3-3 zeta Expression im Immunoblot bestätigt und zudem mittels semi-quantitativer RT-PCR nachgewiesen werden (siehe Abbildung 35 A und B). Im Gegensatz dazu, hatte die Herabregulation von Dicer keinen induzierenden Effekt auf das 14-3-3 zeta Transkript (siehe Abbildung 35 B). An dieser Stelle ist beizufügen, dass das 14-3-3 zeta, welches vom Gen YWHAZ kodiert wird, nur in einem der nach Suppression von Drosha durchgeführten DNA-Microarrays als differentiell reguliert nachgewiesen werden konnte. Somit kann die erhöhte Expression von 14-3-3 zeta auch indirekten Mechanismen unterliegen. Durch

die Bindung an unterschiedliche Interaktionspartner ist das 14-3-3 zeta an der Modulation von diversen zellulären Prozessen, wie unter anderem an der Tumorprogression, beteiligt (Übersicht in Morrison, 2009). Aus diesem Grund wurde das biologische Netzwerk von 14-3-3 zeta anhand von experimentell belegten Protein-Protein-Interaktionen visualisiert (siehe Abbildung 36).

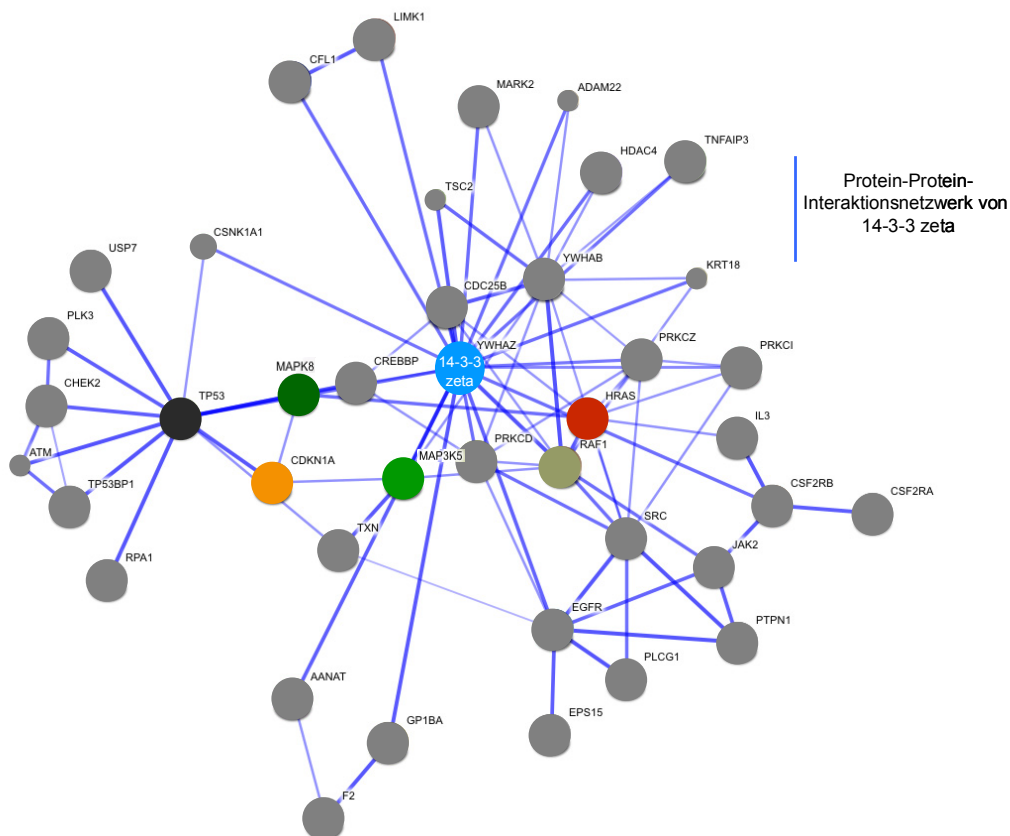


Abbildung 36: Das Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk von 14-3-3 zeta. Gezeigt ist das Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk von 14-3-3 zeta anhand von einigen experimentell belegten Interaktionen (blaue Linien). Interessante direkte oder indirekte Interaktionspartner mit bedeutenden Rollen in der Tumorentstehung sowie möglicherweise in der Biologie von KSHV sind farbig dargestellt. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe der STRING (search tool for the retrieval of interacting genes/proteins) Datenbank (www.string-db.org).

So ist das 14-3-3 zeta unter anderem in der Lage die Aktivität des Tumorsuppressors p53 zu verstärken (Waterman et al., 1998) sowie die Kinase-Aktivität von Raf-1 zu inhibieren (Clark et al., 1997) und kann somit zur Transformation von Zellen beitragen. Darüber hinaus ist es ihm möglich in Signalwege mit Beteiligung der PI3-Kinase und MAP-Kinasen modulierend

einzugreifen (Munday et al., 2000; Danes et al., 2008). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass MAP-Kinase Signalwege eine generelle Rolle in der Regulation des viralen Lebenszyklus von KSHV spielen (Xie et al., 2008). Ferner lassen aktuelle Untersuchungen auf einen supprimierenden Effekt des PI3-Kinase Signalwegs auf die Aktivität von RTA schließen (Peng et al., 2010). Weiterführende Studien, über diese Arbeit hinaus, sollen zur Aufklärung der Rolle des 14-3-3 zeta Proteins sowie der weiteren identifizierten Proteine in der Biologie von KSHV beitragen. In naher Zukunft sollen 14-3-3 zeta Überexpressionsstudien erfolgen und die Auswirkungen auf die lytische Reaktivierung in BCBL-1 Zellen untersucht werden.

Das PLAU Protein wurde nach Suppression von Drosha in den Proteomanalysen nicht detektiert. Diesem Ergebnis könnten mehrere Ursachen zugrunde liegen. In den durchgeführten 2D Gelelektrophorese Experimenten wurden die pH-Bereiche 4 bis 7 sowie 6 bis 9 abgedeckt und die einzelnen Proteine der Proteingemische in der ersten Dimension isoelektrisch fokussiert (IEF). Das PLAU Protein weist einen errechneten isoelektrischen Punkt (pI) von 8,7 auf. Ein Problem stellt hierbei die schlechte Auflösung von Proteinen im basischen Bereich dar, was die Visualisierung und Identifizierung von Proteinen in unserem System erschwert. Des Weiteren ist es durchaus möglich, dass die Menge an PLAU Protein nach Suppression von Drosha unter der Detektionsgrenze der hier verwendeten Coomassie Färbemethode lagen. Diese Methode erlaubt zwar die nachfolgende Identifizierung durch Massenspektrometrie, jedoch ist die Sensitivität eher gering.

4.3 Identifizierung von zellulären Zieltranskripten KSHV-kodierter miRNAs

Die erstmalige Entdeckung von miRNAs erfolgte im Jahr 1993 anhand von genetischen Analysen an *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Lee et al., 1993). Seitdem sind über 5000 miRNAs in vielen Spezies nachgewiesen worden (Griffiths-Jones et al., 2008), welche an der Regulation von annähernd allen zellulären Prozessen beteiligt sein können (Übersicht in Bushati und

Cohe, 2007; Bartel, 2009; Ghildiyal und Zamore, 2009). Die Entdeckung von fünf viralen miRNAs im Genom von EBV hat damit auch ein neues Feld in der Virologie erschlossen (Pfeffer et al., 2004). Wie sich zeigte, kodiert ein Großteil der untersuchten Herpesviren für miRNAs weshalb angenommen wird, dass sie zur Aufrechterhaltung der Latenz sowie zur Modulation der Wirtszell-Antwort auf eine virale Infektion beitragen. Um die Funktion von viralen miRNAs sowie ihre komplexen regulatorischen Netzwerke zu verstehen ist es allerdings unabdingbar ihre Zielgene zu ermitteln.

Zur Identifizierung von zellulären Zieltranskripten wurden im Rahmen dieser Arbeit die KSHV-kodierten miRNAs in Expressionsvektoren kloniert und zur Herstellung von stabilen BJAB Zellen verwendet. Wie anhand von Northern Blot Analysen gezeigt, konnte die stabile Expression von 2 der 12 durch KSHV-kodierten miRNAs in diesen Zellen beispielhaft nachgewiesen werden (siehe Abbildung 36 C und 37 C). Da die viralen miRNAs zusammen mit GFP oder einem vorgeschaltetem IRES-Element exprimiert wurden, konnte zum einen von einer koordinierten Expression der miRNAs ausgegangen werden und zum anderen die Identifikation von miRNA-exprimierenden Zellen über die Expression von GFP sichergestellt werden. Wie sich in den Northern Blot Analysen zeigte, konnte im Vergleich zu latent infizierten BCBL-1 Zellen ein leicht erniedrigtes Expressionsniveau für die untersuchten miRNAs festgestellt werden. Eine mögliche Ursache hierfür liegt in der oft zu beobachteten teilweisen oder vollständigen Methylierung des CMV-Promotors nach Integration in das zelluläre Genom.

Da die Bindung von miRNAs an ihre Ziel-mRNA in einer Destabilisierung des entsprechenden Transkripts resultiert und eine leichte Expressionsreduktion auf eine potentielle miRNA-mRNA Interaktion hindeuten kann (Lim et al., 2005; Bagga et al., 2005; Ying und Lin, 2009), wurde das gesamte mRNA Expressionsprofil der Zellen, welche die KSHV-kodierten miRNAs stabil überexprimierten, mittels DNA-Microarray Analysen untersucht (siehe Abbildung 38). Interessanterweise konnten die Herunterregulierten Gene anhand einer Verknüpfung mit der Gene-Orthologie Datenbank mit biologischen Prozessen, welche unter anderem an der Antwort auf virale Infektionen und an dem Prozess der Immunantwort beteiligt sind, assoziiert

werden (siehe Abbildung 39). Dieses Ergebnis spiegelte sich ebenso in der Schnittmenge der durchgeführten Genexpressionsanalysen wieder, in der sich überwiegend Gene finden ließen, welche durch Interferone in ihrer Expression beeinflusst werden (siehe Abbildung 40 C). Die in dieser Arbeit identifizierten Gene sind: IFI44L, IFI27, IFI44, MX1, IRF7, KLHL21, OAS3, MYBPH, STAT1, LGP2, TDRD7, SSFA2, TPD52, NAPS2 sowie MET. Eine Beschreibung für einige der potenziellen miRNA-Zieltranskripte ist bereits im Kapitel 3.7.2. erfolgt. Die Interferone spielen eine wichtige Rolle in der Modulation des Zellzyklus, in der Regulation des Zellwachstums, der Aktivierung des Immunsystems und vor allem bei der Immunabwehr viraler Infektionen. Derzeit lassen sich zwei Gruppen von Interferonen (IFN) unterscheiden. Zu den Typ-I-IFN zählen das IFN- α , das IFN- β sowie die Subtypen IFN- δ , - τ und - ω . Den einzigen Vertreter der Typ-II-IFN stellt das IFN- γ dar. Während das IFN- γ seine Wirkung im späteren Infektionsverlauf entfaltet und der spezifischen Immunantwort zuzuordnen ist, werden Typ-I-IFN als früheste Abwehrmaßnahme bei einer viralen Infektion von infizierten Zellen synthetisiert und sezerniert (Übersicht in Stark et al., 1998). STAT1 wird durch Typ-I- und Typ-II-IFN induziert, während IFI44L, IFI27, IFI44, IRF7, OAS3 und MX1 durch Typ-I-IFN induziert werden. Die Produktion von Typ-I-IFN als Antwort auf eine virale Infektion wird in erster Linie auf transkriptioneller Ebene kontrolliert, wobei IFN-regulierte Faktoren (IRFs) hierbei eine zentrale Rolle spielen (Übersicht in Honda et al., 2006). Insbesondere für IRF3 und IRF7 (siehe oben) konnte im Rahmen einer antiviralen Immunantwort eine Schlüsselfunktion in der Induktion von IFN- α sowie IFN- β gezeigt werden (Übersicht in Honda et al., 2006).

Viele Viren haben im Verlauf ihrer Evolution Strategien entwickelt, die es ihnen ermöglichen die Immunantwort ihres Wirtes zu umgehen. Für Herpesviren ist eine virale Modulation des Immunsystems essentiell, um eine lebenslange Persistenz im Organismus etablieren zu können. Das KSHV exprimiert während der latenten Infektionsform nur einige wenige Gene, die es ihm dadurch ermöglichen die Immunantwort des Wirtes zu minimieren (siehe Kapitel 1.3.1). Darüber hinaus ist das KSHV unter anderem in der Lage die Anzahl der MHC-I-Proteine auf der Oberfläche von infizierten Zellen zu hemmen. Diese können die Antigene nicht mehr effizient präsentieren und das KSHV entgeht der durch

cytotoxischen T-Lymphocyten vermittelten Eliminierung (Übersicht in Griffin et al., 2010). Um dies zu bewerkstelligen kodiert KSHV zwei verwandte Typ III Transmembranproteine K1 und K5, die auch als MIR-1 und MIR-2 (modulators of immune recognition) bezeichnet werden. Beide Proteine fungieren während der lytischen Phase als E3 Ubiquitin Ligasen und können eine rasche Endozytose und Degradation der MHC-I-Moleküle von der Zelloberfläche einleiten (Ishido et al., 2000; Coscoy und Ganem, 2000). Andere Herpesviren, wie beispielsweise HCMV, bedienen sich ähnlichen Mechanismen (Gewurz et al., 2001).

