

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Expressionsmuster von EBV mikroRNAs in Hodgkin Lymphomen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Laura Vorwerk-Redenbach (geb. Redenbach)

aus

Dortmund

Göttingen 2020

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in:	Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. rer. nat. Dieter Kube
Drittreferent/in:	Prof. Dr. med. Matthias Dobbelstein

Datum der mündlichen Prüfung: 29.03.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Expressionsmuster von EBV mikroRNAs in Hodgkin Lymphomen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis	4
II. Tabellenverzeichnis.....	5
III. Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung.....	7
1.1 miRNAs.....	7
1.1.1 Geschichte	7
1.1.2 Entstehung und Funktion	7
1.1.3 miRNA Zielgene	9
1.1.4 Vorkommen.....	10
1.2 miRNAs und EBV.....	11
1.2.1 Bedeutung	11
1.2.2 Funktion von miRNAs für die Diagnostik von EBV	12
1.3 EBV.....	14
1.3.1 Allgemeines.....	14
1.3.2 Virale Genexpression und Latenzphasen	15
1.3.3 Latenztypen und onkogene Bedeutung von EBV	16
1.4 Morbus Hodgkin.....	17
1.4.1 Allgemeines.....	17
1.4.2 EBV und Hodgkin.....	18
2. Material und Methoden.....	20
2.1. Material.....	20
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Gewebeprobe.....	27
2.2.2 Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung	28
2.2.3 Deparaffinisierung und RNA-Extraktion.....	29
2.2.3 PCR- Reaktion	30
2.2.4 Statistische Analyse	33
2.2.5 Bioinformatische Prädiktion der Zielgene	33
3. Ergebnisse.....	34

3.1	EBV miRNAs sind aus paraffinisierem Hodgkin-Lymphom Gewebe gut zu extrahieren.	34
3.2	Der EBV-Status von Hodgkin Lymphomen korreliert mit der Expression der EBV-miRNAs	35
3.2.1	Detektion der EBV-miRNAs mit qPCR	35
3.1.2	Einordnung der Güte der miRNAs hinsichtlich der Beschreibung des Infektionsstatus einer Formalinprobe	37
3.2.3	EBV-Statusberechnung durch Zusammenfassung unterschiedlicher miRNA- qPCR-Reaktionen	45
3.4	Bioinformatische Prädiktion von EBV-miRNA-Zielgenen	49
4.	Diskussion.....	52
4.1	EBV miRNAs in archivierten Gewebeproben	52
4.1.1	Einfluss von Paraffinisierung auf das Gewebe	52
4.1.2	Notwendigkeit der Verwendung eines Housekeeping-Gens.....	53
4.1.3	Vorteile der miRNA-qPCR aus paraffinisierem Gewebe	53
4.2	EBV-Infektion und Biologie	54
4.2.1	Infektion und Latenzmuster im Zusammenhang mit miRNAs	54
4.3	EBV-Latenzmuster, Proteine und miRNA-Expression	56
4.3.1	Expressionsprofile der Proteine und miRNAs	56
	Akute infektiöse Mononukleose, PTLD, AIDS-assoziierte Lymphome	57
4.3.2	Funktionen der Proteine und miRNAs	57
4.4	EBV und Krebs.....	59
4.4.1	EBV-miRNAs in verschiedenen Krebsarten.....	59
4.4.2	EBV-miRNAs in Zusammenhang mit dem Latenzmuster in verschiedenen Krebsarten	60
4.4.3	EBV-miRNAs und Entstehung/Progression von Krebs.....	61
4.5	EBV und Hodgkin Lymphome.....	63
4.6	MiRNA-Expressionsmuster	64
4.7	Regulatorische Funktion der exprimierten miRNAs	65
4.8	EBV und MS	69
5.	Zusammenfassung	72

Literaturverzeichnis74

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MiRNA-Expression in EBV-positiven Hodgkin Lymphomen 36

Abbildung 2: Expression der viralen miRNAs in Promille RNU6B..... 37

Abbildung 3: ROC-Kurven aller miRNAs 44

Abbildung 4: ROC-Kurven von miRNAs mit besonders guter Diskriminierungsfähigkeit 45

Abbildung 5: Zusammenfassung der miRNAs im Vergleich zu EBER1 47

Abbildung 6: EBV-Status in Hodgkin Lymphomen..... 48

Abbildung 7: EBV-Status in B-Zell-proliferativen Erkrankungen..... 49

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Viren, die miRNAs kodieren	11
Tabelle 2: Lymphomproben.....	20
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien	20
Tabelle 4: Antikörper und Enzyme.....	22
Tabelle 5: Kits.....	22
Tabelle 6: Geräte und Software	23
Tabelle 7: Primer	23
Tabelle 8: miRNAs und AUC-Werte mit entsprechender Sensitivität und Spezifität.....	39
Tabelle 9: EBER- <i>in-situ</i> -Hybridisierung vs. miRNA-Kombination	46
Tabelle 10: Zielgene anhand der eigenen Computer-Prädiktion mittels Targetscan.....	50
Tabelle 11: Expressionsprofil viraler Gene und EBV-miRNAs.....	57
Tabelle 12: Zielgene von EBV-miRNAs anhand der Literatur zusammengefasst	62

III. Abkürzungsverzeichnis

AUC	area under the curve
BCL	B cell lymphoma
BART	Bam HI-A region rightward transcript
BHRF	Bam HI rightward open reading frame
CT	Cycle threshold
DLBCL	diffuse large B cell lymphoma
EBNA	EBV nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
FFPE	fresh frozen paraffin embedded
IHC	immunhistochemie
ISH	<i>In-situ</i> -Hybridisierung
LMP	latent membrane protein
MS	Multiple Sklerose
NLPHL	noduläres Lymphozyten prädominantes Hodgkin Lymphom
HKG	housekeeping gene
NPC	nasopharyngeales carcinom
ROC	receiver operating characteristic
PCR	polymerase chain reaction
PTLD	post transplantation lymphoproliferative disease
qPCR	quantitative PCR
miRISC	miRNA induced silencing complex
miRNA	mikro Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SEM	standard error of the mean
UNG	Uracil-N-Glykosylase
UTR	untranslated region

1. Einleitung

1.1 miRNAs

1.1.1 Geschichte

Bei Mikro-Ribonukleinsäuren (miRNAs) handelt es sich um kleine RNA-Abschnitte mit einer Länge von ca. 18-22 Basenpaaren. Sie haben keine kodierenden Eigenschaften, greifen jedoch vielfach regulierend in den Zellzyklus ein (Eulalio et al. 2008; Wu und Belasco 2008).

Die Forschungsgruppe um Rosalind C. Lee und Viktor Ambros entdeckte bereits 1993 in der Fadenwurm-Gattung *Caenorhabditis elegans* das Gen *lin-4*, welches für kleine RNA-Sequenzen kodiert (Lee et al. 1993). *Lin-4* nimmt über die Regulation von *lin-14*, einem weiteren Gen von *C. elegans*, Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung der Larve des Wurmes (Wightman et al. 1991): die von *lin-4* kodierten Nukleotidsequenzen zeigten sich teilweise komplementär zum 3'-untranslated-region(3'UTR)-Ende der *lin-14*-mRNA, sodass die Vermutung aufgestellt wurde, dass über eine RNA-RNA-Interferenz die Genexpression von *lin-14* herunter reguliert wird (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993).

Einige Jahre später entdeckten Forschungsgruppen ein weiteres Gen von *C. elegans*, *let-7*, welches ebenfalls während dessen Entwicklung für kleine, ca. 22 Basenpaar lange RNA-Sequenzen kodiert (Reinhart et al. 2000; Slack et al. 2000). Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich *let-7* nicht nur in Nematoden, sondern auch im Genom anderer Organismen zeigte, unter anderem *Drosophila*, und auch im menschlichen Genom (Pasquinelli et al. 2000).

2001 wurden diese kleinen, ca. 22 Basenpaare langen, nicht kodierenden RNAs das erste Mal als miRNAs definiert, mit der Funktion, auf der Translationsebene Gene zu regulieren (Lagos-Quintana 2001; Lau 2001; Lee 2001). Dieser Mechanismus der Genregulation durch endogene RNAs wird, wie oben bereits erwähnt, auch als RNA-Interferenz bezeichnet (Bernstein et al. 2001b).

Im Zusammenhang mit diesem Phänomen befinden sich in einer Zelle auch noch weitere kleine RNA-Fragmente, wie zum Beispiel si-(small interfering)RNAs (Ambros et al. 2003; Reinhart und Bartel 2002) oder pi-(PIWI-interacting)RNAs (Aravin et al. 2007).

1.1.2 Entstehung und Funktion

Die Gene, die für miRNAs kodieren, befinden sich innerhalb des Genoms. Durch eine RNA-Polymerase II (Lee et al. 2004) oder III (Borchert et al. 2006) werden diese Gene

zunächst zu einer Haarnadelschleifen-Struktur transkribiert (Ambros et al. 2003; Lee et al. 1993; 2004). Diese weist am 3'-Ende eine Polyadenylierung (Poly-A) und am 5'-Ende eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe (cap-Struktur) auf und wird als primary(pri)-miRNA bezeichnet (Lee 2002). Über einen Enzymkomplex bestehend aus dem Enzym DROSHA (Lee et al. 2003) und seinem Kofaktor DGCR8 (diGeorge syndrome critical region gene 8) (Gregory et al. 2004; Han et al. 2004) werden die Guanosin-Kappe sowie das Poly-A-Ende noch im Zellkern prozessiert und es entsteht die premature(pre)-miRNA (Lee 2002).

Über Exportin 5 (Bohnsack et al. 2004; Lund et al. 2004) wird die pre-miRNA ins Zytoplasma transportiert und dort durch einen weiteren Enzymkomplex bestehend aus dem Enzym DICER und dem Kofaktor HIV1 TAR RNA binding protein (TRBP) (Bernstein et al. 2001a; Grishok et al. 2001; Hutvágner et al. 2001) weiter prozessiert: es entsteht die einsträngige reife miRNA. Diese wird in einen Proteinkomplex eingebaut, der als RNA induced silencing complex (RISC-Komplex) bezeichnet wird, bestehend aus DICER, TRBP und einem Protein aus der Argonaut-Familie (Bernstein et al. 2001a; Hammond et al. 2001; 2000).

Welcher Strang der doppelsträngigen pre-miRNA als funktionelles Element in den Enzymkomplex eingebaut wird ist abhängig von der Basenpaar-Stabilität am 5'-Ende der miRNA (Khvorova et al. 2003; Schwarz et al. 2003). Der Strang mit der schwächeren Basenpaarung wird im miRISC Komplex zur Ziel-mRNA transportiert.

Sowohl das Erkennen der Ziel-mRNA durch die miRNA als auch der Mechanismus der Regulation durch die miRNA ist abhängig von der Komplementarität zwischen den Nukleotiden 2-8 am 5'-Ende der miRNA, der sogenannten seed region und dem miRNA regulatory element (MRE) am 3'-Ende der mRNA (Grimson et al. 2007; Lewis et al. 2005). Durch miRNAs kann der Zerfall einer mRNA hervorgerufen werden (Wu und Belasco 2008; Wu et al. 2006). Sind miRNA und Ziel-mRNA komplett komplementär, erfolgt der direkte Abbau der mRNA (Llave et al. 2002; Yekta et al. 2004).

Des Weiteren kann eine Deadenylierung des Poly-A-Schwanzes der mRNA induziert werden, wodurch die Bindung des poly-A-binding-Proteins (PABP) an der mRNA verhindert wird (Wakiyama et al. 2007). Durch diese miRNA induzierte Deadenylierung und Abbau des Poly-A-Schwanzes der mRNA sowie auch der cap-Struktur kann diese mRNA nukleolytisch abgebaut werden (Behm-Ansmant et al. 2006; Eulalio et al. 2007).

Besteht nur eine teilweise Komplementarität, wie in den meisten Fällen, kann die Translation der mRNA auf verschiedenen Ebenen gehemmt werden und ebenfalls zu einem Zerfall der mRNA führen (Zhao und Liu 2009).

Der genaue Mechanismus der miRNA-induzierten Repression der Translation ist noch nicht aufgeklärt, es gibt jedoch verschiedene Modelle (Eulalio et al. 2008; Zhao und Liu 2009). Die Inhibierung der Translation durch miRNAs geschieht auf verschiedenen Ebenen (Eulalio et al. 2008).

Zum einen kann die Initiation der Translation gehemmt werden, indem die Verschmelzung der Ribosomen-Untereinheiten blockiert wird (Pillai et al. 2005; Thermann und Hentze 2007).

Ein weiterer Mechanismus, um die Initiation der Translation zu blockieren, wirkt über die 5'-cap-Struktur der mRNA, an welcher der Argonaut-Anteil des RISC-Komplexes bindet und somit das Anlagern des Translationskomplexes kompetitiv hemmt (Humphreys et al. 2005; Pillai et al. 2005).

Auch in der Postinitiationsphase der Translation kann eine Regulation über miRNAs erfolgen (Olsen und Ambros 1999). Dies erfolgt zum Beispiel über ein Ribosomen-dropoff während der Translation, also ein Ablösen der Ribosomen-Untereinheiten und somit den frühzeitigen Abbruch der Elongation oder den sofortigen Zerfall der synthetisierten Polypeptidkette (Petersen et al. 2006). Die Proteinsynthese bleibt somit unvollständig.

Es wurden Anteile des miRISC-Komplexes in sogenannten processing(p)-bodies gefunden, bei welchen es sich um Granula handelt, die mit mRNA und RNA-spaltenden Enzymen gefüllt sind (Liu et al. 2005; Sen und Blau 2005).

In den p-bodies wird nicht translatierte RNA gesammelt und entweder abgebaut oder unter bestimmten Bedingungen wieder ins Zytoplasma gegeben, somit sind sie wesentlich an der Regulation der Genexpression beteiligt (Anderson und Kedersha 2006).

Unter bestimmten Bedingungen kann es auch zu einer verstärkten Translation der Ziel-mRNA und damit zu einer erhöhten Proteinproduktion kommen, so zum Beispiel während der Phase des Zellzyklusarrestes, also der G₀-Phase (Vasudevan et al. 2008; 2007). Unter Stress kann zudem die Repression der Translation gestoppt werden, indem die mRNA beispielsweise aus den p-bodies entlassen und translatiert wird (Bhattacharyya et al. 2006).

1.1.3 miRNA Zielgene

MiRNAs sind in verschiedene biologische Prozesse involviert, sowohl im pflanzlichen als auch im menschlichen und tierischen Organismus (Bartel 2004; Wen Kuo-Chang 2013). Dazu gehört unter anderem, wie oben beschrieben, die Regulation der Genexpression, Einfluss auf die Entwicklung einer Zelle oder deren Proliferation und Differenzierung sowie Apoptose. Damit spielen miRNAs auch eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der

Entstehung von Krebserkrankungen (He et al. 2005; Lu et al. 2005). Hierauf wird im weiteren Verlauf detaillierter eingegangen.

Da die biologische Funktion der miRNAs auf kompletter bzw. inkompletter Kompatibilität beruht, kann eine miRNA mehrere (bis zu mehreren hundert) Zielgene bzw. Targets haben. Um diese Targets vorauszusagen, gibt es verschiedene Methoden, die auf der Komplementarität zwischen der seed-Sequenz der miRNA und der 3'-UTR der Ziel-mRNA basieren (Bartel 2009).

Hierfür werden bioinformatische Programme genutzt, die diese Bindungsstellen miteinander vergleichen. Es existieren verschiedene Datenbanken, unter anderem miRanda (CA Clarke et al. 2011), pictar (Krek et al. 2005) und targetscan (Grimson et al. 2007; Lewis et al. 2005).

Auf diese Weise vorhergesagte Targets *In vitro* oder *In vivo* zu verifizieren erweist sich in den meisten Fällen jedoch als äußerst schwierig (Bartel 2009).

1.1.4 Vorkommen

Im menschlichen Genom werden bis zu 1000 miRNAs kodiert und schätzungsweise bis zu einem Drittel des menschlichen Genoms wird durch miRNAs reguliert (Lewis et al. 2005). Auch einige Viren kodieren verschiedene miRNAs, besonders häufig solche Viren, die die Fähigkeit besitzen, menschliche Zellen latent zu infizieren, so zum Beispiel verschiedene Herpes- oder Polyomaviren (Cullen 2006; Ghosh et al. 2008; Pfeffer 2004; Sullivan et al. 2005). Beispiele für Viren, die miRNAs in ihrem Genom enthalten, sind in folgender Tabelle (Tabelle 1) aufgeführt.

Tabelle 1: Viren, die miRNAs kodieren (Skalsky und Cullen, 2010)

Virus Familie	Virus	Vorkommen
Alpha Herpesvirus	Herpes-simplex-Virus (HSV) -1	Mensch
	Herpes-simplex-Virus (HSV)-2	Mensch
Beta-Herpesvirus	Humanes Cytomegalievirus (hCMV)	Mensch
	Murines Cytomegalievirus (mCMV)	Maus
Gamma-Herpesvirus	Epstein-Barr-Virus (EBV)	Mensch
	Rhesus Lymphokryptovirus (rLCV)	Affe
	Kaposi-Sarkom-Hepesvirus (KSHV) oder Humanes-Herpesvirus (HHV)-8	Mensch
	Rhesus Rhadinovirus (RRV)	Affe
	Murines Gammaherpesvirus (MHV)-68	Maus
Polyomavirus	Polyom	Maus
	Simian Virus (SV)-40	Affe
	John Cunningham Virus (JCV)	Mensch
	B.K. Virus (BKV)	Mensch
Adenovirus	Humanes Adenovirus (hAV)	Mensch

Ein besonders häufig und intensiv untersuchtes Virus ist das Epstein-Barr-Virus (EBV), welches ebenfalls bestimmte miRNAs kodiert, die regulierenden Einfluss auf verschiedene zelluläre Gene haben.

Auch diese Arbeit beschäftigt sich mit miRNAs des Epstein-Barr-Virus insbesondere in Bezug auf deren onkogene Eigenschaften.

1.2 miRNAs und EBV

1.2.1 Bedeutung

EBV-miRNAs nehmen zum einen Einfluss auf die Gene, die für die Infektion mit dem Virus eine Rolle spielen, zum anderen auf die, die für die zelleigene Immunität, das Überleben und die Proliferation der Zelle wichtig sind (Albanese et al. 2017; Grundhoff und Sullivan 2011; Plaisance-Bonstaff und Renne 2011; Skalsky und Cullen 2010).

In einer Studie wurde in Form einer *In vitro* durchgeführten PARCLIP-Untersuchung (photo activatable ribonucleoside-enhanced crosslinking und immunoprecipitation) in Verbindung mit einer Sequenzanalyse der Einfluss bzw. die Zielgene von EBV-spezifischen

und zellulären miRNAs in lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) untersucht (Skalsky et al. 2012).

Dabei stellte sich heraus, dass EBV-eigene miRNAs in erster Linie während der latenten Infektion Einfluss auf zelluläre Transkripte nehmen (Skalsky et al. 2012) und damit auch auf die Latenzzeit des Virus und auf dessen Fähigkeit, dem menschlichen Immunsystem zu entgehen (Iizasa et al. 2010; Xia et al. 2008).

Andere Studien betonten wiederum, dass die Expression viraler miRNAs über den Zeitraum einer latenten Infektion einer Zelle mit dem Virus möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung von Lymphomen, insbesondere des Morbus Hodgkin, spielen könnte (Esau 2017; X. Frank Zhao et al. 2011).

1.2.2 Funktion von miRNAs für die Diagnostik von EBV

Zum jetzigen Zeitpunkt werden unterschiedliche Methoden für die Diagnosestellung einer Infektion mit EBV verwendet. Bricht das Virus aus und der Infizierte erkrankt an infektiöser Mononukleose, erfolgt die Diagnose zum einen über die klinische Symptomatik und zum anderen über das typische Blutbild des Patienten, das eine relative Lymphozytose zeigt.

Diese Lymphozyten stellen sich im Blutaussstrich als sogenannte atypische Lymphozyten oder auch Virozyten dar. Im Serum eines an infektiöser Mononukleose Erkrankten können verschiedene Antikörper nachgewiesen werden, dazu zählen anti-VCA (virales Capsid Antigen), anti-EBNA (EBV Nuclear antigen), anti-EA (early antigen), jeweils vom Typ IgG und IgM. Diese sind je nach Stadium und Latenzphase der EBV Infektion unterschiedlich ausgeprägt nachweisbar. Die Diagnostik wird größtenteils mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) oder MFI (multiplex flow immunoassay) durchgeführt. Bei einer EBV-Reaktivierung, z.B. bei Immunkompromittierten, wird die Viruslast mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) der Virus-DNA festgestellt (De Paschale und Clerici 2012).