Wie sich immer mehr herausbildet wird die Fähigkeit sich der Immunantwort des Wirtes zu entziehen nicht nur durch virale Proteine vermittelt sondern auch durch virale miRNAs (Cullen, 2009; Nair und Zavolan, 2006). Ihre Nicht-Immunogenität macht miRNAs dabei zu einem idealen Werkzeug. So ist die KSHV-kodierte miR-K12-7 in der Lage MICB (major histocompatibility complex class I polypeptide-related sequence B) negativ zu regulieren, was zudem für EBV und HCMV gezeigt werden konnte (Nachmani et al., 2009; Stern-Ginossar et al., 2007). Das MICB stellt einen essentiellen Liganden für die durch NK-Zellen (natürliche Killerzellen) vermittelte Abtötung von infizierten Zellen dar (Stern-Ginossar et al., 2007).

Eine direkte negative Regulation von Typ-I-IFN durch virale miRNAs konnte bisher allerdings noch nicht gezeigt werden, wobei gegenwärtige Daten die Möglichkeit einer solchen Modulation anhand von zellulären miRNAs belegen (Witwer et al., 2010). KSHV kodiert diesbezüglich für virale Interferon regulatorische Faktoren (vIRF1-3), welche in der Lage sind Interferon induzierte Signaltransduktionen zu inhibieren und es dadurch KSHV-infizierten Zellen erlauben der Wirkung von Virus-spezifischen T-Zellen zu entkommen (Burysek et al., 1999; Lin et al., 2001; Gao et al., 1997; Fuld et al., 2006). Das vIRF1 und vIRF2 zeigen eine lytische Expressionskinetik, während das B-Zell spezifische vIRF3 in der latenten Infektionsform exprimiert wird (Rivas et al., 2001). Das vIRF3 inhibiert den durch IRF7-vermittelten Interferon-Signalweg, so dass auf Grundlage der Microarray Daten die KSHV-kodierten miRNAs zur Inhibierung beitragen könnten (Joo et al., 2007). Interessanterweise führte die Behandlung von HUVEC Zellen, welche nach einem adenoviralen Gentransfer alle KSHV-

kodierten miRNAs überexprimierten, mit Poly I:C (polyinosinic:polycytidylic) im Vergleich zu HUVEC Kontrollzellen in initialen Experimenten zu einer stark erniedrigten IFN-Antwort (Daten nicht gezeigt). Das Poly I:C ist eine synthetische Doppelstrang-RNA, welche die angeborene Immunantwort, einschließlich Typ-I-IFN, stimuliert. Derzeit wird diesem Phänotyp weiter nachgegangen.

Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Expression viraler miRNAs erst spät in *de novo* infizierten endothelialen Zellen nachgewiesen werden kann (Christine Henning, nicht veröffentlicht). Eine Etablierung der latenten Infektionsform scheint in Anbetracht dessen nicht von viralen miRNAs vermittelt zu werden, sondern wie aktuelle Studien unserer Arbeitsgruppe zeigen vielmehr epigenetischer Natur zu sein (Günther und Grundhoff, 2010). Denkbar wäre, dass die KSHV-kodierten miRNAs durch eine negative Regulation von apoptotischen Prozessen, beispielsweise durch die Modulation von BCLAF (Ziegelbauer et al., 2009), und des Interferon-Signalwegs zu einem späten Zeitpunkt der Infektion zur Aufrechterhaltung der viralen Latenz über den Vorgang der Immunevasion beitragen.

Die Bindung von miRNAs an ihre Ziel-mRNA führt in der Mehrzahl der Interaktionen nur zu einer leichten Destabilisierung des entsprechenden Transkripts (Lim et al., 2005; Bagga et al., 2005; Ying und Lin, 2009). Hierbei wird die miRNA Ziel-mRNA, welche spezifisch durch den RISC Effektor-Komplex gebunden ist, in P-bodies (processing bodies) transportiert, innerhalb derer sie nicht mehr translatiert werden kann. Darüber hinaus findet oftmals eine Verkürzung des poly(A)-Endes statt, die mit einer Destabilisierung der mRNA einhergeht (Wu et al., 2006; Giraldez et al., 2006). Das Ausmaß dieser sekundären Destabilisierung ist jedoch häufig so gering, dass die in Microarray Analysen detektierbaren Veränderungen deutlich unter dem im Rahmen von normalen Genexpressionsanalysen verwendeten Schwellenwert liegen, welcher mindestens einer 2-fach veränderten Regulation entspricht, obwohl die tatsächliche Suppression auf Proteinebene wesentlich stärker ist. Dementsprechend wird für die Detektion putativer mRNA Zieltranskripte meist ein niedriger Schwellenwert definiert (mehr als die 2-fache Standardabweichung

der korrigierten Expressionswerte) der sicherstellt, dass die detektierbaren Signale signifikant über dem „Hintergrundrauschen“ der Arrays liegen.

Die entsprechend dieser Maßgaben durchgeführten Analysen führten nach ektopischer Expression der KSHV-kodierten miRNAs zu einer Herabregulation von ungefähr 200 Genen (siehe Abbildung 38). Obwohl davon ausgegangen wird, dass über 60% der humanen Gene durch miRNAs reguliert werden (Friedman et al., 2009) sind bislang nur wenige Interaktionen gut charakterisiert. Ähnlich sieht die Situation für virale miRNAs aus. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich die Kombination einer Immunpräzipitation des RISCs (RNA-induced silencing complex) gefolgt von einer Microarray Analyse von an RISC-gebundenen miRNA-Zieltranskripten (RIP-Chip) sehr gut eignet, um zelluläre miRNA-Ziele zu identifizieren (Baroni et al., 2008; Beitzinger et al., 2007; Easow et al., 2007; Hendrickson et al., 2008; Karginov et al., 2007; Keene et al., 2006). Diese Strategie wurde jüngst zur Analyse von miRNA-Zieltranskripten von KSHV angewandt (Dölken et al., 2010). Zur Identifizierung wurden in dieser Studie zum einen BCBL-1 Zellen und zum anderen KSHV-negative Zellen (DG75), in die 10 der 12 von KSHV-kodierten miRNAs durch einen lentiviralen Gentransfer eingeschleust wurden, untersucht. Bei einem Vergleich mit den publizierten Daten, konnte nur die in dieser Arbeit identifizierte TPD52 mRNA (Tumor Protein D52) im RIP-Chip angereichert vorgefunden werden. Ein Grund für die geringe Überschneidung kann zum einen in den unterschiedlichen Zelltypen, welche für die Analysen verwendet wurden (BJAB Zellen oder DG75 Zellen), gesehen werden. Zum anderen wurden in den hier präsentierten Analysen alle KSHV-kodierten miRNAs mit einbezogen und diese nicht über einen lentiviralen Gentransfer sondern mittels Elektroporation in die Zellen eingeschleust. Darüber hinaus zeigten die virusspezifischen miRNAs in dem hier verwendeten Expressionssystem eine stärkere Expression als im System der Autoren (Dölken et al., 2010). Diese vielversprechende Strategie zur Identifizierung von zellulären Zieltranskripten viraler miRNAs findet derzeit auch in unserer Arbeitsgruppe Verwendung.

Die bevorzugte Bindungsstelle von miRNAs an ihre Ziel-mRNA liegt in der 3'-UTR (Beak et al., 2008; Selbach et al., 2008; Bartel, 2009), wobei für einige miRNAs eine Bindung in kodierenden Bereichen und der 5'-UTR nachgewiesen

werden konnte (Lytle et al., 2007; Kloosterman et al., 2004; Orom et al., 2008; Rigoutsos, 2009; Gu et al., 2009) (siehe Kapitel 1.4.4). Um zu untersuchen, ob die anhand von DNA-Microarray Analysen identifizierten Zieltranskripte primäre Ziele KSHV-kodierter miRNAs sein können, wurde eine bioinformatische Analyse durchgeführt (siehe Abbildung 41). Wie sich zeigte, konnte mit Hilfe des in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Programms namens Genome-Browser für nahezu alle potenziellen Ziel-mRNAs eine seed-Sequenz Übereinstimmung in der 3'-UTR vorhergesagt werden. Somit könnten die identifizierten Transkripte einer negativen Regulation durch die KSHV-kodierten miRNAs unterliegen. Nur für die 3'-UTR des IRF7 Transkripts konnte anhand der computergestützten Analyse keine Interaktion vorhergesagt werden. Gegenwärtig kann eine indirekte Regulation der potenziellen Transkripte jedoch nicht ausgeschlossen werden, weshalb eine Validierung der möglichen miRNA-mRNA Interaktionen mit Hilfe des Luciferase-Reportersystems erfolgen soll. Hierzu wurden die 3'-UTR Sequenzen der identifizierten Gene bereits kloniert. Des Weiteren soll überprüft werden, ob die KSHV-kodierten miRNAs in der Lage sind das IRF7 Transkript durch Bindung an die kodierende Region sowie an die 5'-UTR zu regulieren.

Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung von Ziel-mRNAs wurde in dieser Arbeit mit der quantitativen Proteomik-Technik verfolgt. Dies ist insofern möglich, als dass der Hauptmechanismus von miRNAs in einer translationalen Inhibierung ihrer Ziel-mRNA besteht (siehe Kapitel 1.4.4). Die in dieser Arbeit nach stabiler ektopischer Expression aller KSHV-kodierten miRNAs herunterregulierten Proteine sind: PCBP1, ECH1, TPI1, TPD52 sowie NCL. Eine genauere Beschreibung der identifizierten Proteine ist bereits im Kapitel 3.7.4 erfolgt. Interessant in Hinblick auf die Biologie von KSHV ist das TPD52 (Tumor Protein D52).

Das Tumor Protein D52 konnte sowohl in Lungen-, Prostata- und Darmkrebs als auch in B-Zell Tumoren mit erhöhter Expression nachgewiesen werden (Chen et al., 1996b; Wang et al., 2004b; Malek et al., 2004; Tiacci et al., 2005). Die alleinige Expression des murinen TPD52, welches zu 90% mit dem humanen Ortholog identisch ist, führte *in vivo* zur Initiation der Zelltransformation, Tumorgenese und zur Metastasierung von Krebszellen

(Lewis et al., 2007). Darüber hinaus konnte eine Interaktion mit Mitgliedern der 14-3-3 Proteinfamilie aufgezeigt werden (Wang et al., 2009). Interessanterweise konnte das TPD52 nach ektopischer Expression der KSHV-kodierten miRNAs sowohl auf transkriptioneller Ebene anhand von DNA-Microarray Analysen als auch in den Proteomanalysen in seiner Expression erniedrigt nachgewiesen werden (siehe Abbildung 40 C und 42). Inwieweit eine erniedrigte Expression von TPD52 mit KSHV in Verbindung gebracht werden könnte, wird derzeit untersucht. Vielversprechend könnte die Beobachtung sein, dass dem TPD52 eine Rolle in der B-Zell Differenzierung zugesprochen wird (Tiacci et al., 2005).

Die Daten in dieser Arbeit geben einen ersten und interessanten Hinweis darauf, dass die KSHV-kodierten miRNAs durch eine mögliche negative Regulation von Typ-I-IFN an der Modulation des Immunsystems beteiligt sein könnten. Dies würde es KSHV-infizierten Zellen erlauben die Immunantwort ihres Wirtes zu umgehen, um eine lebenslange Persistenz im Organismus etablieren zu können. Des Weiteren ist es in dieser Arbeit gelungen weitere potentielle Zieltranskripte KSHV-kodierter miRNAs zu identifizieren, die nun anhand von Luciferase-Analysen verifiziert werden können.

Eine weitere Strategie, um potentielle Zieltranskripte KSHV-kodierter miRNAs zu identifizieren, wird darüber hinaus in einem *in vivo* Modell verfolgt, welches auf der Beobachtung beruht, dass die virusspezifische miR-K12-11 eine identische seed-Sequenz zur zellulären miR-155 aufweist (siehe Kapitel 1.4.5 und Abbildung 37) (Gottwein et al., 2007; Skalsky et al., 2007).

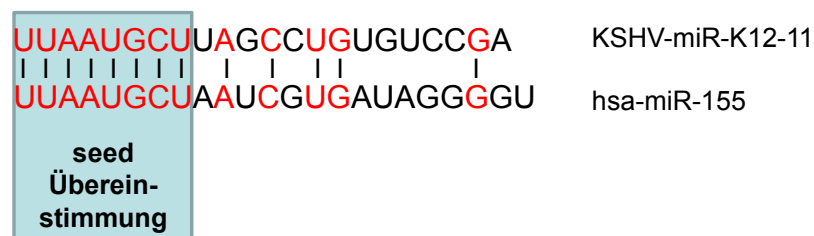


Abbildung 37: Seed-Sequenz Übereinstimmung zwischen der reifen miR-K12-11 und der zellulären miR-155

Eine Überexpression der miR-155 ist mit der Transformation von B-Zellen assoziiert und seine regulatorische Funktion zudem essentiell für die Differenzierung von B-Zellen zu Plasma-Zellen (Garzon und Croce, 2008; Baltimore et al., 2008). Da die KSHV-infizierten PEL-Zellen keine endogene miR-155 Expression aufzeigen und zudem in ihrer vollen Differenzierung zu Plasma-Zellen blockiert zu sein scheinen, könnte die virale miR-K12-11 unter Nutzung identischer miR-155 Zieltranskripte zur Transformation von B-Zellen beitragen. Eine Fragestellung für die sich unsere Arbeitsgruppe ebenso interessiert. Unter Nutzung eines *in vivo* Ansatzes, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Carol Stocking (HPI Hamburg), konnte durch die alleinige Expression der miR-K12-11 in einem Langzeitversuch bei einem Versuchstier (C57BL/6-Mäuse) die Entstehung eines Lymphoms beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Gegenwärtig kann jedoch noch nicht beantwortet werden, ob die miR-K12-11 direkt zur Initiation und/oder Progression beigetragen hat. In einem weiteren *in vivo* Ansatz wird dieser interessanten Fragestellung derzeit nachgegangen, auch mit dem Ziel weitere Zieltranskripte KSHV-kodierter miRNAs identifizieren zu können.