Um herauszufinden, ob eine Gewebeprobe mit EBV befallen ist, gibt es verschiedene Methoden mit unterschiedlicher Sensitivität. Ausgangspunkte sind hierbei Proteine oder RNAs in verschiedenen intrazellulären Lokalisationen der Viruszelle. So kann man via Southern Blot oder PCR die DNA des Virus nachweisen (Hamilton-Dutoit und Pallesen 1994; Herbst et al. 1990). Hierbei wird allerdings das Gewebe zerstört, sodass der Zelltyp nicht mehr zu erkennen ist und somit auch nicht, ob das Virus in den malignen oder nicht malignen Zellen zu finden ist. Eine weitere Methode ist eine Immunfluoreszenztestung für

EBV nuclear antigen (EBNA) 1 (Reedman und Klein 1973). Da es hierfür viele verschiedene anti-EBNA1-Reagenzien gibt, ist die Gefahr der falsch positiven Anfärbung verschiedener Epitope relativ hoch (Lassmann et al. 2011). Über eine Immunhistologie mit Antikörpern gegen Latent Membrane Protein (LMP) 1 (Pallesen et al. 1991) kann ebenfalls eine EBV-Genexpression nachgewiesen werden. In manchen Geweben sind diese Gene allerdings - abhängig vom Latenztyp, in welchem sich das Virus gerade befindet - herunterreguliert. Als Goldstandard hat sich daher die EBER-*in-situ*-Hybridisierung etabliert (Hamilton-Dutoit und Pallesen 1994), eine Methode mit hoher Spezifität und Sensitivität. Als EBER werden kleine nicht kodierende EBV-RNA-Sequenzen bezeichnet, die in allen Latenztypen vorkommen, das erste Mal 1986 von Howe und Steitz beschrieben (Howe und Steitz 1986). Diese RNA-Sequenzen befinden sich im Nukleus der Viruszellen und werden durch komplementäre RNA-Sequenzen markiert und unter dem Mikroskop sichtbar gemacht. Eine wichtige Voraussetzung für diese Methode ist allerdings eine gute Qualität der Probe und somit der RNA. Ist der EBV-Status mittels EBER-*in-situ*-Hybridisierung gesichert, kann der Latenztyp wiederum über eine Immunhistochemie mit Antikörpern, z.B. gegen EBNA1 oder LMP1, festgestellt werden.

Einige virale Gene können auch mittels quantitativer PCR (qPCR) detektiert werden. Hier ist ebenfalls unter anderem die Qualität der Probe ein wichtiger Faktor, aufgrund dessen misslingt die qPCR häufig in Gewebe, dessen RNA oder DNA bereits stark geschädigt bzw. degradiert ist.

In unserer Studie führten wir eine qPCR für EBV-miRNAs durch, um eine Infektion von archivierten, in Formalin fixierten Gewebeproben mit dem Virus nachzuweisen. Die qPCR von EBV-miRNAs ist auch mit Gewebeproben möglich, die schon eine stärkere RNA-Schädigung aufweisen, aufgrund der vergleichsweise höheren Stabilität der miRNAs (Eisele et al. 2012). Mit Hilfe dieser Methode konnten wir Expressionsmuster von EBV spezifischen miRNAs in Hodgkin Lymphomen feststellen. Es stellte sich heraus, dass der EBV-Status der Lymphomzellen deutlich mit der Expression der miRNAs korreliert. Somit ist diese Methode als Ergänzung in der klinischen Diagnostik zu bewerten. Außerdem zeigten wir, dass besonders stark exprimierte miRNAs in EBV-positiven Hodgkin Lymphomen bestimmte humane Zielgene haben, wie unter anderem Transkriptionsfaktoren oder Regulationsfaktoren. Dies weist darauf hin, dass EBV-miRNAs auch bei einer latenten Infektion von B-Zellen oder Lymphomzellen mit dem Virus eine Rolle spielen könnten.

Das Epstein-Barr-Virus enthält insgesamt 44 miRNAs, die in zwei genomischen Clustern kodiert werden, dem Bam HI-A region rightward transcript (BART) und Bam HI

rightward open reading frame (BHRF1) (Grundhoff 2006). In ersten Untersuchungen wurde der Virusstamm B95.8 verwendet, der aufgrund einer Deletion eines großen Teils des BART-Gens die meisten BART-miRNAs nicht enthält, sodass initial nur fünf EBV-miRNAs entdeckt wurden (Grundhoff 2006; Pfeffer 2004).

Die BART-miRNAs befinden sich auf dem BART-Transkript und werden aus den Introns gespleißt. Sie werden vor allem während Latenztyp 0-II exprimiert. Die BHRF1-miRNAs werden vor allem während Latenztyp III exprimiert. Während des lytischen Zyklus des Virus werden einige BART-miRNAs besonders hoch exprimiert, während BHRF1 nicht signifikant erhöht exprimiert wird (Cai et al. 2006). Demnach sind die miRNAs auch an der Expression viraler Proteine entsprechend der Latenzmuster beteiligt.

Das Expressionslevel der verschiedenen miRNAs ist jedoch nicht nur abhängig vom Latenztyp des Virus, sondern auch vom Zelltyp. So werden z. B. in epithelialen Nasopharynx Karzinom (NPC)-Zellen insgesamt mehr virale miRNAs exprimiert als in B-Zelllinien (Cai et al. 2006).

Aufgrund der enormen Bedeutung von EBV für die verschiedensten malignen oder chronischen Erkrankungen ist es besonders wichtig, möglichst sensitive Methoden für die Detektion des Virus in den unterschiedlichen Geweben zu finden.

1.3 EBV

1.3.1 Allgemeines

Das Epstein-Barr-Virus ist nach seinen Entdeckern Michael Epstein und Yvonne M. Barr benannt, die 1964 erste Viruspartikel in B-Lymphozyten eines Patienten mit Burkitt-Lymphom entdeckten (EPSTEIN et al. 1964).

Das Epstein-Barr-Virus ist ein behülltes DNA-Virus und gehört zur Gruppe der Gammaherpesviridae (Humanes Herpesvirus, HHV 4). Das am häufigsten durch EBV hervorgerufene Krankheitsbild ist die infektiöse Mononukleose (Henle et al. 1968), auch als „Pfeiffersches Drüsenfieber“ nach Dr. Emil Pfeiffer bezeichnet, der bereits 1889 das erste Mal die Krankheit beschrieb (Graser 1991). Die Symptome und Klinik des Pfeifferschen Drüsenfiebers sind hohes Fieber, Abgeschlagenheit sowie eine Pharyngitis mit weißlichen Belägen. Auch regionale Lymphadenitiden können vorkommen. Gegebenenfalls kommt es zu Abdominalbeschwerden, die durch eine Hepatosplenomegalie hervorgerufen werden können.

Das Blutbild zeigt in den meisten Fällen aufgrund der Reaktion des Immunsystems eine Leukozytose mit relativer Lymphozytose. Diese Lymphozyten werden als „atypische mononukleäre T-Lymphoblasten“ oder auch Virozyten bezeichnet (Gross 2009).

Die Übertragung geschieht mittels Tröpfcheninfektion und über den Speichel (Gerber et al. 1972; Miller et al. 1973). Die Seroprävalenz von EBV bei Erwachsenen beträgt ca. 90%. EBV besitzt die Fähigkeit, in den Wirtszellen zu verbleiben, indem es verschiedene Latenzphasen eingeht. Das Virus dringt zunächst über die Epithelzellen des Nasopharynx in den Organismus ein und befällt dann die B-Lymphozyten.

1.3.2 Virale Genexpression und Latenzphasen

Die Latenzphasen sind durch die Expression unterschiedlicher viraler Gene charakterisiert: LMP, EBNA und auch die EBER-RNAs gehören dazu, welche je nach Latenzmuster in unterschiedliche Subtypen unterschieden werden (LMP1, LMP2a und -b, EBNA1, EBNA2, EBNA3a-c, EBER1 und -2). Auf die Expressionsmuster wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit detailliert eingegangen.

Wird eine unreife B-Zelle befallen, werden virale Gene exprimiert, welche eine Aktivierung und ein Wachstum der Zelle zur Folge haben (Thorley-Lawson und Gross 2004; Thorley-Lawson 2001). Diese B-Zellen findet man in den Lymphknoten (Babcock et al. 2000; Joseph et al. 2000).

Werden dagegen bereits aktivierte B-Zellen des Keimzentrums befallen, sorgt das Virus über weitere Genexpression dafür, dass diese zu ruhenden B-Gedächtnis-Zellen differenzieren (Thorley-Lawson 2001). In diesen Zellen kann das Virus lebenslang latent persistieren, es werden keine Gene exprimiert (Babcock et al. 1998; Hochberg et al. 2004; Miyashita et al. 1997). Teilen sich diese latent infizierten B-Gedächtnis-Zellen, wird nur EBNA1 exprimiert, was zur Folge hat, dass die virale DNA ebenfalls repliziert wird (Yates et al. 1985).

Auf diese Weise vermehrt und verteilt sich das Virus unentdeckt vom menschlichen Immunsystem.

Wird eine Gedächtniszelle allerdings zu einer Plasma-Zelle, tritt der lytische Zyklus ein, sodass die Plasmazelle zerstört wird, das Virus freigesetzt wird und wieder neue Zellen befallen kann (Thorley-Lawson und Gross 2004). Am Beginn des lytischen Zyklus steht die Aktivierung des ZEBRA Proteins (Auch als Zta oder BZLF1 bekannt), welches die virale Genexpression und die Flucht vor dem Immunsystem (immune escape) steuert (Miller et al. 2007). Mit ZEBRA werden verschiedene Gene des lytischen Zyklus aktiviert, so

dass Transkriptionsfaktoren, frühe Gene (z.B. für die virale DANN-Replikation, Schutz vor Apoptose, immune escape) und späte Gene (z.B. für Strukturproteine) abgelesen werden. Interessanterweise werden mit dem Wechsel in den lytischen Zyklus die EBER-RNAs nicht mehr exprimiert, wohingegen andere Proteine, z. B. LMP, hochreguliert werden (Gilligan et al. 1990).

Die während des lytischen Zyklus exprimierten viralen Proteine werden als Antigene präsentiert, sodass die Wirtszellen von zytotoxischen T-Zellen erkannt und zerstört werden (Khanna et al. 1999).

Diese Reaktion kann sehr massiv verlaufen, sodass bis zu 50% aller CD⁸-positiven-T-Zellen als atypische Lymphozyten gegen die infizierten Wirtszellen gerichtet sind (Callan et al. 1998; Wood und Frenkel 1967). Die zirkulierenden Viruspartikel werden außerdem durch Antikörper abgefangen (Pearson et al. 1970). Durch diese enorme Immunreaktion kann bei immungesunden Patienten das Virus weitgehend abgewehrt werden und die Erkrankung ausheilen. Es persistieren jedoch ca. 1 von 10.000-100.000 latent infizierten B-Zellen (Laichalk et al. 2002).

1.3.3 Latenztypen und onkogene Bedeutung von EBV

Durch den proliferativen Effekt einer Infektion mit EBV auf die B-Zellen kann das Virus insbesondere bei immungeschwächten Patienten eine schwerwiegende Bedeutung haben, da die Lymphoproliferation außer Kontrolle geraten kann (Hamilton-Dutoit et al. 1991).

Das Epstein-Barr-Virus besitzt also auch onkogene Eigenschaften und spielt eine Rolle bei unterschiedlichen Krebserkrankungen, wie beispielsweise Nasopharynxkarzinomen, Hodgkin oder non Hodgkin Lymphomen, Burkitt Lymphomen oder Magenkarzinomen (Pallesen et al. 1991; zur Hausen et al. 1970).

EBV weist drei verschiedene Latenzmuster auf, in denen auch verschiedene virale Gene exprimiert werden. Die EBER-RNAs werden in allen Latenztypen exprimiert. Für Latenztyp 0 und I ist außerdem die Expression von EBNA1 sowie BART-miRNAs charakteristisch. Dieser Typ kommt gehäuft in B-Gedächtniszellen des peripheren Blutes sowie beim Burkitt Lymphom vor. Latenztyp II zeigt eine Expression von EBNA1, LMP1, LMP2a und 2b sowie BARF1 und ist vor allem bei Hodgkin Lymphomen, non Hodgkin (B-Zell-) Lymphomen, T-/NK-Zelllymphomen und nasopharyngealen Karzinomen zu finden (Lassmann et al. 2011).

In Latenzmuster III werden EBNA1, -2, -3a, -3b, -3c, EBNA-LP, LMP1, LMP2a, und -2b exprimiert sowie die BART- und BHRF-miRNAs. Dieser Latenztyp kommt gehäuft in

lymphoblastoiden Zelllinien, posttransplantatorischen lymphoproliferativen Erkrankungen, AIDS-assoziierten Lymphomen und der infektiösen Mononukleose vor.

Insgesamt ist EBV mit ca. 1% aller Krebserkrankungen weltweit assoziiert (Gulley und Tang 2008).

Fraglich spielt das Virus auch bei chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Multipler Sklerose eine Rolle (Lassmann et al. 2011; Niller et al. 2008).

1.4 Morbus Hodgkin

1.4.1 Allgemeines

In dieser Arbeit wurden vor allem Gewebeproben aus Hodgkin Lymphomen untersucht. Das Hodgkin Lymphom, auch Lymphogranulomatose genannt, ist ein monoklonales B-Zell-Lymphom, dessen Inzidenz bei ca. 3/100.000 Personen liegt. Es beginnt meist in den Lymphknoten, in denen dann auch die sogenannten Hodgkin-Zellen nachgewiesen werden können. Diese haben ein charakteristisches Aussehen. Sie sind sehr groß und besitzen zum Teil mehrere Zellkerne, weshalb sie auch als Eulenaugenzellen bezeichnet werden. Aus der Fusion mehrerer Eulenaugenzellen entstehen die Reed-Sternberg-Riesenzellen (Gross 2009).

Laut WHO (World Health Organisation) wird das Hodgkin Lymphom in verschiedene Subgruppen unterteilt: das Klassische Hodgkin Lymphom (Typ I, cHL, 93% der Fälle), das in Form der Nodulären Sklerose (60%), als Mischtyp (28%), als lymphozytenreicher (5%) oder lymphozytenarmer Typ (0,3%) vorkommt und das Lymphozyten prädominante Hodgkin Lymphom (Typ II, NLPHL, 7%). Außer in den Lymphknoten manifestiert sich das Hodgkin Lymphom auch in extranodalen Regionen, bevorzugt im Knochenmark und in der Leber. Je nach Stadium, Ausbreitung und Risikofaktoren (wie z. B. B-Symptomatik, befallene Regionen, Höhe der Blutsenkungsgeschwindigkeit), kann eine Stadieneinteilung vorgenommen und die Prognose eingeschätzt werden, wobei die 5-Jahres-Überlebensrate der Erkrankten in allen Stadien bei 88% bis über 90% liegt. Somit hat die Erkrankung primär eine gute Prognose, welcher jedoch das Risiko für eine Zweitneoplasie auf dem Boden der radiochemotherapeutischen Behandlung gegenübersteht (ca. 15% pro 20 Jahre) (Gerd Herold 2011).

1.4.2 EBV und Hodgkin

EBV-Seropositivität erhöht das Risiko, an einem Hodgkin-Lymphom zu erkranken, etwa um das dreifache. HIV-Seropositivität sowie immunsuppressive Therapien und toxische Substanzen gelten ebenfalls als Risikofaktoren (Gerd Herold 2011).

Die tatsächliche Bedeutung des Epstein-Barr-Virus für die Entstehung eines Hodgkin Lymphoms bleibt weiterhin in der Diskussion, bislang gilt die EBV-Infektion als eine Ursache für die Entstehung eines Hodgkin Lymphoms (Kapatai und Murray 2006).

Was eine latente Infektion mit der Prognose eines Hodgkin Lymphoms zu tun haben könnte, wird noch diskutiert (Massini et al. 2009). So scheinen junge Erwachsene etwas bessere klinische Langzeitergebnisse im Verlauf der Erkrankung zu haben, wenn im Tumor das EBV-Genom nachgewiesen wurde (Flavell 2003; Glavina-Durdov et al. 2001; Jarrett 2005; Kwon et al. 2006). Bei Patienten über 50 Jahre verschlechtern sich dagegen die klinischen Langzeitergebnisse bei positivem EBV-Nachweis (CA Clarke et al. 2011; Diepstra et al. 2009; Glavina-Durdov et al. 2001; TH Keegan et al. 2005).

Die Hypothese, dass ein positiver EBV-Nachweis in Hodgkin Lymphomen Einfluss auf die Prognose des Patienten habe, stößt auf Widerspruch. Es gibt Studien, die über eine bessere Prognose von EBV-positiven als EBV-negativen Lymphomen berichten (TH Keegan et al. 2005), andere dagegen bringen einen positiven EBV-Status in Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose (Claviez 2005).

Des Weiteren wird über therapeutische Möglichkeiten der Erkrankung in Zusammenhang mit einer latenten EBV Infektion diskutiert (Bollard et al. 2008; Cohen et al. 2008).

Die Expression der verschiedenen Latenzmuster des EBV scheint an die B-Zellphysiologie angepasst zu sein. Direkt nach der Infektion wird Latenzmuster III exprimiert (Alfieri et al. 1991).

Es wird vermutet, dass das Virus zunächst naive B-Zellen infiziert und während deren Entwicklung von Latenzmuster III zu Latenzmuster 0 in den B-Gedächtniszellen wechselt (Thorley-Lawson 2001). Die Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen entstehen vermutlich aus präapoptotischen Keimzentrumszellen. Indem die Gene entsprechend Latenzmuster II exprimiert werden, werden diese Zellen vor der Apoptose geschützt und über verschiedene Signalwege die Proliferation und Entdifferenzierung angeregt (Massini et al. 2009). Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen exprimieren nicht die typischen Oberflächenmerkmale von B-Zellen, sondern Mutationen, die unter anderem den B-Zell-Rezeptor imitieren, wodurch die Zellen dem Immunsystem und somit der Apoptose entgehen (Kanzler et al. 1996; Niedobitek et al. 1992).

Der Einfluss von EBV auf die Entstehung eines Hodgkin Lymphoms ist bereits vielfach untersucht worden. In ca. 40% der Hodgkin Lymphome kann EBV nachgewiesen werden. Es gibt eine Vielzahl von Hinweisen, die für einen großen Einfluss von EBV auf die Entstehung eines Hodgkin Lymphoms sprechen. Auf epidemiologischer Ebene gibt es die Assoziation einer Erkrankung an einem Hodgkin Lymphom mit der Erkrankung an Infektiöser Mononukleose. Das Virus nimmt zudem Einfluss auf die menschlichen B-Zellen während der verschiedenen Entwicklungsstadien und nicht zuletzt können Virus-Genome in Hodgkin-Lymphomgewebe bzw. Hodgkin-Zellen sowie Reed-Sternberg-Zellen gehäuft nachgewiesen werden (Massini et al. 2009). Die für das Hodgkin Lymphom charakteristischen Zellen entstehen, wie oben beschrieben, vermutlich aus B-Lymphozyten des Keimzentrums (Kanzler et al. 1996) und enthalten in EBV-positiv getesteten Hodgkin Lymphomen zu 100% das EBV Genom.

Im Zusammenhang mit dem vielfältigen Einfluss von miRNAs im Allgemeinen sowie speziell des Epstein-Barr-Virus, ist das Ziel dieser Studie, eine ergänzende Methode zum Nachweis von EBV mit Hilfe dessen miRNAs in Hodgkin Lymphomen und anderen B-Zell-proliferativen Erkrankungen zu entwickeln. Im weiteren Verlauf wird zudem detailliert auf die Bedeutung des Epstein-Barr-Virus und den Einfluss dessen miRNAs auf die Wirtszelle insbesondere im Zusammenhang mit Krebserkrankungen und auch chronisch entzündlichen Erkrankungen am Beispiel der Multiplen Sklerose eingegangen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Tabelle 2: Lymphomproben

Diagnose	EBV-Status (EBER-<i>in-situ</i>- Hybridisierung)	Herkunft der Gewe- beprobe	Anzahl der Fäl- le
Hodgkin Lymphom	negativ	1	21
Hodgkin Lymphom	positiv	1	19
Diffus großzelliges B- Zell Lymphom	negativ	2	15
Diffus großzelliges B- Zell Lymphom	positiv	2	3
Indolente Lymphome	negativ	2	1
Lymphomatoide Granulomatose	positiv	2	2

1 = Institut für Neuropathologie der Universität Würzburg

2 = Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Herkunft
Avidin-Biotin	Dako, Hamburg, Deutschland
Citratpuffer	Merck, Millipore, Deutschland
Chloroform	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
DAB (3,3'-diaminobenzidine)	Dako, Hamburg, Deutschland

2. Material und Methoden

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)	Merck KGaA, Deutschland
Ethanol, 96%	Merck, Millipore, Deutschland
10 %FCS (fetal calf serum)	Biochrom AG, Deutschland
Formalin (37%)	Merck, Millipore, Deutschland
3% H ₂ O ₂ (30% solution)	Merck, Millipore, Deutschland
<i>Lysis Puffer für FFPE :</i> 50 mMTris 25 mM EDTA, 500 mM NaCl 0.1% Nonidet® P-40, 1% SDS 1/10 volume Proteinase K (Sigma-Aldrich)	Merck, Millipore, Deutschland
MgCl ₂	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Qiazol Lysis Reagent	Quiagen, Deutschland
PBS	Merck, Millipore, Deutschland
RNase freies Wasser	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

2. Material und Methoden

Tabelle 4: Antikörper und Enzyme

Antikörper/Enzyme	Herkunft
AmpliTaq gold Polymerase	qPCR Core Kit RT-QP 73-05, Eurogentec, Seraing, Belgien
EBER 1,2	EBER <i>ISH</i> wurde bei Dr. Mottok, Institut für Pathologie, Würzburg, Deutschland durchgeführt
MiRNA-spezifische Primer	Eurogentec, Köln, Deutschland
LMP-1-Antikörper	Dako, Hamburg, Germany
<i>Master mix:</i> dNTPs, Multi Scribe Reverse Transkriptase, Revers-Transkriptions Puffer, RNAse Inhibitor Multiscribe rot	qPCR Core Kit RT-QP 73-05, Eurogentec, Seraing, Belgien
RNU6B	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 5: Kits