5 Zusammenfassung

Das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV) ist mit drei lymphoproliferativen Tumorerkrankungen in immunsupprimierten Individuen assoziiert: dem Kaposi Sarkom (KS), dem primären Effusionslymphom (PEL) sowie der Multizentrischen Castleman Krankheit (MCD). In allen Tumorzellen, wie auch in PEL und in von PEL-abgeleiteten Zelllinien, persistiert das KSHV in seiner latenten Infektionsform. Diese Phase des viralen Lebenszyklus ist durch die eingeschränkte Expression einiger weniger viraler Gene charakterisiert, welche eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von KSHV-assoziierten Erkrankungen spielen. Im Gegensatz dazu, bezieht die lytische Replikation die zeitlich regulierte Expression des nahezu gesamten viralen Genoms ein und führt letztendlich zum Tod der infizierten Wirtszellen und der Freisetzung neuer Viruspartikel. Aus diesem Grund ist die Suppression der produktiven KSHV Replikation entscheidend für die Proliferation von Tumorzellen. Die genauen molekularen Mechanismen, welche zur Aufrechterhaltung der Latenz beitragen, sind bis heute noch weitestgehend ungeklärt. Von besonderem Interesse sind hierbei die durch unsere und andere Gruppen identifizierten KSHV-kodierten miRNAs. MiRNAs sind kleine (~22 nt), nicht-kodierende RNAs, welche durch Bindung an ihre Ziel-mRNA zu einer post-transkriptionellen Regulation der Genexpression befähigt sind. Aufgrund ihrer konstitutiven Expression in latent infizierten Zellen stehen die KSHV-kodierten miRNAs im Verdacht, zur Aufrechterhaltung der viralen Latenz sowie durch eine Modulation der zellulären Genexpression zur Tumorerkrankung beizutragen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression von Drosha und Dicer, zweier Schlüsselenzyme der miRNA-Reifung, mit Hilfe der RNA-Interferenz Technik inhibiert. Die Inhibition der beiden Enzyme resultierte in einer deutlichen und in etwa gleichstarken Reduktion der virusspezifischen miRNA Expression. Interessanterweise konnte nach Suppression von Drosha eine rasche und effiziente Induktion der lytischen KSHV Reaktivierung in latent infizierten PEL-Zelllinien nachgewiesen werden, während die Suppression von Dicer keine Auswirkung auf die Induktion des lytischen Zyklus zeigte. Somit scheint ein miRNA-unabhängiger

Mechanismus für den beobachteten Phänotyp verantwortlich zu sein. Eine erst kürzlich gemachte Beobachtung lässt vermuten, dass Drosha direkt an der Destabilisierung von mRNA Transkripten beteiligt ist. Durch die Anwendung von umfassenden DNA-Microarray Analysen konnten hierbei mehrere zelluläre mRNA Transkripte identifiziert werden, welche nach Suppression von Drosha stark hochreguliert waren. Die Transkripte PLAU (Urokinase Plasminogen Aktivator) und CCL3 (C-C Chemokin Ligand 3) waren in den Analysen am stärksten reguliert, so dass ihre Rolle während der latenten Infektionsform von KSHV näher untersucht wurde. Wie sich zeigte, konnte durch eine lentivirale Überexpression von CCL3 kein induzierender Effekt auf die Initiation des lytischen Zyklus in PEL-Zellen nachgewiesen werden. Eine mögliche Rolle von PLAU während der viralen Latenz konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Eine Regulation dieser Transkripte durch Drosha wird derzeit untersucht. Um weitere Hinweise auf den Zusammenhang zwischen der Suppression von Drosha und der viralen Reaktivierung zu erhalten wurden des Weiteren Proteomanalysen durchgeführt und dadurch Proteine identifiziert, die für den nach Suppression von Drosha induzierten Phänotyp verantwortlich sein könnten. Die Daten dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass die präzise Kontrolle von Drosha, unabhängig von seiner Funktion in der miRNA-Biogenese, an der Aufrechterhaltung der latenten Infektionsform von KSHV beteiligt sein könnte.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit bestand in der Identifizierung von zellulären Zieltranskripten KSHV-kodierter miRNAs. Es ist in dieser Arbeit gelungen humane B-Zellen mit einer stabilen Expression der KSHV-kodierten miRNAs zu generieren, deren mRNA Expressionsprofil anhand von DNA-Microarray Analysen untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass durch die ektopische Expression der KSHV-kodierten miRNAs überwiegend mRNA Transkripte des Interferon-Systems negativ reguliert waren. Durch die Anwendung von Proteomanalysen konnten zudem weitere potentielle miRNA Zieltranskripte identifiziert werden, welche derzeit verifiziert werden. Die Daten dieser Arbeit liefern erste Hinweise, dass die virusspezifischen miRNAs durch die Modulation des Immunsystems zur Aufrechterhaltung der latenten Infektionsform beitragen könnten.

6 Literaturverzeichnis

- Adamson AL, Wright N, LaJeunesse DR. 2005. Modeling early Epstein-Barr virus infection in *Drosophila melanogaster*: the BZLF1 protein. *Genetics* 171:1125-1135.
- Aitken A. 1995. 14-3-3 proteins on the MAP. *Trends Biochem Sci* 20:95-97.
- Aitken A, Collinge DB, van Heusden BP, Isobe T, Roseboom PH, Rosenfeld G, Soll J. 1992. 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends Biochem Sci* 17:498-501.
- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. 2003. A uniform system for microRNA annotation. *Rna* 9:277-279.
- Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. 1990. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 265:4923-4928.
- Andreoni M, El-Sawaf G, Rezza G, Ensoli B, Nicastrì E, Ventura L, Ercoli L, Sarmati L, Rocchi G. 1999. High seroprevalence of antibodies to human herpesvirus-8 in Egyptian children: evidence of nonsexual transmission. *J Natl Cancer Inst* 91:465-469.
- Appella E, Robinson EA, Ullrich SJ, Stoppelli MP, Corti A, Cassani G, Blasi F. 1987. The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. *J Biol Chem* 262:4437-4440.
- Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J. 2007. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* 318:761-764.
- Arora A, Chiao E, Tying SK. 2007. AIDS malignancies. *Cancer Treat Res* 133:21-67.
- Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. 2008. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455:64-71.
- Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. 2005. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122:553-563.
- Bais C, Santomasso B, Coso O, Arvanitakis L, Raaka EG, Gutkind JS, Asch AS, Cesarman E, Gershengorn MC, Mesri EA. 1998. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature* 391:86-89.
- Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. 2000. Plasminogen activator system, vascular endothelial growth factor, and colorectal cancer progression. *Mol Pathol* 53:307-312.
- Balleine RL, Fejzo MS, Sathasivam P, Basset P, Clarke CL, Byrne JA. 2000. The hD52 (TPD52) gene is a candidate target gene for events resulting in increased 8q21 copy number in human breast carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 29:48-57.
- Ballestas ME, Chatis PA, Kaye KM. 1999. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* 284:641-644.
- Ballestas ME, Kaye KM. 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 mediates episome persistence through cis-acting terminal repeat (TR) sequence and specifically binds TR DNA. *J Virol* 75:3250-3258.
- Baltimore D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226:1209-1211.
- Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. 2008. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* 9:839-845.
- Baroni TE, Chittur SV, George AD, Tenenbaum SA. 2008. Advances in RIP-chip analysis: RNA-binding protein immunoprecipitation-microarray profiling. *Methods Mol Biol* 419:93-108.
- Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
- Bartel DP. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215-233.
- Bechtel JT, Liang Y, Hvidding J, Ganem D. 2003. Host range of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *J Virol* 77:6474-6481.
- Beitzinger M, Peters L, Zhu JY, Kremmer E, Meister G. 2007. Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes. *RNA Biol* 4:76-84.
- Bellare P, Ganem D. 2009. Regulation of KSHV lytic switch protein expression by a virus-encoded microRNA: an evolutionary adaptation that fine-tunes lytic reactivation. *Cell*

- Host Microbe* 6:570-575.
- Beqaj SH, Post D, Ryan JM. 2003. Single-nucleotide polymorphism of the urokinase-plasminogen activator gene during aging and transformation of human diploid kidney cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39:343-347.
- Berney CR, Yang JL, Fisher RJ, Russell PJ, Crowe PJ. 1998. Vascular endothelial growth factor expression is reduced in liver metastasis from colorectal cancer and correlates with urokinase-type plasminogen activator. *Anticancer Res* 18:973-977.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363-366.
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ. 2003. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35:215-217.
- Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang GH, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B, Lenardo MJ, Tomaselli KJ, Cohen JL. 1997. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1172-1176.
- Bieleski L, Talbot SJ. 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vCyclin open reading frame contains an internal ribosome entry site. *J Virol* 75:1864-1869.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:197-250.
- Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilsley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, Baskerville S, Maksimova E, Robinson K, Karpilow J, Marshall WS, Khvorova A. 2006. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods* 3:199-204.
- Blackbourn DJ, Lennette ET, Ambroziak J, Mourich DV, Levy JA. 1998. Human herpesvirus 8 detection in nasal secretions and saliva. *J Infect Dis* 177:213-216.
- Blasi F. 1997. uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunol Today* 18:415-417.
- Blaskovic D, Stancekova M, Svobodova J, Mistrikova J. 1980. Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents. *Acta Virol* 24:468.
- Bohenzky RA, Lagunoff M, Roizman B, Wagner EK, Silverstein S. 1995. Two overlapping transcription units which extend across the L-S junction of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 69:2889-2897.
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* 10:185-191.
- Boshoff C, Schulz TF, Kennedy MM, Graham AK, Fisher C, Thomas A, McGee JO, Weiss RA, O'Leary JJ. 1995. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. *Nat Med* 1:1274-1278.
- Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova E, Martick M, Sandford G, Nicholas J, Garcia KC. 2004. Molecular mechanisms for viral mimicry of a human cytokine: activation of gp130 by HHV-8 interleukin-6. *J Mol Biol* 335:641-654.
- Bower M, Palmieri C, Dhillon T. 2006. AIDS-related malignancies: changing epidemiology and the impact of highly active antiretroviral therapy. *Curr Opin Infect Dis* 19:14-19.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. 2005. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3:e85.
- Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R. 2003. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34:263-264.
- Brooks JJ. 1986. Kaposi's sarcoma: a reversible hyperplasia. *Lancet* 2:1309-1311.
- Brown HJ, Song MJ, Deng H, Wu TT, Cheng G, Sun R. 2003. NF-kappaB inhibits gammaherpesvirus lytic replication. *J Virol* 77:8532-8540.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553.
- Buck AH, Santoyo-Lopez J, Robertson KA, Kumar DS, Reczko M, Ghazal P. 2007. Discrete clusters of virus-encoded micrornas are associated with complementary strands of the genome and the 7.2-kilobase stable intron in murine cytomegalovirus. *J Virol* 81:13761-13770.
- Burysek L, Yeow WS, Pitha PM. 1999. Unique properties of a second human herpesvirus 8-encoded interferon regulatory factor (vIRF-2). *J Hum Virol* 2:19-32.
- Bushati N, Cohen SM. 2007. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:175-205.

- Byun H, Gwack Y, Hwang S, Choe J. 2002. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame (ORF) 50 transactivates K8 and ORF57 promoters via heterogeneous response elements. *Mol Cells* 14:185-191.
- Cai X, Lu S, Zhang Z, Gonzalez CM, Damania B, Cullen BR. 2005. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5570-5575.
- Calabro ML, Sheldon J, Favero A, Simpson GR, Fiore JR, Gomes E, Angarano G, Chieco-Bianchi L, Schulz TF. 1998. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 in several regions of Italy. *J Hum Virol* 1:207-213.
- Carbone A, Cilia AM, Gloghini A, Capello D, Todesco M, Quattrone S, Volpe R, Gaidano G. 1998. Establishment and characterization of EBV-positive and EBV-negative primary effusion lymphoma cell lines harbouring human herpesvirus type-8. *Br J Haematol* 102:1081-1089.
- Carbone A, Gaidano G. 1997. HHV-8-positive body-cavity-based lymphoma: a novel lymphoma entity. *Br J Haematol* 97:515-522.
- Carmeliet P, Collen D. 1998. Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb Res* 91:255-285.
- Carmell MA, Hannon GJ. 2004. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 11:214-218.
- Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ. 2002. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 16:2733-2742.
- Carter KL, Ward PL, Roizman B. 1996. Characterization of the products of the U(L)43 gene of herpes simplex virus 1: potential implications for regulation of gene expression by antisense transcription. *J Virol* 70:7663-7668.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642-655.
- Casper C, Wald A, Pauk J, Tabet SR, Corey L, Celum CL. 2002. Correlates of prevalent and incident Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in men who have sex with men. *J Infect Dis* 185:990-993.
- Cattani P, Cerimele F, Porta D, Graffeo R, Ranno S, Marchetti S, Ricci R, Capodicasa N, Fuga L, Amico R, Cherchi G, Gazzilli M, Zanetti S, Fadda G. 2003. Age-specific seroprevalence of Human Herpesvirus 8 in Mediterranean regions. *Clin Microbiol Infect* 9:274-279.
- Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, Barras E, Reith W, Santos MA, Pierre P. 2009. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2735-2740.
- Cesarman E. 2002. The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in lymphoproliferative diseases. *Recent Results Cancer Res* 159:27-37.
- Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. 1995. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* 332:1186-1191.
- Cesarman E, Nador RG, Bai F, Bohenzky RA, Russo JJ, Moore PS, Chang Y, Knowles DM. 1996. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma. *J Virol* 70:8218-8223.
- Chan SR, Bloomer C, Chandran B. 1998. Identification and characterization of human herpesvirus-8 lytic cycle-associated ORF 59 protein and the encoding cDNA by monoclonal antibody. *Virology* 240:118-126.
- Chan SR, Chandran B. 2000. Characterization of human herpesvirus 8 ORF59 protein (PF-8) and mapping of the processivity and viral DNA polymerase-interacting domains. *J Virol* 74:10920-10929.
- Chandriani S, Xu Y, Ganem D. 2010. The lytic transcriptome of KSHV reveals extensive transcription of noncoding regions, including regions antisense to important genes. *J Virol*.
- Chang PJ, Shedd D, Gradoville L, Cho MS, Chen LW, Chang J, Miller G. 2002. Open reading frame 50 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus directly activates the viral PAN and K12 genes by binding to related response elements. *J Virol* 76:3168-3178.

- Chang PJ, Shedd D, Miller G. 2005. Two subclasses of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic cycle promoters distinguished by open reading frame 50 mutant proteins that are deficient in binding to DNA. *J Virol* 79:8750-8763.
- Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266:1865-1869.
- Chang Y, Moore PS, Talbot SJ, Boshoff CH, Zarkowska T, Godden K, Paterson H, Weiss RA, Mitnacht S. 1996b. Cyclin encoded by KS herpesvirus. *Nature* 382:410.
- Chang Y, Ziegler J, Wabinga H, Katangole-Mbidde E, Boshoff C, Schulz T, Whitby D, Maddalena D, Jaffe HW, Weiss RA, Moore PS. 1996a. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and Kaposi's sarcoma in Africa. Uganda Kaposi's Sarcoma Study Group. *Arch Intern Med* 156:202-204.
- Chapman HA. 1997. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr Opin Cell Biol* 9:714-724.
- Chaudhary PM, Jasmin A, Eby MT, Hood L. 1999. Modulation of the NF-kappa B pathway by virally encoded death effector domains-containing proteins. *Oncogene* 18:5738-5746.
- Chen J, Ueda K, Sakakibara S, Okuno T, Yamanishi K. 2000. Transcriptional regulation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor gene. *J Virol* 74:8623-8634.
- Chen J, Ye F, Xie J, Kuhne K, Gao SJ. 2009. Genome-wide identification of binding sites for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic switch protein, RTA. *Virology* 386:290-302.
- Chen SL, Maroulakou IG, Green JE, Romano-Spica V, Modi W, Lautenberger J, Bhat NK. 1996b. Isolation and characterization of a novel gene expressed in multiple cancers. *Oncogene* 12:741-751.
- Chen WT. 1996. Proteases associated with invadopodia, and their role in degradation of extracellular matrix. *Enzyme Protein* 49:59-71.
- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436:740-744.
- Choi HS, Hwang CK, Song KY, Law PY, Wei LN, Loh HH. 2009. Poly(C)-binding proteins as transcriptional regulators of gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 380:431-436.
- Chung J, Bachelder RE, Lipscomb EA, Shaw LM, Mercurio AM. 2002. Integrin (alpha 6 beta 4) regulation of eIF-4E activity and VEGF translation: a survival mechanism for carcinoma cells. *J Cell Biol* 158:165-174.
- Clark GJ, Drugan JK, Rossman KL, Carpenter JW, Rogers-Graham K, Fu H, Der CJ, Campbell SL. 1997. 14-3-3 zeta negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. *J Biol Chem* 272:20990-20993.
- Cobb BS, Nesterova TB, Thompson E, Hertweck A, O'Connor E, Godwin J, Wilson CB, Brockdorff N, Fisher AG, Smale ST, Merckenschlager M. 2005. T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J Exp Med* 201:1367-1373.
- Cohen A, Brodie C, Sarid R. 2006. An essential role of ERK signalling in TPA-induced reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Gen Virol* 87:795-802.
- Coscoy L, Ganem D. 2001. A viral protein that selectively downregulates ICAM-1 and B7-2 and modulates T cell costimulation. *J Clin Invest* 107:1599-1606.
- Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N, Croce CM. 2006. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7024-7029.
- Cotter MA, 2nd, Robertson ES. 1999. The latency-associated nuclear antigen tethers the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome to host chromosomes in body cavity-based lymphoma cells. *Virology* 264:254-264.
- Cotter MA, 2nd, Subramanian C, Robertson ES. 2001. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen binds to specific sequences at the left end of the viral genome through its carboxy-terminus. *Virology* 291:241-259.
- Dalton-Griffin L, Wilson SJ, Kellam P. 2009. X-box binding protein 1 contributes to induction of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic cycle under hypoxic conditions. *J Virol* 83:7202-7209.

- Danes CG, Wyszomierski SL, Lu J, Neal CL, Yang W, Yu D. 2008. 14-3-3 zeta down-regulates p53 in mammary epithelial cells and confers luminal filling. *Cancer Res* 68:1760-1767.
- Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L. 1985. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 44:139-266.
- Decker LL, Shankar P, Khan G, Freeman RB, Dezube BJ, Lieberman J, Thorley-Lawson DA. 1996. The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) is present as an intact latent genome in KS tissue but replicates in the peripheral blood mononuclear cells of KS patients. *J Exp Med* 184:283-288.
- Demetriou MC, Pennington ME, Nagle RB, Cress AE. 2004. Extracellular alpha 6 integrin cleavage by urokinase-type plasminogen activator in human prostate cancer. *Exp Cell Res* 294:550-558.
- Deng H, Chu JT, Rettig MB, Martinez-Maza O, Sun R. 2002. Rta of the human herpesvirus 8/Kaposi sarcoma-associated herpesvirus up-regulates human interleukin-6 gene expression. *Blood* 100:1919-1921.
- Deng H, Young A, Sun R. 2000. Auto-activation of the rta gene of human herpesvirus-8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Gen Virol* 81:3043-3048.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432:231-235.
- Desrosiers RC, Sasseville VG, Czajak SC, Zhang X, Mansfield KG, Kaur A, Johnson RP, Lackner AA, Jung JU. 1997. A herpesvirus of rhesus monkeys related to the human Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 71:9764-9769.
- Dittmer D, Lagunoff M, Renne R, Staskus K, Haase A, Ganem D. 1998. A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 72:8309-8315.
- Dlakic M. 2006. DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold. *Bioinformatics* 22:2711-2714.
- Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17:438-442.
- Dolken L, Malterer G, Erhard F, Kothe S, Friedel CC, Suffert G, Marcinowski L, Motsch N, Barth S, Beitzinger M, Lieber D, Bailer SM, Hoffmann R, Ruzsics Z, Kremmer E, Pfeffer S, Zimmer R, Koszinowski UH, 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.
- Dolken L, Perot J, Cognat V, Alioua A, John M, Soutschek J, Ruzsics Z, Koszinowski U, Voinnet O, Pfeffer S. 2007. Mouse cytomegalovirus microRNAs dominate the cellular small RNA profile during lytic infection and show features of posttranscriptional regulation. *J Virol* 81:13771-13782.
- Dourmishev LA, Dourmishev AL, Palmeri D, Schwartz RA, Lukac DM. 2003. Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:175-212, table of contents.
- Dukers NH, Renwick N, Prins M, Geskus RB, Schulz TF, Weverling GJ, Coutinho RA, Goudsmit J. 2000. Risk factors for human herpesvirus 8 seropositivity and seroconversion in a cohort of homosexual men. *Am J Epidemiol* 151:213-224.
- Dumler I, Stepanova V, Jerke U, Mayboroda OA, Vogel F, Bouvet P, Tkachuk V, Haller H, Gulba DC. 1999. Urokinase-induced mitogenesis is mediated by casein kinase 2 and nucleolin. *Curr Biol* 9:1468-1476.
- Dupin N, Diss TL, Kellam P, Tulliez M, Du MQ, Sicard D, Weiss RA, Isaacson PG, Boshoff C. 2000. HHV-8 is associated with a plasmablastic variant of Castleman disease that is linked to HHV-8-positive plasmablastic lymphoma. *Blood* 95:1406-1412.
- Dupin N, Fisher C, Kellam P, Ariad S, Tulliez M, Franck N, van Marck E, Salmon D, Gorin I, Escande JP, Weiss RA, Alitalo K, Boshoff C. 1999. Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4546-4551.
- Easow G, Teleman AA, Cohen SM. 2007. Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification. *Rna* 13:1198-1204.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200.
- Engels EA, Atkinson JO, Graubard BI, McQuillan GM, Gamache C, Mbisa G, Cohn S, Whitby D, Goedert JJ. 2007. Risk factors for human herpesvirus 8 infection among adults in the United States and evidence for sexual transmission. *J Infect Dis* 196:199-207.

- Ferrara N. 2002. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2:795-803.
- Filippov V, Solovyev V, Filippova M, Gill SS. 2000. A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* 245:213-221.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Ford PW, Bryan BA, Dyson OF, Weidner DA, Chintalgattu V, Akula SM. 2006. Raf/MEK/ERK signalling triggers reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency. *J Gen Virol* 87:1139-1144.
- Foreman KE, Friborg J, Chandran B, Katano H, Sata T, Mercader M, Nabel GJ, Nickoloff BJ. 2001. Injection of human herpesvirus-8 in human skin engrafted on SCID mice induces Kaposi's sarcoma-like lesions. *J Dermatol Sci* 26:182-193.
- Forstemann K, Tomari Y, Du T, Vagin VV, Denli AM, Bratu DP, Klattenhoff C, Theurkauf WE, Zamore PD. 2005. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol* 3:e236.
- Fortin KR, Nicholson RH, Nicholson AW. 2002. Mouse ribonuclease III. cDNA structure, expression analysis, and chromosomal location. *BMC Genomics* 3:26.
- Friborg J, Jr., Kong W, Hottiger MO, Nabel GJ. 1999. p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature* 402:889-894.
- Friedlander MR, Chen W, Adamidi C, Maaskola J, Einspanier R, Knespel S, Rajewsky N. 2008. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nat Biotechnol* 26:407-415.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19:92-105.
- Friedman-Kien AE. 1981. Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *J Am Acad Dermatol* 5:468-471.
- Fujimuro M, Wu FY, ApRhys C, Kajumbula H, Young DB, Hayward GS, Hayward SD. 2003. A novel viral mechanism for dysregulation of beta-catenin in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency. *Nat Med* 9:300-306.
- Fukagawa T, Nogami M, Yoshikawa M, Ikeno M, Okazaki T, Takami Y, Nakayama T, Oshimura M. 2004. Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 6:784-791.
- Fuld S, Cunningham C, Klucher K, Davison AJ, Blackburn DJ. 2006. Inhibition of interferon signaling by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus full-length viral interferon regulatory factor 2 protein. *J Virol* 80:3092-3097.
- Gaidano G, Cechova K, Chang Y, Moore PS, Knowles DM, Dalla-Favera R. 1996. Establishment of AIDS-related lymphoma cell lines from lymphomatous effusions. *Leukemia* 10:1237-1240.
- Gao SJ, Boshoff C, Jayachandra S, Weiss RA, Chang Y, Moore PS. 1997. KSHV ORF K9 (vIRF) is an oncogene which inhibits the interferon signaling pathway. *Oncogene* 15:1979-1985.
- Gao SJ, Kingsley L, Hoover DR, Spira TJ, Rinaldo CR, Saah A, Phair J, Detels R, Parry P, Chang Y, Moore PS. 1996. Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 335:233-241.
- Garber AC, Hu J, Renne R. 2002. Latency-associated nuclear antigen (LANA) cooperatively binds to two sites within the terminal repeat, and both sites contribute to the ability of LANA to suppress transcription and to facilitate DNA replication. *J Biol Chem* 277:27401-27411.
- Garzon R, Croce CM. 2008. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 15:352-358.
- Gewurz BE, Gaudet R, Tortorella D, Wang EW, Ploegh HL, Wiley DC. 2001. Antigen presentation subverted: Structure of the human cytomegalovirus protein US2 bound to the class I molecule HLA-A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6794-6799.
- Ghildiyal M, Zamore PD. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 10:94-108.
- Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, Schier AF.