Kits	Herkunft
qPCR Core Kit RT-QP 73-05	Eurogentec, Seraing, Belgien
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Deutschland
TaqMan Micro RNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Deutschland

2. Material und Methoden

Tabelle 6: Geräte und Software

Geräte/Software	Herkunft
Microsoft Excel 2007/2010	Microsoft Corporation
GraphPad Prism 5.01	GraphPad, USA
IQ5 Cycler: <ul style="list-style-type: none"> • iQ5 Optical System Software • iQ5 Real-Time PCR Detection System 	Biorad, München, Deutschland
NanoDrop	Thermo scientific/Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland
Panther Classification System (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships)	http://pantherdb.org/
Targetscan http://www.targetscan.org	Whitehead Institute for Biomedical Research

Tabelle 7: Primer*

EBV-miRNA	Oligo	Sequenz
BHRF1-1	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CGGCAATTCA GTTGAG AACTCCGG
	Forward	ACACTCCAGCTGGGUAACCUGAUCAGCCCC
	Probe	TTCAGTTGAG AACTCCGG
BHRF1-2	RT	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTTCAATTT
	Forward	ACACTCCAGCTGGGUAUCUUUUGCGGCAGA
	Probe	TTCAGTTGAG TTCAATTT

2. Material und Methoden

Tabelle 7: Primer*

BHRF1-2*	RT	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGCTATCTG
	Forward	ACACTCCAGCTGGGAAATTCTGTTGCAGCA
	Probe	TTCAGTTGAGGCTATCTG
BHRF1-3	RT	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGTGTGCTT
	Forward	ACACTCCAGCTGGGUAACGGGAAGUGUGUA
	Probe	TTCAGTTGAG GTGTGCTT
BART1-5p	RT	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACAGCACG
	Forward	ACACTCCAGCTGGGTCTTAGTGGAAGTGAC
	Probe	TTCAGTTGAG ACAGCACG
BART1-3p	RT	CTCAACTGGTGTCTGGAGT CGGCAATTCA GTTGAG AGACATAG
	Forward	ACACTCCAGCTGGGTAGCACCGCTATCCAC
	Probe	TTCAGTTGAG AGACATAG
BART2-5p	RT	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGCAAGGGC
	Forward	ACACTCCAGCTGGGTATTTTCTGCATTCGC
	Probe	TTCAGTTGAG GCAAGGGC
BART2-3p	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CGGCAATTCA GTTGAG TTTATTTT
	Forward	ACACTCCAGC TGGG AAGGAGCGATTTGGAG
	Probe	TTCAGTTGAGTTTATTTT
BART3	RT	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAGCACAAAC
	Forward	ACACTCCAGCTGGGAACCTAGTGTTAGTGT
	Probe	TTCAGTTGAG AGCACAAAC
BART3*	RT	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACACCTGG
	Forward	ACACTCCAGCTGGGCGCACCCTAGTCACC
	Probe	TTCAGTTGAG ACACCTGG
BART4	RT	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAGCACACC
	Forward	ACACTCCAGCTGGGGACCTGATGCTGCTGG
	Probe	TTCAGTTGAG AGCACACC
BART5	RT	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCGATGGGC
	Forward	ACACTCCAGCTGGGCAAGGTGAATATAGCT
	Probe	TTCAGTTGAG CGATGGGC

2. Material und Methoden

Tabelle 7: Primer*

BART6-5p	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CGGCAATTCA GTTGAG CCTATGGA
	Forward	ACACTCCAGC TGGG UAAGGUUGGUCCAAUC
	Probe	TTCAGTTGAG CCTATGGA
BART6-3p	RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCTAAGGC
	Forward	ACACTCCAGCTGGGCGGGGATCGGACTAGC
	Probe	TTCAGTTGAG TCTAAGGC
BART7	RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCCCTGGAC
	Forward	ACACTCCAGCTGGGCATCATAGTCCAGTGT
	Probe	TTCAGTTGAG CCCTGGAC
BART7*	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CGGCAATTCA GTTGAG TGTTTCAT
	Forward	ACACTCCAGC TGGG CCTGGACCTTGACTAT
	Probe	TTCAGTTGAG TGTTTCAT
BART8	RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTGTACAA
	Forward	ACACTCCAGCTGGGTACGGTTTCCTAGATT
	Probe	TTCAGTTGAG CTGTACAA
BART8*	RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTACGACC
	Forward	ACACTCCAGCTGGGGTCACAATCTATGGGG
	Probe	TTCAGTTGAG CTACGACC
BART9	RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTACGGGA
	Forward	ACACTCCAGCTGGGTAACACTTCATGGGTC
	Probe	TTCAGTTGAG CTACGGGA
BART9*	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CGGCAATTCA GTTGAG GTTTCCAA
	Forward	ACACTCCAGC TGGG TACTGGACCCTGAATT
	Probe	TTCAGTTGAGGTTTCCAA
BART10	RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACAGCCAA
	Forward	ACACTCCAGCTGGGACATAACCATGGAGTT
	Probe	TTCAGTTGAG ACAGCCAA
BART10*	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CGGCAATTCA GTTGAG TGTACAGA
	Forward	ACACTCCAGC TGGG GCCACCTCTTTGGTTC
	Probe	TTCAGTTGAG TGTACAGA

2. Material und Methoden

Tabelle 7: Primer*

BART11-5p	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CGGCAATTCA GTTGAG CAACTAGC
	Forward	ACACTCCAGC TGGG UCAGACAGUUUGGUGC
	Probe	TTCAGTTGAG CAACTAGC
BART11-3p	RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGGCAGTCA
	Forward	ACACTCCAGCTGGGACGCACACCAGGCTGA
	Probe	TTCAGTTGAG GGCAGTCA
BART12	RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAAACCACA
	Forward	ACACTCCAGCTGGGTCCTGTGGTGTGGT
	Probe	TTCAGTTGAG AAACCACA
BART13	RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCAGCCGT
	Forward	ACACTCCAGCTGGGTGTAACCTGCCAGGGA
	Probe	TTCAGTTGAG TCAGCCGT
BART13*	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CGGCAATTCA GTTGAG CTGTACGA
	Forward	ACACTCCAGC TGGG AACCGGCTCGTGGCTC
	Probe	TTCAGTTGAG CTGTACGA
BART14	Es war nicht möglich, spezifische Primer für diese miRNA zu erstellen	
BART14*	RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGATCCCTAC
	Forward	ACACTCCAGCTGGGTAAAUGCTGCAGTAGT
	Probe	TTCAGTTGAG ATCCCTAC
BART15	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CGGCAATTCA GTTGAG TCAAGGAA
	Forward	ACACTCCAGC TGGG GUCAGUGGUUUUGUUU
	Probe	TTCAGTTGAGTCAAGGAA
BART16	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CGGCAATTCA GTTGAG AGAGCACA
	Forward	ACACTCCAGC TGGG TTAGATAGAGTGGGTG
	Probe	TTCAGTTGAGAGAGCACA
BART17-5p	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CGGCAATTCA GTTGAG CTTGTATG
	Forward	ACACTCCAGC TGGG UAAGAGGACGCAGGCA
	Probe	TTCAGTTGAG CTTGTATG
BART17-3p	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CGGCAATTCA GTTGAG ACTAAGGG
	Forward	ACACTCCAGC TGGG UGUAUGCCUGGUGUCC
	Probe	TTCAGTTGAG ACTAAGGG

Tabelle 7: Primer*

BART18-5p	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CCGCAATTCA GTTGAG TGTATAGG
	Forward	ACACTCCAGC TGGG UCAAGUUCGCACUUC
	Probe	TTCAGTTGAG TGTATAGG
BART18-3p	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CCGCAATTCA GTTGAG GACGAAGC
	Forward	ACACTCCAGC TGGG TATCGGAAGTTTGGGC
	Probe	TTCAGTTGAGGACGAAGC
BART19-5p	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CCGCAATTCA GTTGAG AGCATTCC
	Forward	ACACTCCAGC TGGG UUUUGUUUGCUUGGGA
	Probe	TTCAGTTGAG AGCATTCC
BART19-3p	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CCGCAATTCA GTTGAG AGCATTCC
	Forward	ACACTCCAGC TGGG UUUUGUUUGCUUGGGA
	Probe	TTCAGTTGAG AGCATTCC
BART20-5p	RT	CTCAACTGGT GTCGTGGAGT CCGCAATTCA GTTGAG GGAATGAA
	Forward	ACACTCCAGC TGGG UAGCAGGCAUGUCUUC
	Probe	TTCAGTTGAG GGAATGAA
BART20-3p	RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGGTAACAG
	Forward	ACACTCCAGCTGGGCATGAAGGCACAGCCT
	Probe	TTCAGTTGAG GGTAACAG
BART22	RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCA GTTGAGACTACTAG
	Forward	ACACTCCAGCTGGGTTACAAAGTCATGGTC
	Probe	TTCAGTTGAG ACTACTAG

*alle von Metabion, Martinsried, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebeproben:

Insgesamt haben wir 40 Formalin-fixierte paraffinisierte Hodgkin-Lymphom-Gewebeproben und 21 Proben anderer Gewebeentitäten in unserer Studie untersucht. Hier handelte es sich um Gewebeproben, die eine maligne B-Zell-Proliferation aufweisen, so zum Beispiel diffus großzellige B-Zelllymphome, lymphomatoide Granulomatose und folliculäre B-Zelllymphome (s. Tabelle 2). Alle Biopsien wurden für rein diagnostische Zwecke genutzt. Die Proben wurden aus archiviertem Gewebe entnommen und durch das

Institut für Pathologie der Universität Würzburg sowie das Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen diagnostiziert und bereitgestellt.

In der Gruppe der Hodgkin Lymphome wurden 19 Proben EBV-positiv getestet und 21 EBV-negativ. In der Gruppe der Gewebeproben mit maligner B-Zell Proliferation wurden fünf Proben EBV-positiv und 16 Proben EBV-negativ getestet. Dies wurde mit Hilfe der EBER-*in-situ*-Hybridisierung sowie Immunhistochemie gegen LMP1 durchgeführt. Die *In-situ*-Hybridisierung wurde im Institut für Pathologie der Universität Würzburg durchgeführt, die Immunhistochemie im Institut für Neuropathologie in Göttingen.

2.2.2 Immunhistochemie und *In-situ*-Hybridisierung

Mit Hilfe der Immunhistochemie (IHC) können Proteine oder andere Strukturen im Gewebe sichtbar gemacht werden, indem sie mit spezifischen Antikörpern markiert werden. Zum Teil sind diese Antikörper auch mit Fluoreszenzfarbstoffen beladen, dann spricht man von Immunfluoreszenz (Lang 2013). Dies hilft z.B. für die Lokalisierung bestimmter Proteine oder anderer Zellbestandteile in Gewebe.