2006. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312:75-79.
- Godden-Kent D, Talbot SJ, Boshoff C, Chang Y, Moore P, Weiss RA, Mittnacht S. 1997. The cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stimulates cdk6 to phosphorylate the retinoblastoma protein and histone H1. *J Virol* 71:4193-4198.
- Gottwein E, Cullen BR. 2010. A human herpesvirus microRNA inhibits p21 expression and attenuates p21-mediated cell cycle arrest. *J Virol* 84:5229-5237.
- Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, Frenzel C, Majoros WH, Chi JT, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Ohler U, Cullen BR. 2007. A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* 450:1096-1099.
- Goudsmit J, Renwick N, Dukers NH, Coutinho RA, Heisterkamp S, Bakker M, Schulz TF, Cornelissen M, Weverling GJ. 2000. Human herpesvirus 8 infections in the Amsterdam Cohort Studies (1984-1997): analysis of seroconversions to ORF65 and ORF73. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4838-4843.
- Gradoville L, Gerlach J, Grogan E, Shedd D, Nikiforow S, Metroka C, Miller G. 2000. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50/Rta protein activates the entire viral lytic cycle in the HH-B2 primary effusion lymphoma cell line. *J Virol* 74:6207-6212.
- Greene W, Kuhne K, Ye F, Chen J, Zhou F, Lei X, Gao SJ. 2007. Molecular biology of KSHV in relation to AIDS-associated oncogenesis. *Cancer Treat Res* 133:69-127.
- Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123:631-640.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432:235-240.
- Grey F, Meyers H, White EA, Spector DH, Nelson J. 2007. A human cytomegalovirus-encoded microRNA regulates expression of multiple viral genes involved in replication. *PLoS Pathog* 3:e163.
- Griffin BD, Verweij MC, Wiertz EJ. 2010. Herpesviruses and immunity: the art of evasion. *Vet Microbiol* 143:89-100.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36:D154-158.
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106:23-34.
- Grossmann C, Ganem D. 2008. Effects of NFkappaB activation on KSHV latency and lytic reactivation are complex and context-dependent. *Virology* 375:94-102.
- Grossmann C, Podgrabinska S, Skobe M, Ganem D. 2006. Activation of NF-kappaB by the latent vFLIP gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is required for the spindle shape of virus-infected endothelial cells and contributes to their proinflammatory phenotype. *J Virol* 80:7179-7185.
- Grundhoff A, Ganem D. 2001. Mechanisms governing expression of the v-FLIP gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 75:1857-1863.
- Grundhoff A, Ganem D. 2003. The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus permits replication of terminal repeat-containing plasmids. *J Virol* 77:2779-2783.
- Grundhoff A, Ganem D. 2004. Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis. *J Clin Invest* 113:124-136.
- Grundhoff A, Sullivan CS, Ganem D. 2006. A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. *Rna* 12:733-750.
- Gu S, Jin L, Zhang F, Sarnow P, Kay MA. 2009. Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 16:144-150.
- Gunther T, Grundhoff A. 2010. The epigenetic landscape of latent Kaposi sarcoma-associated herpesvirus genomes. *PLoS Pathog* 6:e1000935.
- Gwack Y, Byun H, Hwang S, Lim C, Choe J. 2001. CREB-binding protein and histone deacetylase regulate the transcriptional activity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50. *J Virol* 75:1909-1917.
- Gwack Y, Hwang S, Lim C, Won YS, Lee CH, Choe J. 2002. Kaposi's Sarcoma-associated

- herpesvirus open reading frame 50 stimulates the transcriptional activity of STAT3. *J Biol Chem* 277:6438-6442.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18:3016-3027.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125:887-901.
- Han J, Pedersen JS, Kwon SC, Belair CD, Kim YK, Yeom KH, Yang WY, Haussler D, Blelloch R, Kim VN. 2009. Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* 136:75-84.
- Han Z, Swaminathan S. 2006. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic gene ORF57 is essential for infectious virion production. *J Virol* 80:5251-5260.
- Hanahan D, Folkman J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-364.
- Hansen A, Boshoff C, Lagos D. 2007. Kaposi sarcoma as a model of oncogenesis and cancer treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 7:211-220.
- Harfe BD, McManus MT, Mansfield JH, Hornstein E, Tabin CJ. 2005. The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10898-10903.
- Hendrickson DG, Hogan DJ, Herschlag D, Ferrell JE, Brown PO. 2008. Systematic identification of mRNAs recruited to argonaute 2 by specific microRNAs and corresponding changes in transcript abundance. *PLoS One* 3:e2126.
- Herndier BG, Werner A, Arnstein P, Abbey NW, Demartis F, Cohen RL, Shuman MA, Levy JA. 1994. Characterization of a human Kaposi's sarcoma cell line that induces angiogenic tumors in animals. *Aids* 8:575-581.
- Holcik M. 2003. Translational upregulation of the X-linked inhibitor of apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 1010:249-258.
- Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. 2006. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 25:349-360.
- Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. 1992. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267:26031-26037.
- Hu J, Garber AC, Renne R. 2002. The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus supports latent DNA replication in dividing cells. *J Virol* 76:11677-11687.
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293:834-838.
- Ibanez-Ventoso C, Vora M, Driscoll M. 2008. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS One* 3:e2818.
- Ishido S, Choi JK, Lee BS, Wang C, DeMaria M, Johnson RP, Cohen GB, Jung JU. 2000. Inhibition of natural killer cell-mediated cytotoxicity by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protein. *Immunity* 13:365-374.
- Jenner RG, Alba MM, Boshoff C, Kellam P. 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent and lytic gene expression as revealed by DNA arrays. *J Virol* 75:891-902.
- Jeong J, Papin J, Dittmer D. 2001. Differential regulation of the overlapping Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vGCR (orf74) and LANA (orf73) promoters. *J Virol* 75:1798-1807.
- Jeong JH, Orvis J, Kim JW, McMurtrey CP, Renne R, Dittmer DP. 2004. Regulation and autoregulation of the promoter for the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Biol Chem* 279:16822-16831.
- Jessup JM. 1994. Role of urokinase, its receptor, and serpins in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 107:1555-1559.
- Joo CH, Shin YC, Gack M, Wu L, Levy D, Jung JU. 2007. Inhibition of interferon regulatory factor 7 (IRF7)-mediated interferon signal transduction by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral IRF homolog vIRF3. *J Virol* 81:8282-8292.
- Jung YS, Qian Y, Chen X. 2010. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal* 22:1003-1012.

- Kaleeba JA, Berger EA. 2006. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus fusion-entry receptor: cystine transporter xCT. *Science* 311:1921-1924.
- Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM, Rajewsky K. 2005. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 19:489-501.
- Karginov FV, Conaco C, Xuan Z, Schmidt BH, Parker JS, Mandel G, Hannon GJ. 2007. A biochemical approach to identifying microRNA targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19291-19296.
- Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T. 2000. Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma, and multicentric Castlemann's disease. *Virology* 269:335-344.
- Kedes DH, Lagunoff M, Renne R, Ganem D. 1997. Identification of the gene encoding the major latency-associated nuclear antigen of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Clin Invest* 100:2606-2610.
- Kedes DH, Operskalski E, Busch M, Kohn R, Flood J, Ganem D. 1996. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nat Med* 2:918-924.
- Keene JD, Komisarow JM, Friedersdorf MB. 2006. RIP-Chip: the isolation and identification of mRNAs, microRNAs and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts. *Nat Protoc* 1:302-307.
- Kellam P, Boshoff C, Whitby D, Matthews S, Weiss RA, Talbot SJ. 1997. Identification of a major latent nuclear antigen, LNA-1, in the human herpesvirus 8 genome. *J Hum Virol* 1:19-29.
- Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15:2654-2659.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115:209-216.
- Kim VN. 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:376-385.
- Kim YK, Kim VN. 2007. Processing of intronic microRNAs. *Embo J* 26:775-783.
- Kloosterman WP, Wienholds E, Ketting RF, Plasterk RH. 2004. Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic Acids Res* 32:6284-6291.
- Koelle DM, Huang ML, Chandran B, Vieira J, Piepkorn M, Corey L. 1997. Frequent detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in saliva of human immunodeficiency virus-infected men: clinical and immunologic correlates. *J Infect Dis* 176:94-102.
- Koralov SB, Muljo SA, Galler GR, Krek A, Chakraborty T, Kanellopoulou C, Jensen K, Cobb BS, Merkenschlager M, Rajewsky N, Rajewsky K. 2008. Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell* 132:860-874.
- Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. 2005. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37:495-500.
- Krithivas A, Young DB, Liao G, Greene D, Hayward SD. 2000. Human herpesvirus 8 LANA interacts with proteins of the mSin3 corepressor complex and negatively regulates Epstein-Barr virus gene expression in dually infected PEL cells. *J Virol* 74:9637-9645.
- Kronick MN. 2004. Creation of the whole human genome microarray. *Expert Rev Proteomics* 1:19-28.
- Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. 2005. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438:685-689.
- Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. 2007. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* 101:59-68.
- Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. 2007. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 39:673-677.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lai EC. 2004. Predicting and validating microRNA targets. *Genome Biol* 5:115.
- Lan K, Kuppers DA, Robertson ES. 2005a. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reactivation is regulated by interaction of latency-associated nuclear antigen with

- recombination signal sequence-binding protein Jkappa, the major downstream effector of the Notch signaling pathway. *J Virol* 79:3468-3478.
- Lan K, Kuppers DA, Verma SC, Robertson ES. 2004. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen inhibits lytic replication by targeting Rta: a potential mechanism for virus-mediated control of latency. *J Virol* 78:6585-6594.
- Lan K, Kuppers DA, Verma SC, Sharma N, Murakami M, Robertson ES. 2005b. Induction of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen by the lytic transactivator RTA: a novel mechanism for establishment of latency. *J Virol* 79:7453-7465.
- Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. 2004. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* 14:2162-2167.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415-419.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J* 21:4663-4670.
- Lei X, Bai Z, Ye F, Xie J, Kim CG, Huang Y, Gao SJ. 2010. Regulation of NF-kappaB inhibitor Ikbalpha and viral replication by a KSHV microRNA. *Nat Cell Biol* 12:193-199.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15-20.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115:787-798.
- Lewis JD, Payton LA, Whitford JG, Byrne JA, Smith DI, Yang L, Bright RK. 2007. Induction of tumorigenesis and metastasis by the murine orthologue of tumor protein D52. *Mol Cancer Res* 5:133-144.
- Li H, Wang H, Nicholas J. 2001. Detection of direct binding of human herpesvirus 8-encoded interleukin-6 (vIL-6) to both gp130 and IL-6 receptor (IL-6R) and identification of amino acid residues of vIL-6 important for IL-6R-dependent and -independent signaling. *J Virol* 75:3325-3334.
- Li M, Lee H, Yoon DW, Albrecht JC, Fleckenstein B, Neipel F, Jung JU. 1997. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *J Virol* 71:1984-1991.
- Li Q, Zhou F, Ye F, Gao SJ. 2008. Genetic disruption of KSHV major latent nuclear antigen LANA enhances viral lytic transcriptional program. *Virology* 379:234-244.
- Liang Y, Chang J, Lynch SJ, Lukac DM, Ganem D. 2002. The lytic switch protein of KSHV activates gene expression via functional interaction with RBP-Jkappa (CSL), the target of the Notch signaling pathway. *Genes Dev* 16:1977-1989.
- Liang Y, Ganem D. 2003. Lytic but not latent infection by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus requires host CSL protein, the mediator of Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8490-8495.
- Liang Y, Ganem D. 2004. RBP-J (CSL) is essential for activation of the K14/vGPCR promoter of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by the lytic switch protein RTA. *J Virol* 78:6818-6826.
- Lijnen HR, Van Hoef B, Nelles L, Holmes WE, Collen D. 1988. Enzymatic properties of single-chain and two-chain forms of a Lys158----Glu158 mutant of urokinase-type plasminogen activator. *Eur J Biochem* 172:185-188.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433:769-773.
- Lin K, Dai CY, Ricciardi RP. 1998. Cloning and functional analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA polymerase and its processivity factor. *J Virol* 72:6228-6232.
- Lin R, Genin P, Mamane Y, Sgarbanti M, Battistini A, Harrington WJ, Jr., Barber GN, Hiscott J. 2001. HHV-8 encoded vIRF-1 represses the interferon antiviral response by blocking IRF-3 recruitment of the CBP/p300 coactivators. *Oncogene* 20:800-811.
- Lin SF, Robinson DR, Miller G, Kung HJ. 1999. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a bZIP protein with homology to BZLF1 of Epstein-Barr virus. *J Virol* 73:1909-1917.

- Lin YT, Kincaid RP, Arasappan D, Dowd SE, Hunicke-Smith SP, Sullivan CS. 2010. Small RNA profiling reveals antisense transcription throughout the KSHV genome and novel small RNAs. *Rna*.
- Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M. 2004. Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat Struct Mol Biol* 11:576-577.
- Liu L, Eby MT, Rathore N, Sinha SK, Kumar A, Chaudhary PM. 2002. The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the I κ B kinase complex. *J Biol Chem* 277:13745-13751.
- Liu X, Park JK, Jiang F, Liu Y, McKearin D, Liu Q. 2007. Dicer-1, but not Loquacious, is critical for assembly of miRNA-induced silencing complexes. *Rna* 13:2324-2329.
- Liu Y, Cao Y, Liang D, Gao Y, Xia T, Robertson ES, Lan K. 2008. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA activates the processivity factor ORF59 through interaction with RBP-J κ and a cis-acting RTA responsive element. *Virology* 380:264-275.
- Long D, Lee R, Williams P, Chan CY, Ambros V, Ding Y. 2007. Potent effect of target structure on microRNA function. *Nat Struct Mol Biol* 14:287-294.
- Louis N, Eveleigh C, Graham FL. 1997. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* 233:423-429.
- Low W, Harries M, Ye H, Du MQ, Boshoff C, Collins M. 2001. Internal ribosome entry site regulates translation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus FLICE inhibitory protein. *J Virol* 75:2938-2945.
- Lu F, Day L, Gao SJ, Lieberman PM. 2006. Acetylation of the latency-associated nuclear antigen regulates repression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic transcription. *J Virol* 80:5273-5282.
- Lu F, Stedman W, Yousef M, Renne R, Lieberman PM. 2010. Epigenetic regulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency by virus-encoded microRNAs that target Rta and the cellular Rbl2-DNMT pathway. *J Virol* 84:2697-2706.
- Lu F, Zhou J, Wiedmer A, Madden K, Yuan Y, Lieberman PM. 2003. Chromatin remodeling of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF50 promoter correlates with reactivation from latency. *J Virol* 77:11425-11435.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834-838.
- Lukac DM, Kirshner JR, Ganem D. 1999. Transcriptional activation by the product of open reading frame 50 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is required for lytic viral reactivation in B cells. *J Virol* 73:9348-9361.
- Lukac DM, Renne R, Kirshner JR, Ganem D. 1998. Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection from latency by expression of the ORF 50 transactivator, a homolog of the EBV R protein. *Virology* 252:304-312.
- Luna RE, Zhou F, Baghian A, Chouljenko V, Forghani B, Gao SJ, Kousoulas KG. 2004. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus glycoprotein K8.1 is dispensable for virus entry. *J Virol* 78:6389-6398.
- Lund E, Guttlinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303:95-98.
- Lundquist A, Barre B, Bienvenu F, Hermann J, Avril S, Coqueret O. 2003. Kaposi sarcoma-associated viral cyclin K overrides cell growth inhibition mediated by oncostatin M through STAT3 inhibition. *Blood* 101:4070-4077.
- Luppi M, Barozzi P, Santagostino G, Trovato R, Schulz TF, Marasca R, Bottalico D, Bignardi L, Torelli G. 2000. Molecular evidence of organ-related transmission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus or human herpesvirus-8 in transplant patients. *Blood* 96:3279-3281.
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. 2007. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:9667-9672.
- Ma E, MacRae IJ, Kirsch JF, Doudna JA. 2008. Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *J Mol Biol* 380:237-243.
- Ma E, MacRae IJ, Kirsch JF, Doudna JA. 2008. Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *J Mol Biol* 380:237-243.
- Maas D, Maret C, Schaade L, Scheithauer S, Ritter K, Kleines M. 2006. Reactivation of the Epstein-Barr virus from viral latency by an S-adenosylhomocysteine hydrolase/14-3-3 zeta/PLA2-dependent pathway. *Med Microbiol Immunol* 195:217-223.

- Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna JA. 2006. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311:195-198.
- Malek RL, Irby RB, Guo QM, Lee K, Wong S, He M, Tsai J, Frank B, Liu ET, Quackenbush J, Jove R, Yeatman TJ, Lee NH. 2002. Identification of Src transformation fingerprint in human colon cancer. *Oncogene* 21:7256-7265.
- Malope BI, MacPhail P, Mbisa G, MacPhail C, Stein L, Ratshikhopha EM, Ndhlovu L, Sitas F, Whitby D. 2008. No evidence of sexual transmission of Kaposi's sarcoma herpes virus in a heterosexual South African population. *Aids* 22:519-526.
- Malope BI, Pfeiffer RM, Mbisa G, Stein L, Ratshikhopha EM, O'Connell DL, Sitas F, MacPhail P, Whitby D. 2007. Transmission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus between mothers and children in a South African population. *J Acquir Immune Defic Syndr* 44:351-355.
- Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Wasi S, Mazzieri R, Mignatti P, Pepper MS. 1995. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 270:9709-9716.
- Martin D, Gutkind JS. 2008. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene* 27 Suppl 2:S31-42.
- Martin JN, Ganem DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D, Kedes DH. 1998. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *N Engl J Med* 338:948-954.
- Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. 2007. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317:1764-1767.
- Mayama S, Cuevas LE, Sheldon J, Omar OH, Smith DH, Okong P, Silvel B, Hart CA, Schulz TF. 1998. Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents. *Int J Cancer* 77:817-820.
- Mbisa GL, Miley W, Gamache CJ, Gillette WK, Esposito D, Hopkins R, Busch MP, Schreiber GB, Little RF, Yarchoan R, Ortiz-Conde BA, Labo N, Whitby D. 2010. Detection of antibodies to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: a new approach using K8.1 ELISA and a newly developed recombinant LANA ELISA. *J Immunol Methods* 356:39-46.
- McColl BK, Baldwin ME, Roufai S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG. 2003. Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med* 198:863-868.
- McCormick C, Ganem D. 2006. Phosphorylation and function of the kaposin B direct repeats of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 80:6165-6170.
- Meister G, Tuschl T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431:343-349.
- Melbye M, Cook PM, Hjalgrim H, Begtrup K, Simpson GR, Biggar RJ, Ebbesen P, Schulz TF. 1998. Risk factors for Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) seropositivity in a cohort of homosexual men, 1981-1996. *Int J Cancer* 77:543-548.
- Menten P, Wuyts A, Van Damme J. 2002. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:455-481.
- Miller G, Heston L, Grogan E, Gradoville L, Rigsby M, Sun R, Shedd D, Kushnaryov VM, Grossberg S, Chang Y. 1997. Selective switch between latency and lytic replication of Kaposi's sarcoma herpesvirus and Epstein-Barr virus in dually infected body cavity lymphoma cells. *J Virol* 71:314-324.
- Mohanam S, Go Y, Sawaya R, Venkaiah B, Mohan PM, Kouraklis GP, Gokaslan ZL, Lagos GK, Rao JS. 1999. Elevated levels of urokinase-type plasminogen activator and its receptor during tumor growth in vivo. *Int J Oncol* 14:169-174.
- Molden J, Chang Y, You Y, Moore PS, Goldsmith MA. 1997. A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded cytokine homolog (vIL-6) activates signaling through the shared gp130 receptor subunit. *J Biol Chem* 272:19625-19631.
- Monini P, Colombini S, Sturzl M, Goletti D, Cafaro A, Sgadari C, Butto S, Franco M, Leone P, Fais S, Leone P, Melucci-Vigo G, Chiozzini C, Carlini F, Ascherl G, Cornali E, Zietz C, Ramazzotti E, Ensoli F, Andreoni M, Pezzotti P, Rezza G, Yarchoan R, Gallo RC, Ensoli B. 1999. Reactivation and persistence of human herpesvirus-8 infection in B cells and monocytes by Th-1 cytokines increased in Kaposi's sarcoma. *Blood* 93:4044-4058.

- Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, Prabhu AL, Zhao Y, McDonald H, Zeng T, Hirst M, Eaves CJ, Marra MA. 2008. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res* 18:610-621.
- Morrison DK. 2009. The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* 19:16-23.
- Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY. 2004. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* 13:1435-1448.
- Muljo SA, Ansel KM, Kanellopoulou C, Livingston DM, Rao A, Rajewsky K. 2005. Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J Exp Med* 202:261-269.
- Munday AD, Berndt MC, Mitchell CA. 2000. Phosphoinositide 3-kinase forms a complex with platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex and 14-3-3zeta. *Blood* 96:577-584.
- Muralidhar S, Pumfery AM, Hassani M, Sadaie MR, Kishishita M, Brady JN, Doniger J, Medveczky P, Rosenthal LJ. 1998. Identification of kaposin (open reading frame K12) as a human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) transforming gene. *J Virol* 72:4980-4988.
- Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, Cheloufi S, Hannon GJ. 2005. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12135-12140.
- Murphy E, Vanicek J, Robins H, Shenk T, Levine AJ. 2008. Suppression of immediate-early viral gene expression by herpesvirus-coded microRNAs: implications for latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5453-5458.
- Mutlu AD, Cavallin LE, Vincent L, Chiozzini C, Eroles P, Duran EM, Asgari Z, Hooper AT, La Perle KM, Hilsher C, Gao SJ, Dittmer DP, Rafii S, Mesri EA. 2007. In vivo-restricted and reversible malignancy induced by human herpesvirus-8 KSHV: a cell and animal model of virally induced Kaposi's sarcoma. *Cancer Cell* 11:245-258.
- 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.
- Nair V, Zavolan M. 2006. Virus-encoded microRNAs: novel regulators of gene expression. *Trends Microbiol* 14:169-175.
- Nakamura H, Lu M, Gwack Y, Souvlis J, Zeichner SL, Jung JU. 2003. Global changes in Kaposi's sarcoma-associated virus gene expression patterns following expression of a tetracycline-inducible Rta transactivator. *J Virol* 77:4205-4220.
- Nakata S, Ito K, Fujimori M, Shingu K, Kajikawa S, Adachi W, Matsuyama I, Tsuchiya S, Kuwano M, Amano J. 1998. Involvement of vascular endothelial growth factor and urokinase-type plasminogen activator receptor in microvessel invasion in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 79:179-186.
- Naranatt PP, Krishnan HH, Svojanovsky SR, Bloomer C, Mathur S, Chandran B. 2004. Host gene induction and transcriptional reprogramming in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8)-infected endothelial, fibroblast, and B cells: insights into modulation events early during infection. *Cancer Res* 64:72-84.
- Neipel F, Albrecht JC, Fleckenstein B. 1997. Cell-homologous genes in the Kaposi's sarcoma-associated rhadinovirus human herpesvirus 8: determinants of its pathogenicity? *J Virol* 71:4187-4192.
- Newton R, Ziegler J, Bourbouli D, Casabonne D, Beral V, Mbidde E, Carpenter L, Reeves G, Parkin DM, Wabinga H, Mbulaiteye S, Jaffe H, Weiss R, Boshoff C. 2003. The sero-epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in adults with cancer in Uganda. *Int J Cancer* 103:226-232.
- Nishimura K, Ueda K, Guwanan E, Sakakibara S, Do E, Osaki E, Yada K, Okuno T, Yamanishi K. 2004. A posttranscriptional regulator of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with RNA-binding protein PCBP1 and controls gene expression through the IRES. *Virology* 325:364-378.
- Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT, Lai EC. 2008. The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol* 15:354-363.
- Orenstein JM, Alkan S, Blauvelt A, Jeang KT, Weinstein MD, Ganem D, Herndier B. 1997. Visualization of human herpesvirus type 8 in Kaposi's sarcoma by light and transmission electron microscopy. *Aids* 11:F35-45.
- Orom UA, Nielsen FC, Lund AH. 2008. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein

- mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 30:460-471.
- O'Rourke JR, Georges SA, Seay HR, Tapscott SJ, McManus MT, Goldhamer DJ, Swanson MS, Harfe BD. 2007. Essential role for Dicer during skeletal muscle development. *Dev Biol* 311:359-368.
- Osborne J, Moore PS, Chang Y. 1999. KSHV-encoded viral IL-6 activates multiple human IL-6 signaling pathways. *Hum Immunol* 60:921-927.
- Park JE, Keller GA, Ferrara N. 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4:1317-1326.
- Parker JS, Roe SM, Barford D. 2004. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *Embo J* 23:4727-4737.
- Parker JS, Roe SM, Barford D. 2005. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 434:663-666.
- Parravicini C, Chandran B, Corbellino M, Berti E, Paulli M, Moore PS, Chang Y. 2000. Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *Am J Pathol* 156:743-749.
- Pauk J, Huang ML, Brodie SJ, Wald A, Koelle DM, Schacker T, Celum C, Selke S, Corey L. 2000. Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med* 343:1369-1377.
- Pedersen JS, Bejerano G, Siepel A, Rosenbloom K, Lindblad-Toh K, Lander ES, Kent J, Miller W, Haussler D. 2006. Identification and classification of conserved RNA secondary structures in the human genome. *PLoS Comput Biol* 2:e33.
- Peng L, Wu TT, Tchieu JH, Feng J, Brown HJ, Feng J, Li X, Qi J, Deng H, Vivanco I, Mellinghoff IK, Jamieson C, Sun R. 2010. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway enhances gamma-2 herpesvirus lytic replication and facilitates reactivation from latency. *J Gen Virol* 91:463-469.
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. 1991. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181:902-906.
- Persson LM, Wilson AC. 2010. Wide-scale use of Notch signaling factor CSL/RBP-Jkappa in RTA-mediated activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic genes. *J Virol* 84:1334-1347.
- Petersen LC, Lund LR, Nielsen LS, Dano K, Skriver L. 1988. One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no intrinsic activity. *J Biol Chem* 263:11189-11195.
- Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grasser FA, van Dyk LF, Ho CK, Shuman S, Chien M, Russo JJ, Ju J, Randall G, Lindenbach BD, Rice CM, Simon V, Ho DD, Zavolan M, Tuschl T. 2005. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2:269-276.
- Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T. 2004. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304:734-736.
- Plekhanova OS, Stepanova VV, Ratner EI, Bobik A, Tkachuk VA, Parfyonova YV. 2006. Urokinase plasminogen activator in injured adventitia increases the number of myofibroblasts and augments early proliferation. *J Vasc Res* 43:437-446.
- Poliakov A, Tkachuk V, Ovchinnikova T, Potapenko N, Bagryantsev S, Stepanova V. 2001. Plasmin-dependent elimination of the growth-factor-like domain in urokinase causes its rapid cellular uptake and degradation. *Biochem J* 355:639-645.
- Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, Tibshirani R, Botstein D, Borresen-Dale AL, Brown PO. 2002. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12963-12968.
- Prang N, Wolf H, Schwarzmann F. 1995. Epstein-Barr virus lytic replication is controlled by posttranscriptional negative regulation of BZLF1. *J Virol* 69:2644-2648.
- Prang N, Wolf H, Schwarzmann F. 1999. Latency of Epstein-Barr virus is stabilized by antisense-mediated control of the viral immediate-early gene BZLF-1. *J Med Virol* 59:512-519.
- Qin Z, Freitas E, Sullivan R, Mohan S, Bacelieri R, Branch D, Romano M, Kearney P, Oates J, Plaisance K, Renne R, Kaleeba J, Parsons C. 2010. Upregulation of xCT by KSHV-