In Bezug auf EBV kann mit Hilfe dieser Methode ein Virusbefall in Gewebeproben nachgewiesen werden, indem spezifische Antigene markiert und sichtbar gemacht werden, in unserem Fall durch Antikörper gegen LMP1.

In unserem Projekt wurden für die Diagnostik und Detektion des EBV-Status ca. 3 µm dicke Schnitte der Formalin fixierten Gewebeproben angefertigt. Diese wurden für 15 Minuten bei 800 Watt in Citratpuffer in der Mikrowelle behandelt, um die Antigene sichtbar zu machen. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Schnitte in 3% H₂O₂ in PBS inkubiert. Im Folgenden wurden die Schnitte in 10%igem Kalbserum für 10 Minuten bei Raumtemperatur eingelegt. Die gewaschenen Schnitte wurden dann mit Antikörpern gegen LMP1 (Dako, Hamburg) belegt. Die primär gebundenen Antikörper wurden mit Hilfe der Avidin-Biotin-Komplexbildung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen (alles von Dako, Hamburg) sichtbar gemacht.

Bei der *In-situ*-Hybridisierung handelt es sich um eine Methode, bestimmte RNA oder DNA-Stränge in Gewebe nachzuweisen. Hierfür wird die gesuchte Nukleinsäure mit einer spezifischen Sonde belegt, welche komplementäre Basen enthält. Über die Basenpaarung wird dann die gesuchte Nukleinsäure markiert. Oft sind die Sonden auch mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert, um die gesuchte Nukleinsäure sichtbar zu machen (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung = FISH) (Levsky and Singer 2003).

Bei der EBER-*in-situ*-Hybridisierung werden die in EBV enthaltenen EBER-RNA-Stränge mit entsprechenden komplementären und markierten Sonden belegt. Hierbei wird die Komplexbildung der markierten Sonde mit der EBER-RNA mit Hilfe von gezielten Antikörpern sichtbar gemacht. Dies geschieht durch eine enzymatische Umsetzung, durch welche ein chromogenes Signal und damit ein lichtmikroskopisch sichtbares Farbsignal entsteht. Der Vorteil hierbei ist, dass EBV-Befall nicht nur nachgewiesen sondern auch gleichzeitig in der Gewebeprobe lokalisiert wird (Khan et al. 1992; Murphy et al. 1990).

Die EBER-*in situ*-Hybridisierung wurde für unser Projekt in Würzburg nach dem bekannten Protokoll durchgeführt (Niedobitek et al. 1992).

In Kürze beschrieben wurden zunächst EBER-spezifische Proben vorbereitet. Um die Sensitivität zu erhöhen, nimmt man EBER1 und EBER2-Proben. Im Anschluss wurden sense- und antisense-Transkripte mit Hilfe einer T7- oder T3-RNA-Polymerase hergestellt (Würzburg). Für die *In-situ*-Hybridisierung wurden die paraffinisierten Gewebeproben entwachst und rehydriert, dann in 0,2 N HCl und 0,125mg/ml Pronase gelegt. Diesem folgte die Acetylierung mit 0,1 mol/l Triethanolamin (pH 8,010) und 25% Essigsäureanhydrid. Darauf folgte die schrittweise Dehydratation durch verschieden prozentige Ethanole. Von dem Produkt wurden Schnitte angefertigt und über Nacht bei 55°C hybridisiert, im Anschluss gewaschen und entwickelt.

2.2.3 Deparaffinisierung und RNA-Extraktion

Hier geht es darum, Nukleinsäuren aus fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben aufzureinigen. Die Deparaffinisierung und nachfolgende RNA-Extraktion aus den Gewebeproben in unserem Projekt wurde in Anlehnung an bereits bekannte und veröffentlichte Protokolle durchgeführt (Eisele et al. 2012; Junker et al. 2009). In Kürze beschrieben wurde das Formalin-fixierte und in Paraffin gebettete Gewebe in einer Pufferlösung (50mmol Tris, 25mmol EDTA, 500mmol NaCl, 0,1% Nonidet® P-40, 1% SDS) mit 1/10 Proteinase K (Sigma-Aldrich) in ein Reaktionsgefäß gefüllt und für 18 Stunden bei 60°C inkubiert. Um die Lösung des Gewebes zu verbessern, wurden die Tubes alle 30 Minuten mit 1000 Umdrehungen pro Minute für fünf Minuten geschüttelt. Unter Verwendung des miRNeasy mini Kits (Qiagen, Hilden) wurde die RNA aus dem Gewebe extrahiert, gemäß dem vorgegebenen Protokoll des Herstellers. Hierfür wurden die Gewebeproben mit einer auf Phenol und Guanidinthiocyanat basierenden Lösung und durch mechanische Einwirkung homogenisiert. Durch die Zugabe von Chloroform und anschließende Zentrifugation erfolgte die Phasentrennung in drei Phasen. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig

abpipettiert und zur Bindung der RNA mit 100%igem Ethanol versetzt. Die nachfolgenden Waschungen dienen der Reinigung der RNA. Im letzten Schritt wurde die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert (Qiagen 2007).

Die Konzentration an RNA wurde über den NanoDrop (Thermo scientific/Gerhard Menzel, Braunschweig) gemessen. Dieser fungiert wie ein Spektralphotometer. Hierbei wurde die RNA-Lösung auf die Messebene pipettiert. Durch Oberflächenspannung entsteht hier eine Flüssigkeitssäule zwischen den optischen Fasern des Gerätes, durch welche schließlich die Messung erfolgt. Diese beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz, welches die Abnahme monochromatischen Lichts bei Durchdringen eines absorbierenden Stoffes erklärt. Über die optische Dichte bei 260 nm wird dann die Konzentration der RNA bestimmt. Die fertig extrahierten Proben wurden anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.3 PCR- Reaktion

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist eine der häufigsten und wichtigsten Methoden im Bereich der Molekularbiologie zur Vervielfältigung von DNA und besteht im Prinzip aus drei Schritten: Denaturierung, Anlagerung (Annealing) und Elongation. Im Reaktionsansatz befindet sich in einer Pufferlösung die gewünschte Ziel-DNA, passende Primer (kurze DNA Sequenzen, die an die Ausgangs-DNA binden), Desoxynukleotide (dNTPs) und eine hitzestabile DNA Polymerase. Diese wird aus *Thermus aquaticus*, einem thermophilen grampositiven Bakterium, welches in heißen Quellen und Geysiren beheimatet ist, verwendet. Daher kommt der Name taq Polymerase.

Während der Denaturierung wird bei einer Temperatur von 90-95°C die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Im nächsten Schritt wird die Temperatur soweit gesenkt, dass die Primer an ihre jeweils komplementären Teile der Ausgangs-DNA binden können, um die Renaturierung der beiden Einzelstränge zu erreichen (Annealing). Die Temperatur, bei der dieser Vorgang geschieht, ist für jeden Primer spezifisch und kann mit bestimmten Formeln ausgerechnet werden. Danach wird die Temperatur wiederum auf ca. 72-75°C erhöht, damit die taq Polymerase ausgehend von den Primern den komplementären Strang der aufgetrennten Einzelstränge synthetisieren kann. Das Ganze geschieht in einem sogenannten Thermocycler, also einem zyklisch arbeitenden Thermoelement. Die verwendeten Primer sind meist zwischen 15 und 30 Basenpaaren lang, von denen die letzten fünf bis acht Basen des 3'-Endes genau komplementär zur Ziel-DNA sein müssen, da die Polymerase ein intaktes 3'-Ende benötigt. Von dort aus wird dann der komplementäre

Strang synthetisiert und die Ausgangs-DNA über mehrere Zyklen exponentiell vervielfältigt (Reinard 2010).

Es gibt verschiedene Unterformen bzw. Spezialisierungen der PCR, wie z.B. die reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) oder die quantitative PCR (qPCR), auf welche im Folgenden weiter eingegangen wird.

Die RT-PCR ist im Prinzip eine Kombination aus zwei verschiedenen Reaktionen. Das zentrale Enzym hierfür ist die reverse Transkriptase. Sie schreibt mit Hilfe spezifischer Primer einzelsträngige RNA in komplementäre DNA (complementary/cDNA) um, welche dann mit einer PCR Reaktion vervielfältigt wird. Die cDNA kann nun in weiteren Reaktionsschritten verwendet werden.

Für die qPCR wird ein spezielles Gerät benötigt, welches eine Kombination aus einem Thermocycler und einem Fluoreszenzphotometer ist. Hierbei wird die Menge an entstehender DNA während der Amplifikation gemessen. Der Unterschied zur konventionellen PCR ist die Messung in Echtzeit und nicht erst am Ende der Reaktion. Dadurch kann die anteilige Menge einer bestimmten Ausgangs-DNA-Sequenz in einer Probe ermittelt werden. Mit Hilfe eines Farbstoffes, der an die dsDNA bindet, wird eine Fluoreszenz verursacht, die im Photometer gemessen wird. Die Intensität dieses Fluoreszenz Signals ist proportional zur Menge der gebildeten DNA. Da jedoch jede gebildete DNA gemessen wird, sind auch falsch hohe Ergebnisse möglich, die dann als Verunreinigung gewertet werden müssen. In unserer Studie wurden daher farbmarkierte Sonden verwendet. Indem die Polymerase durch ihre Exonuklease-Funktion den Nukleinsäurestrang der Sonde zerstört, werden Probe und Quencher getrennt und eine spezifische Fluoreszenz erzeugt.

Werden RT-PCR und qPCR in Kombination verwendet, können wiederum Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge an mRNA im Gewebe gezogen werden.

Die isolierte RNA aus unseren deparaffinisierten Proben wurde mit Hilfe der RT-PCR zunächst in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das TaqMan Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) verwendet und analog zum Protokoll des Herstellers gearbeitet. Es wurde zunächst der RT-Master-Mix (100 mM dNTPs mit dTTP, Multiscribe Reverse Transkriptase 50U/ μ L, RT Puffer, RNase-Inhibitor, Nuklease-freies Wasser) hergestellt, dieser dann mit den spezifischen Primern gemischt, 5 μ l isolierte RNA hinzugegeben und herunterzentrifugiert. Das Gemisch wurde auf eine RT-Platte pipettiert und im Thermocycler nach folgendem Protokoll transkribiert. Bei 16°C erfolgte für 2 Minuten die Annealing Phase, anschließend im Wechsel 42°C für eine Minute und 50°C für 1 Sekunde

die reverse Transkription der RNA in cDNA. Bei der erneuten Erhitzung auf 85° erfolgte die Denaturierung der reversen Transkriptase, schließlich wurden die cDNA Stränge auf 4°C heruntergekühlt und bei -20° C gelagert.

Die Gesamtmenge an transkribierter RNA, die in unserem Projekt pro PCR-Reaktion als Äquivalent eingesetzt wurde, betrug 10ng für jede der EBV-miRNAs.

Die 39 EBV-spezifischen Primer für die PCR-Reaktion wurden in Anlehnung an vorangegangene Veröffentlichungen in der Literatur konstruiert (vgl. Tabelle 7) (Cosmopoulos et al. 2008). Lediglich für die miRNA BART14 konnte kein passender Primer konstruiert werden.

Anschließend wurde die qPCR Reaktion mit dem qPCR Kore Kit analog zu dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurde qPCR Master Mix (PCR-Puffer, 25mM MgCl₂, 2,5mM dNTP, RNase-freies Wasser) hergestellt, mit Uracil-N-Glykosylase (UNG: Ein Enzym, das hinzu gefügt wird, um Endproduktkontamination zu vermeiden) und der Polymerase AmpliTaq Gold 5U/μL vermischt, die spezifischen Primer hinzugefügt und auf die Matrizen cDNA Platte pipettiert. Im Thermocycler wurde die qPCR Reaktion nach folgendem Protokoll durchgeführt. Zunächst erfolgte bei 95°C für 10 Minuten die Prä-Denaturierung und Aktivierung der Taq Polymerase. Anschließend wurde im Wechsel 15 Sekunden bei 95°C die Denaturierung und für 1 Minute bei 40°C Annealing und Elongation durchgeführt.

Das Expressionslevel der 39 EBV-miRNAs wurde durch den IQ5 Cycler (Biorad, München) detektiert. Stieg die detektierbare Fluoreszenz logarithmisch an, so wurde für jede Probe (im Bereich dieses Anstieges) ein Cycle-Threshold-Wert (CT-Wert) gesetzt, der ein Maß für das Expressionsniveau der entsprechenden Probe darstellte.

Die relative Expression von EBV-miRNAs in EBV-positiven Hodgkin Lymphomen im Vergleich zu EBV-negativen Hodgkin Lymphomen wurde mit der DeltaDelta-CT-Methode berechnet, wobei die Small-Nucleolar-RNA U6 (RNU6B) als Housekeeping Gen (Referenzgen) verwendet wurde. DeltaDelta-CT bedeutet, dass der Betrag des CT-Wertes der EBV-miRNA der EBV-positiven Hodgkin-Lymphom-Probe vom CT-Wert der RNU6B der EBV-positiven Probe abgezogen wird, hiervon wird wiederum der Betrag des CT-Wertes der EBV-miRNA der EBV-negativen Probe minus dem CT-Wert der RNU6B der EBV-negativen Probe abgezogen. Es handelt sich hierbei aufgrund der Methodik immer noch um einen logarithmischen Wert. Daher konnte nach Delogarithmierung aus diesen Werten die n-fache Expression berechnet werden.

2.2.4 Statistische Analyse

Die unterschiedliche Höhe der miRNA-Expression wurde mit Hilfe der Mann-Whitney-U-Test-Methode verdeutlicht (ein Rangsummentest). Als signifikant wurden P-Werte $<0,05$ festgelegt. Des Weiteren wurden aus den Expressionswerten der miRNAs in den verschiedenen Proben Receiver Operator Characteristic curves (ROC-Kurven) mit Hilfe des Programms GraphPad Prism kalkuliert. Die Fläche unterhalb der Kurve (area under the curve = AUC) stellt hierbei die Diskriminationsfähigkeit der verschiedenen miRNA-Messungen im Hinblick auf die Vorhersage einer EBV-Infektion dar. Jede ROC-Kurve hat einen spezifischen Wendepunkt (cut-off), welcher festlegt, ob die zu beurteilende PCR-Reaktion als positiv oder negativ für die Detektion des Virus und somit den EBV-Status zu bewerten ist. Die statistische Analyse wurde mit den Programmen Excel und GraphPad Prism durchgeführt.

2.2.5 Bioinformatische Prädiktion der Zielgene

Über die Basensequenzen der EBV-miRNAs versuchten wir Zielgene zu ermitteln. Dies wurde mit Hilfe von Targetscan durchgeführt. Targetscan ist ein Computerprogramm, welches potentielle Zielgene von miRNAs auf der Basis von Basenpaarungen, welche zur seed-region der miRNAs passen, ermittelt (Bartel 2009).

Die Ermittlung der Genfunktion erfolgte mit dem **PANTHER** (**P**rotein **A**nalysis **T**hrough **E**volutionary **R**elationships) System. Dies ist ein in der Bioinformatik verwendbares Klassifizierungssystem, welches Gene und Genfunktionen ermittelt. In der Datenbank sind Gene geordnet nach Familie, Subfamilie, molekularer Funktion und Involvierung in biologische Prozesse aufgeführt (Mi et al. 2009; Thomas et al. 2003). Wir nutzten das Programm, um anhand der ermittelten Zielgene potentielle Genfunktionen zu ermitteln.

3. Ergebnisse

3.1 EBV miRNAs sind aus paraffinisiertem Hodgkin-Lymphom-Gewebe gut zu extrahieren.

Im Allgemeinen gilt die Messung von miRNAs in Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (FFPE) als gut durchführbar (Eisele et al. 2012). Daher wurden in unserer Studie auf diese Weise aufbereitete Proben von Hodgkin Lymphomen für die Untersuchung auf EBV spezifische miRNAs verwendet. Hierfür wurde, wie oben beschrieben, die qPCR als geeignete Methode verwendet.

Da diese Methode auch noch bei kleinsten DNA-Fragmenten funktioniert (Reinard 2010), ist jedoch auch die Gefahr der Verunreinigung der Proben und dadurch entstehender falsch positiver Ergebnisse erhöht. Andere Probleme bzgl. der Aussagefähigkeit entstehen durch die Unterschiede in der Art der Durchführung der RNA-Extraktion oder der PCR an sich sowie die unterschiedliche Qualität der Proben. Um also die Vergleichbarkeit und auch die Qualität der Proben sichern zu können, ist die Verwendung eines Referenzgens zur internen Kontrolle der qPCR-Reaktion sinnvoll (Kozera und Rapacz 2013).

In dieser Studie nutzten wir - wie oben bereits erwähnt - RNU6B, eine nicht kodierende RNA-Sequenz, die sich im Nukleolus befindet, als Referenzgen (Carlsson et al. 2010).

Um die Verwendbarkeit der Proben für unsere Versuche zu überprüfen, wurde die RNU6B in allen Proben gemessen. In 36 der 40 verwendeten Proben (alle als Hodgkin Lymphom diagnostiziert), konnte RNU6B über die qPCR detektiert werden, was zeigte, dass die Proben für miRNA-Messungen geeignet waren. Dazu wurde in dieser Studie mit der Roh-CT-Methode gearbeitet. Das bedeutet, dass im Zuge des exponentiellen Anstiegs des Signals bei der qPCR am Umschlagpunkt der sogenannte Cycle-Threshold (CT)-Wert bestimmt wird.

Die Lymphom-Proben, die laut der EBER1-*in-situ*-Hybridisierung einen negativen EBV-Status aufwiesen, zeigten nur gering höhere Roh-CT-Werte (also eine nahezu vergleichbare RNA-Integrität) für das Referenzgen RNU6B als die EBV-positiven. Der mittlere Roh-CT-Wert von RNU6B, gemessen in den EBV-negativen Proben, war 32.31 (SEM = standard error of the mean = 1.87) und der mittlere Roh-CT-Wert in den EBV-positiven Proben war 30.68 (SEM = 1.2).

Eine aufgrund der schlechten RNA-Integrität in unserer Studie nicht anwendbare Möglichkeit, die Qualität der RNA zu bestimmen, war eine direkte Messung z. B. durch den Agilent Bioanalyzer 2100. Dieser wurde 1999 eingeführt um DNA, RNA und Proteinproben auftrennen zu können. Er arbeitet mittels einer Mikrofluid und Lab-on-a-chip-Technologie,

wodurch kleinste RNA-Mengen aufgetrennt und mit einer Fluoreszenzreaktion detektiert werden. Zustande kommt eine Art Elektropherogramm, in dem die Fluoreszenz mit der Menge an RNA korreliert (Mueller et al. 2000; Schroeder et al. 2006).

Die Qualität der RNA wird hier im Allgemeinen mit RIN-Nummern angegeben (RNA integrity number). Diese reichen auf einer Skala von 1 (schlechte Qualität) bis 10 (sehr gute Qualität) abhängig von der Kurve des Elektropherogramms des Bioanalyzers (Schroeder et al. 2006).

Bei der Verwendung von miRNA-Proben, die aus Formalin-fixiertem, paraffinisierten Gewebe extrahiert wurden, wie in unserer Studie, zeigt sich jedoch eine minderwertige Qualität ausgedrückt durch RIN allgemein unter 2,5.

Hieraus könnte man schließen, dass die Verwendung kleinerer RNA-Sequenzen wie miRNAs zur Quantifizierung nicht geeignet sind, da die Qualität mittels dieser Methode als nicht ausreichend bewertet würde (Eisele et al. 2012). Daher verwendeten wir die qPCR-Quantifizierung des Housekeeping-Gens RNU6B, um genauere Angaben über die Qualität einer Probe geben zu können.

3.2 Der EBV-Status von Hodgkin Lymphomen korreliert mit der Expression der EBV-miRNAs

3.2.1 Detektion der EBV-miRNAs mit qPCR

Für die Messung der miRNAs wurden in dieser Arbeit Primer-Proben-Paarungen analog zu bereits veröffentlichten (Cosmopoulos et al. 2008) benutzt. In den mit *In-situ*-Hybridisierung EBV-positiv getesteten Hodgkin Lymphomen konnten alle EBV-eigenen miRNAs detektiert werden bis auf BART19-5p, BART2-3p, BART7, BART7*# und BHRF1-2, welche in keiner der Proben detektiert werden konnten.

Eine geringgradige Expression aller anderen miRNAs konnte jedoch auch in den meisten EBV-negativ getesteten Hodgkin Lymphomen festgestellt werden. Dies könnte möglicherweise auf einer Infiltration der Proben mit latent infizierten EBV-positiven nicht malignen B-Zellen beruhen. Über 90% der kaukasischen Bevölkerung weisen solche EBV-positiven B-Zellen auf (Cohen 2000).

Eine andere Möglichkeit ist, dass ein geringer EBV-Anteil in den meisten Hodgkin Lymphomen vorhanden ist, was durch die Expression von EBV-miRNAs gezeigt werden könnte. Insgesamt zeigte sich in den gesichert EBV-positiven Hodgkin Lymphomen jedoch ein sehr viel höheres Expressionslevel der miRNAs.