- encoded microRNAs facilitates KSHV dissemination and persistence in an environment of oxidative stress. *PLoS Pathog* 6:e1000742.
- Raab MS, Albrecht JC, Birkmann A, Yaguboglu S, Lang D, Fleckenstein B, Neipel F. 1998. The immunogenic glycoprotein gp35-37 of human herpesvirus 8 is encoded by open reading frame K8.1. *J Virol* 72:6725-6731.
- Rabkin CS, Janz S, Lash A, Coleman AE, Musaba E, Liotta L, Biggar RJ, Zhuang Z. 1997. Monoclonal origin of multicentric Kaposi's sarcoma lesions. *N Engl J Med* 336:988-993.
- Radkov SA, Kellam P, Boshoff C. 2000. The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat Med* 6:1121-1127.
- Rainbow L, Platt GM, Simpson GR, Sarid R, Gao SJ, Stoiber H, Herrington CS, Moore PS, Schulz TF. 1997. The 222- to 234-kilodalton latent nuclear protein (LNA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) is encoded by orf73 and is a component of the latency-associated nuclear antigen. *J Virol* 71:5915-5921.
- Rappocciolo G, Hensler HR, Jais M, Reinhart TA, Pegu A, Jenkins FJ, Rinaldo CR. 2008. Human herpesvirus 8 infects and replicates in primary cultures of activated B lymphocytes through DC-SIGN. *J Virol* 82:4793-4806.
- Rehwinkel J, Natalin P, Stark A, Brennecke J, Cohen SM, Izaurralde E. 2006. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by Drosha and Argonaute proteins in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 26:2965-2975.
- Reinhart BJ, Bartel DP. 2002. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* 297:1831.
- Renne R, Blackbourn D, Whitby D, Levy J, Ganem D. 1998. Limited transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *J Virol* 72:5182-5188.
- Renne R, Fouillet X, Maurer J, Assaad A, Morgan K, Ha F, Nikula K, Gillet N, Copley M. 2001. Recommendation of optimal method for formalin fixation of rodent lungs in routine toxicology studies. *Toxicol Pathol* 29:587-589.
- Renne R, Zhong W, Herndier B, McGrath M, Abbey N, Kedes D, Ganem D. 1996. Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat Med* 2:342-346.
- Renwick N, Halaby T, Weverling GJ, Dukers NH, Simpson GR, Coutinho RA, Lange JM, Schulz TF, Goudsmit J. 1998. Seroconversion for human herpesvirus 8 during HIV infection is highly predictive of Kaposi's sarcoma. *Aids* 12:2481-2488.
- Rigoutsos I. 2009. New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer Res* 69:3245-3248.
- Rivas C, Thlick AE, Parravicini C, Moore PS, Chang Y. 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA2 is a B-cell-specific latent viral protein that inhibits p53. *J Virol* 75:429-438.
- Rivas C, Thlick AE, Parravicini C, Moore PS, Chang Y. 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA2 is a B-cell-specific latent viral protein that inhibits p53. *J Virol* 75:429-438.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14:1902-1910.
- Rubin MA, Varambally S, Beroukheim R, Tomlins SA, Rhodes DR, Paris PL, Hofer MD, Storz-Schweizer M, Kuefer R, Fletcher JA, Hsi BL, Byrne JA, Pienta KJ, Collins C, Sellers WR, Chinnaiyan AM. 2004. Overexpression, amplification, and androgen regulation of TPD52 in prostate cancer. *Cancer Res* 64:3814-3822.
- Rundhaug JE. 2003. Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and cancer: commentary re: A. C. Lockhart et al., Reduction of wound angiogenesis in patients treated with BMS-275291, a broad spectrum matrix metalloproteinase inhibitor. *Clin. Cancer Res.*, 9: 00-00, 2003. *Clin Cancer Res* 9:551-554.
- Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, Parry JP, Peruzzi D, Edelman IS, Chang Y, Moore PS. 1996. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14862-14867.
- Sadagopan S, Sharma-Walia N, Veetil MV, Bottero V, Levine R, Vart RJ, Chandran B. 2009. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus upregulates angiogenin during infection of human dermal microvascular endothelial cells, which induces 45S rRNA synthesis, antiapoptosis, cell proliferation, migration, and angiogenesis. *J Virol* 83:3342-3364.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988.

- Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Sakakibara S, Pise-Masison CA, Brady JN, Tosato G. 2009. Gene regulation and functional alterations induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded ORFK13/vFLIP in endothelial cells. *J Virol* 83:2140-2153.
- Sakakibara S, Ueda K, Chen J, Okuno T, Yamanishi K. 2001. Octamer-binding sequence is a key element for the autoregulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF50/Lyta gene expression. *J Virol* 75:6894-6900.
- Samols MA, Hu J, Skalsky RL, Renne R. 2005. Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 79:9301-9305.
- Samols MA, Skalsky RL, Maldonado AM, Riva A, Lopez MC, Baker HV, Renne R. 2007. Identification of cellular genes targeted by KSHV-encoded microRNAs. *PLoS Pathog* 3:e65.
- Sand M, Gambichler T, Skrygan M, Sand D, Scola N, Altmeyer P, Bechara FG. 2010. Expression levels of the microRNA processing enzymes Drosha and Dicer in epithelial skin cancer. *Cancer Invest* 28:649-653.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199-208.
- Segouffin C, Gruffat H, Sergeant A. 1996. Repression by RAZ of Epstein-Barr virus bZIP transcription factor EB1 is dimerization independent. *J Gen Virol* 77 (Pt 7):1529-1536.
- Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455:58-63.
- Seo T, Park J, Lee D, Hwang SG, Choe J. 2001. Viral interferon regulatory factor 1 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus binds to p53 and represses p53-dependent transcription and apoptosis. *J Virol* 75:6193-6198.
- Seo T, Park J, Lim C, Choe J. 2004. Inhibition of nuclear factor kappaB activity by viral interferon regulatory factor 3 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Oncogene* 23:6146-6155.
- Serraino D, Cerimele D, Piselli P, Aztori L, Farchi F, Carletti F, Navarra A, Masala MV, Rezza G. 2006. Infection with human herpesvirus type 8 and Kaposi's sarcoma in Sardinia. *Infection* 34:39-42.
- Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM. 2006. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome* 17:189-202.
- Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, Collins PJ, de Longueville F. 2006. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 24:1151-1161.
- Simpson GR, Schulz TF, Whitby D, Cook PM, Boshoff C, Rainbow L, Howard MR, Gao SJ, Bohenzky RA, Simmonds P, Lee C, de Ruiter A, Hatzakis A, Tedder RS, Weller IV, Weiss RA, Moore PS. 1996. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* 348:1133-1138.
- Sitas F, Carrara H, Beral V, Newton R, Reeves G, Bull D, Jentsch U, Pacella-Norman R, Bourboulia D, Whitby D, Boshoff C, Weiss R. 1999. Antibodies against human herpesvirus 8 in black South African patients with cancer. *N Engl J Med* 340:1863-1871.
- Sivakumar R, Sharma-Walia N, Raghu H, Veetil MV, Sadagopan S, Bottero V, Varga L, Levine R, Chandran B. 2008. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces sustained levels of vascular endothelial growth factors A and C early during in vitro infection of human microvascular dermal endothelial cells: biological implications. *J Virol* 82:1759-1776.
- Skalsky RL, Samols MA, Plaisance KB, Boss IW, Riva A, Lopez MC, Baker HV, Renne R. 2007. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155. *J Virol* 81:12836-12845.
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR. 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5:834-839.
- Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, Hannon GJ, Joshua-Tor L. 2003. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding

- motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 10:1026-1032.
- Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, Cacoub P, Cazals-Hatem D, Babinet P, d'Agay MF, Clauvel JP, Raphael M, Degos L, et al. 1995. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemann's disease. *Blood* 86:1276-1280.
- Stark A, Bushati N, Jan CH, Kheradpour P, Hodges E, Brennecke J, Bartel DP, Cohen SM, Kellis M. 2008. A single Hox locus in Drosophila produces functional microRNAs from opposite DNA strands. *Genes Dev* 22:8-13.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227-264.
- Staskus KA, Zhong W, Gebhard K, Herndier B, Wang H, Renne R, Beneke J, Pudney J, Anderson DJ, Ganem D, Haase AT. 1997. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *J Virol* 71:715-719.
- Stepanova V, Lebedeva T, Kuo A, Yarovoi S, Tkachuk S, Zaitsev S, Bdeir K, Dumler I, Marks MS, Parfyonova Y, Tkachuk VA, Higazi AA, Cines DB. 2008. Nuclear translocation of urokinase-type plasminogen activator. *Blood* 112:100-110.
- Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmermann A, Wolf DG, Saleh N, Biton M, Horwitz E, Prokocimer Z, Prichard M, Hahn G, Goldman-Wohl D, Greenfield C, Yagel S, Hengel H, Altuvia Y, Margalit H, Mandelboim O. 2007. Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* 317:376-381.
- Stewart CK, Li J, Golovan SP. 2008. Adverse effects induced by short hairpin RNA expression in porcine fetal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 370:113-117.
- Stratigos JD, Potouridou I, Katoulis AC, Hatzilou E, Christofidou E, Stratigos A, Hatzakis A, Stavrianeas NG. 1997. Classic Kaposi's sarcoma in Greece: a clinico-epidemiological profile. *Int J Dermatol* 36:735-740.
- Sturzl M, Blasig C, Schreier A, Neipel F, Hohenadl C, Cornali E, Ascherl G, Esser S, Brockmeyer NH, Ekman M, Kaaya EE, Tschachler E, Biberfeld P. 1997. Expression of HHV-8 latency-associated T0.7 RNA in spindle cells and endothelial cells of AIDS-associated, classical and African Kaposi's sarcoma. *Int J Cancer* 72:68-71.
- Suda T, Katano H, Delsol G, Kakiuchi C, Nakamura T, Shiota M, Sata T, Higashihara M, Mori S. 2001. HHV-8 infection status of AIDS-unrelated and AIDS-associated multicentric Castlemann's disease. *Pathol Int* 51:671-679.
- Sullivan CS, Grundhoff A. 2007. Identification of viral microRNAs. *Methods Enzymol* 427:3-23.
- Sun R, Lin SF, Gradoville L, Yuan Y, Zhu F, Miller G. 1998. A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10866-10871.
- Swanton C, Mann DJ, Fleckenstein B, Neipel F, Peters G, Jones N. 1997. Herpes viral cyclin/Cdk6 complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins. *Nature* 390:184-187.
- Szekely L, Kiss C, Mattsson K, Kashuba E, Pokrovskaja K, Juhasz A, Holmvall P, Klein G. 1999. Human herpesvirus-8-encoded LNA-1 accumulates in heterochromatin-associated nuclear bodies. *J Gen Virol* 80 (Pt 11):2889-2900.
- Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, Hajkova P, Barton SC, Sun YA, Lee C, Tarakhovskiy A, Lao K, Surani MA. 2007. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev* 21:644-648.
- Temin HM, Mizutani S. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226:1211-1213.
- Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, Murphy A, Frenthewey D, Valenzuela D, Kutok JL, Schmidt-Suppran M, Rajewsky N, Yancopoulos G, Rao A, Rajewsky K. 2007. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 316:604-608.
- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J. 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386:517-521.
- Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. 2006. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* 20:2202-2207.
- Tiacci E, Orvietani PL, Bigerna B, Pucciarini A, Corthals GL, Pettrossi V, Martelli MP, Liso A, Benedetti R, Pacini R, Bolli N, Pileri S, Pulford K, Gambacorta M, Carbone A,

- Pasquarello C, Scherl A, Robertson H, Scirpi MT, Alunni-Bistocchi G, Binaglia L, Byrne JA, Falini B. 2005. Tumor protein D52 (TPD52): a novel B-cell/plasma-cell molecule with unique expression pattern and Ca(2+)-dependent association with annexin VI. *Blood* 105:2812-2820.
- Tkachuk V, Stepanova V, Little PJ, Bobik A. 1996. Regulation and role of urokinase plasminogen activator in vascular remodelling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:759-765.
- Triboulet R, Chang HM, Lapierre RJ, Gregory RI. 2009. Post-transcriptional control of DGCR8 expression by the Microprocessor. *Rna* 15:1005-1011.
- Tyler DM, Okamura K, Chung WJ, Hagen JW, Berezikov E, Hannon GJ, Lai EC. 2008. Functionally distinct regulatory RNAs generated by bidirectional transcription and processing of microRNA loci. *Genes Dev* 22:26-36.
- Tzivion G, Avruch J. 2002. 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 277:3061-3064.
- Umbach JL, Cullen BR. 2010. In-depth analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNA expression provides insights into the mammalian microRNA-processing machinery. *J Virol* 84:695-703.
- Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. 2008. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 454:780-783.
- Veetil MV, Sadagopan S, Sharma-Walia N, Wang FZ, Raghu H, Varga L, Chandran B. 2008. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus forms a multimolecular complex of integrins (alphaVbeta5, alphaVbeta3, and alpha3beta1) and CD98-xCT during infection of human dermal microvascular endothelial cells, and CD98-xCT is essential for the postentry stage of infection. *J Virol* 82:12126-12144.
- Ventura A, Meissner A, Dillon CP, McManus M, Sharp PA, Van Parijs L, Jaenisch R, Jacks T. 2004. Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10380-10385.
- Vieira J, O'Hearn P, Kimball L, Chandran B, Corey L. 2001. Activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) lytic replication by human cytomegalovirus. *J Virol* 75:1378-1386.
- Vieira J, O'Hearn PM. 2004. Use of the red fluorescent protein as a marker of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic gene expression. *Virology* 325:225-240.
- Vinther J, Hedegaard MM, Gardner PP, Andersen JS, Arctander P. 2006. Identification of miRNA targets with stable isotope labeling by amino acids in cell culture. *Nucleic Acids Res* 34:e107.
- Waerner T, Alacakaptan M, Tamir I, Oberauer R, Gal A, Brabletz T, Schreiber M, Jechlinger M, Beug H. 2006. ILE1: a cytokine essential for EMT, tumor formation, and late events in metastasis in epithelial cells. *Cancer Cell* 10:227-239.
- Walz N, Christalla T, Tessmer U, Grundhoff A. 2010. A global analysis of evolutionary conservation among known and predicted gammaherpesvirus microRNAs. *J Virol* 84:716-728.
- Wang AH, Gregoire S, Zika E, Xiao L, Li CS, Li H, Wright KL, Ting JP, Yang XJ. 2005. Identification of the ankyrin repeat proteins ANKRA and RFXANK as novel partners of class IIa histone deacetylases. *J Biol Chem* 280:29117-29127.
- Wang HW, Trotter MW, Lagos D, Bourbouli D, Henderson S, Makinen T, Elliman S, Flanagan AM, Alitalo K, Boshoff C. 2004. Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma. *Nat Genet* 36:687-693.
- Wang J, Zhang J, Zhang L, Harrington W, Jr., West JT, Wood C. 2005. Modulation of human herpesvirus 8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication and transcription activator transactivation by interferon regulatory factor 7. *J Virol* 79:2420-2431.
- Wang R, He H, Sun X, Xu J, Marshall FF, Zhou H, Chung LW, Fu H, He D. 2009. Transcription variants of the prostate-specific PrLZ gene and their interaction with 14-3-3 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 389:455-460.
- Wang R, Xu J, Saramaki O, Visakorpi T, Sutherland WM, Zhou J, Sen B, Lim SD, Mabweesh N, Amin M, Dong JT, Petros JA, Nelson PS, Marshall FF, Zhou HE, Chung LW. 2004b. PrLZ, a novel prostate-specific and androgen-responsive gene of the TPD52 family, amplified in chromosome 8q21.1 and overexpressed in human prostate cancer. *Cancer Res* 64:1589-1594.

- Wang SE, Wu FY, Fujimuro M, Zong J, Hayward SD, Hayward GS. 2003b. Role of CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) in activation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) lytic-cycle replication-associated protein (RAP) promoter in cooperation with the KSHV replication and transcription activator (RTA) and RAP. *J Virol* 77:600-623.
- Wang SE, Wu FY, Yu Y, Hayward GS. 2003a. CCAAT/enhancer-binding protein-alpha is induced during the early stages of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) lytic cycle reactivation and together with the KSHV replication and transcription activator (RTA) cooperatively stimulates the viral RTA, MTA, and PAN promoters. *J Virol* 77:9590-9612.
- Wang SE, Wu FY, Yu Y, Hayward GS. 2003c. CCAAT/enhancer-binding protein-alpha is induced during the early stages of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) lytic cycle reactivation and together with the KSHV replication and transcription activator (RTA) cooperatively stimulates the viral RTA, MTA, and PAN promoters. *J Virol* 77:9590-9612.
- Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blalock R. 2007. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet* 39:380-385.
- Waterman MJ, Stavridi ES, Waterman JL, Halazonetis TD. 1998. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* 19:175-178.
- Waterston A, Bower M. 2004. Fifty years of multicentric Castleman's disease. *Acta Oncol* 43:698-704.
- Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. 2008. A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther* 16:698-706.
- Weiss RA, Whitby D, Talbot S, Kellam P, Boshoff C. 1998. Human herpesvirus type 8 and Kaposi's sarcoma. *J Natl Cancer Inst Monogr*:51-54.
- Whitby D, Luppi M, Barozzi P, Boshoff C, Weiss RA, Torelli G. 1998. Human herpesvirus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy. *J Natl Cancer Inst* 90:395-397.
- Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. 1996. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem* 271:10079-10086.
- Wienholds E, Koudijs MJ, van Eeden FJ, Cuppen E, Plasterk RH. 2003. The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development. *Nat Genet* 35:217-218.
- Witwer KW, Sisk JM, Gama L, Clements JE. 2010. MicroRNA regulation of IFN-beta protein expression: rapid and sensitive modulation of the innate immune response. *J Immunol* 184:2369-2376.
- Wu H, Xu H, Miraglia LJ, Crooke ST. 2000. Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *J Biol Chem* 275:36957-36965.
- Wu L, Fan J, Belasco JG. 2006. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4034-4039.
- Xie J, Ajibade AO, Ye F, Kuhne K, Gao SJ. 2008. Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from latency requires MEK/ERK, JNK and p38 multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *Virology* 371:139-154.
- Xu Y, AuCoin DP, Huete AR, Cei SA, Hanson LJ, Pari GS. 2005. A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 ORF50 deletion mutant is defective for reactivation of latent virus and DNA replication. *J Virol* 79:3479-3487.
- Yaffe MB, Elia AE. 2001. Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin Cell Biol* 13:131-138.
- Yang TY, Chen SC, Leach MW, Manfra D, Homey B, Wiekowski M, Sullivan L, Jenh CH, Narula SK, Chensue SW, Lira SA. 2000. Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by human herpesvirus 8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 191:445-454.
- Yang Z, Wood C. 2007. The transcriptional repressor K-RBP modulates RTA-mediated transactivation and lytic replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 81:6294-6306.
- Yang Z, Yan Z, Wood C. 2008. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus transactivator RTA promotes degradation of the repressors to regulate viral lytic replication. *J Virol*

- 82:3590-3603.
- Ye FC, Zhou FC, Xie JP, Kang T, Greene W, Kuhne K, Lei XF, Li QH, Gao SJ. 2008. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent gene vFLIP inhibits viral lytic replication through NF-kappaB-mediated suppression of the AP-1 pathway: a novel mechanism of virus control of latency. *J Virol* 82:4235-4249.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17:3011-3016.
- Ying SY, Chang CP, Lin SL. 2010. Intron-mediated RNA interference, intronic microRNAs, and applications. *Methods Mol Biol* 629:205-237.
- Ying SY, Lin SL. 2009. Intron-mediated RNA interference and microRNA biogenesis. *Methods Mol Biol* 487:387-413.
- Yu Y, Black JB, Goldsmith CS, Browning PJ, Bhalla K, Offermann MK. 1999. Induction of human herpesvirus-8 DNA replication and transcription by butyrate and TPA in BCBL-1 cells. *J Gen Virol* 80 (Pt 1):83-90.
- Yu Y, Wang SE, Hayward GS. 2005. The KSHV immediate-early transcription factor RTA encodes ubiquitin E3 ligase activity that targets IRF7 for proteasome-mediated degradation. *Immunity* 22:59-70.
- Zeng Y, Yi R, Cullen BR. 2005. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *Embo J* 24:138-148.
- Zhang G, Raghavan B, Kotur M, Cheatham J, Sedmak D, Cook C, Waldman J, Trgovcich J. 2007. Antisense transcription in the human cytomegalovirus transcriptome. *J Virol* 81:11267-11281.
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. 2004. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118:57-68.
- Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ, Srivastava D. 2007. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 129:303-317.
- Zhong W, Wang H, Herndier B, Ganem D. 1996. Restricted expression of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genes in Kaposi sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6641-6646.
- Zhou FC, Zhang YJ, Deng JH, Wang XP, Pan HY, Hettler E, Gao SJ. 2002. Efficient infection by a recombinant Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cloned in a bacterial artificial chromosome: application for genetic analysis. *J Virol* 76:6185-6196.
- Zhu Y, Xu G, Patel A, McLaughlin MM, Silverman C, Knecht K, Sweitzer S, Li X, McDonnell P, Mirabile R, Zimmerman D, Boyce R, Tierney LA, Hu E, Livi GP, Wolf B, Abdel-Meguid SS, Rose GD, Aurora R, Hensley P, Briggs M, Young PR. 2002. Cloning, expression, and initial characterization of a novel cytokine-like gene family. *Genomics* 80:144-150.
- Ziegelbauer JM, Sullivan CS, Ganem D. 2009. Tandem array-based expression screens identify host mRNA targets of virus-encoded microRNAs. *Nat Genet* 41:130-134.
- Ziegler JL, Katongole-Mbidde E. 1996. Kaposi's sarcoma in childhood: an analysis of 100 cases from Uganda and relationship to HIV infection. *Int J Cancer* 65:200-203.

7 Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Christalla T, Tessmer U, Grundhoff A. A Requirement for Drosha in the maintenance of KSHV Latency. Manuskript in Vorbereitung.

El-Armouche A, Schwörer A, Neuber C, Biermann D, Christalla T, Grundhoff A, Eschenhagen T, Zimmermann W, Ehmke H. Common microRNA signatures in cardiac atrophic and hypertrophic remodeling processes. PLoS One, Vol. 5 (12), 2010.

Walz N, Christalla T, Tessmer U, Grundhoff A. A global analysis of evolutionary conservation among known and predicted gammaherpesvirus microRNAs. Journal of Virology, Vol. 84 (2), 2010.

Ottinger M, Pliquet D, Christalla T, Frank R, Stewart JP, Schulz TF. The Interaction of the gammaherpesvirus 68 orf73 protein with cellular BET proteins affects the activation of cell cycle promoters. Journal of Virology, Vol. 83 (9), 2009.

Ottinger M, Christalla T, Nathan K, Brinkmann MM, Viejo-Borbolla A, Schulz TF. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA-1 interacts with the shot variant of BRD4 and releases cells from a BRD4- and BRD2/RING3-induced G1 cell cycle arrest. Journal of Virology, Vol. 80 (21), 2006.

Vorträge

Retreat zum Programmbereich „Zelluläre Dysfunktion“ am Heinrich-Pette-Institut an der Universität Hamburg, 2008: „Identification of cellular transcripts targeted by KSHV miRNAs“. Christalla T, Tessmer U, Grundhoff A.

Posterpräsentation

Christalla T, Henning C, Tessmer U, Grundhoff A. „Transient Expression of KSHV miRNAs Suggests An Important Role during Early Stages of Latency Establishment“. 19th Annual Meeting of Society for Virology in Leipzig (2009).

Christalla T, Tessmer U, Grundhoff A. „A Requirement for Drosha in the Maintenance of KSHV Latency“. Heinrich-Pette-Institut, Evaluierung (2010).

Teilnahme an Fachtagung

Third European Congress of Virology in Nürnberg (2007)

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Adam Grundhoff für die Vergabe dieses sehr interessanten und aktuellen Promotionsthemas, für die Betreuung sowie für die Anleitung und Unterstützung bei der Ausarbeitung der Promotion. Des Weiteren danke ich für die gewährte wissenschaftliche Freiheit sowie für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen, die maßgeblich dazu beigetragen haben, dass ich mich als Wissenschaftler am Heinrich-Pette-Institut weiterentwickeln konnte.

Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner danke ich ausdrücklich für die Betreuung meiner Promotionsarbeit für das Department Biologie sowie für die Übernahme des ersten Gutachtens.

Herrn Prof. Dr. Boris Fehse danke ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Mein weiterer Dank gilt Uwe Tessmer, Thomas Günther, Christine Henning, Nicole Walz sowie Phillipp Schult und damit der gesamten Arbeitsgruppe Zelluläre Virusabwehr.

Uwe Tessmer danke ich für seine technische Unterstützung und seinen fachlichen Rat bei Problemen jedweder Art. Vor allem für seine Unterstützung bei der Durchführung von Northern Blot- und Proteomanalysen möchte ich mich bedanken.

Bei Thomas Günther möchte ich mich für seine ständige Hilfsbereitschaft, aber insbesondere für seine Ideen, für die anregenden Diskussionen und für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Christine Henning danke ich mich in die Echtzeit-RT-PCR Technologie eingeführt zu haben sowie für ihren Optimismus und für ihren Humor. Es hat Spaß gemacht mit dir zu arbeiten.

Bei Nicole Walz möchte ich mich für ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie für eine produktive Zusammenarbeit bedanken.

Allen möchte ich an dieser Stelle noch einmal für die tolle Zusammenarbeit und das fröhliche Arbeitsklima danken.

Danken möchte ich zudem den Arbeitgruppen von Dr. Michael Schindler und Dr. Carol Stocking. Besonders bei Carina Banning und Katrin Schulz für hilfreiche Diskussionen und die Zusammenarbeit.

Des Weiteren möchte ich meinen Freunden danken, die mich während meines bisherigen Lebenswegs und vor allem während meiner Promotion unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken, die mich immer bedingungslos unterstützt haben und diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

9 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen
°C	Grad Celsius
AIDS	acquired immunodeficiency disease syndrome
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Antisense
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCBL-1	body cavity-based lymphoma
BCLAF	BCL2-associated transcription factor
bp	Basenpaare
CCL3	chemokine C-C motif ligand 3
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cRNA	complimentary RNA
CTP	Cytosin-Triphosphat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGCR8	Digeorge syndrome critical region
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dsRBD	doppelsträngige RNA-Bindedomäne
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix
et al.	et alteri (und andere)
FCS	foetal calf serum (fötales Kälberserum)
Fw	forward, 5'-3' Primer

g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GO	Gene-Ontologie
GPCR	G Protein-gekoppelter Rezeptor
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonic acid
HHV8	Humanes Herpesvirus 8
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HSV	Herpes-simplex-Virus
HVS	Herpesvirus Saimiri
IL	Interleukin
IRES	internal ribosome entry site
IRF	Interferon-regulierter Faktor
kDa	kilo Dalton
KS	Kaposi Sarkom
KSHV	Kaposi Sarkoma-assoziiertes Herpesvirus
L	Liter
LANA	latency associated nuclear antigen
LT	Latente Transkripte
LUR	long unique region
M	Molar
m	Mili (10^{-3})
mA	Miliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MCD	Multizentrische Castleman Krankheit
MCS	multiple cloning site
miR	microRNA
miRNA	microRNA
mM	Milimolar
mRNA	messenger RNA
NF-κB	nuclear factor-kappa B
nm	Nanometer

ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEL	primäres Effusionslymphom
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLAU	urokinase plasminogen activator
pre-miRNA	precursor miRNA
pri-miRNA	primary miRNA
RBP-Jκ	recombinant signal binding protein-J kappa
RISC	RNA-induced silencing complex
rpm	rounds per minute
RTA	Regulator der transkriptionellen Aktivierung
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
Rv	reverse, 3'-5'Primer
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	short hairpin RNA
STAT	signal transducer and activator of transcription
SV40	Simian Virus 40
TPA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
Tris	Tris(hydromethyl)aminomethan
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vFLIP	virales FLICE-Inhibitor Protein
vMIP	virales Makrophagen inflammatorisches Protein
VZV	Varizella-Zoster-Virus
α	Alpha
γ	Gamma