Die getesteten miRNAs wurden hierbei unterschiedlich exprimiert.

Dementsprechend zeigte sich bei der Expression der miRNAs BART10, BART14*, BART1-5p, BART2-5p, BART3, BART5, BART6-3p, BART8, BART8* und BART9 ein signifikanter Unterschied zwischen den EBV-positiven und EBV-negativen Hodgkin Lymphomen in Bezug auf den Status, der durch *In-situ*-Hybridisierung ermittelt wurde (U-test: $p < 0,05$).

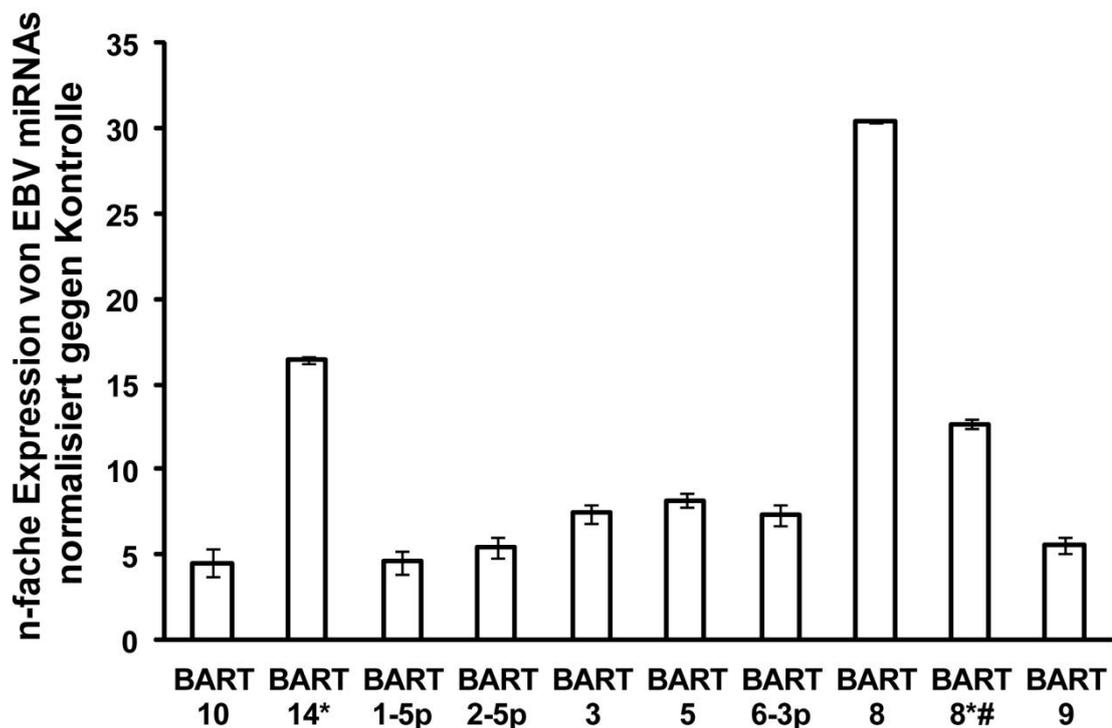


Abbildung 1: MiRNA Expression in EBV-positiven Hodgkin Lymphomen.

Die zehn miRNAs mit der größten Signifikanz wurden mittels qPCR in Hodgkin-Lymphom-Gewebeproben quantifiziert und gegen die Expression des Housekeeping-Gens RNU6B normalisiert. Hier ist die relative Überexpression der jeweiligen miRNAs in EBV-positiv getesteten Proben im Vergleich zu EBV-negativ getesteten dargestellt. In den EBV-positiven Proben konnte eine signifikant höhere Expression der dargestellten miRNAs festgestellt werden als in den EBV-negativ getesteten.

3.1.2 Einordnung der Güte der miRNAs hinsichtlich der Beschreibung des Infektionsstatus einer Formalinprobe

Die sechs miRNAs mit der besten Treffsicherheit hinsichtlich des EBV-Status werden in Abbildung 2 aufgezeigt.

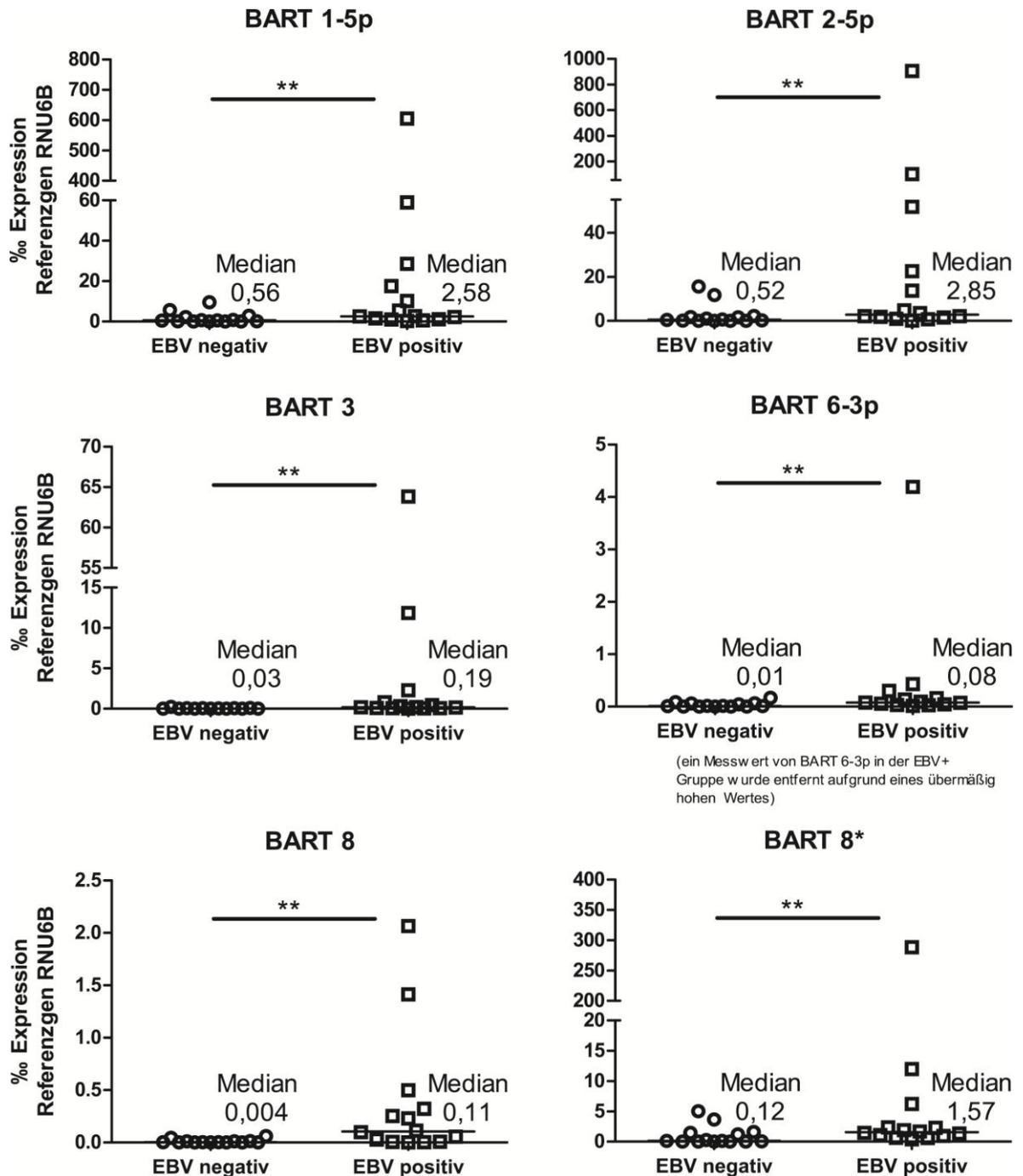


Abbildung 2: Expression der viralen miRNAs in Promille RNU6B

Jeder Punkt repräsentiert die miRNA-Expression in einer Gewebeprobe (der Median aller Proben einer Gruppe ist als Balken dargestellt). Einzelne EBV-positive Hodgkin Lymphome zeigten eine sehr hohe mi-

RNA Expression. Die miRNAs mit der größten Signifikanz zur Differenzierung zwischen EBV-positiven und negativen Proben sind hier dargestellt ($p < 0,01$ Mann-Whitney-U-Test).

In Abbildung 2 werden die Ergebnisse im Detail anhand der delta-CT-Werte in Bezug auf die Expression von RNU6B beschrieben.

Um das diagnostische Potential der verschiedenen EBV-miRNAs für die Bestimmung des EBV Status in Hodgkin Lymphomen festzustellen, erstellten wir Receiver Operating Characteristic Curves (ROC-Kurven) für jede EBV-miRNA.

In einer ROC-Kurve wird die Sensitivität eines Merkmals gegen den Komplementärwert der Spezifität aufgetragen. Das Bild einer Diagonale würde hierbei ein diagnostisches Merkmal ohne jede Vorhersagefähigkeit darstellen. Je „bauchiger“ die Kurve ist, desto größer der Vorhersagewert des Tests. Dieser wird demnach durch die Fläche unter der Kurve, die area under the curve beschrieben (AUC). Ein AUC Wert von 1,0 würde also einer Vorhersagekraft von 100 % entsprechen.

Die ROC-Kurven unserer Studie basieren auf den Daten der Hodgkin Lymphome, die mittels EBER1-*in-situ*-Hybridisierung positiv oder negativ für EBV getestet wurden (EBER1-*in-situ*-Hybridisierung als Goldstandard). Für jede miRNA wurden Sensitivität und Spezifität errechnet und gegeneinander aufgetragen.

Auch die Diskriminationsfähigkeit jeder einzelnen miRNA kann durch die AUC dargestellt werden, in unserem Projekt wurden ROC für jede miRNA erstellt. Die AUC-Werte für jede einzelne miRNA sind in Tabelle 7 dargestellt.

Hierbei zeigte sich, dass vier miRNAs (BART2-5p, BART6-3p, BART8 und BART8*) eine gute Diskriminationsfähigkeit aufwiesen, mit AUC-Werten von 0,8 und 0,9.

Sieben miRNAs (BART10, BART13, BART14*, BART1-5p, BART3, BART5 und BART9) hatten eine durchschnittliche Diskriminationsfähigkeit mit einer AUC zwischen 0,7 und 0,8 unter der Kurve und 13 eine schlechtere mit einer AUC zwischen 0,6 - 0,7.

Bei 14 miRNAs zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen den EBV-negativen und EBV-positiven Proben. Hierdurch wurden also die Merkmale der verschiedenen miRNAs beschrieben. Die ROC-Kurven aller miRNAs sind in Abbildung 3, Beispiele für ROC-Kurven von miRNAs mit besonders guter Diskriminierungsfähigkeit (BART2-5p, BART6-3p, BART8 und BART8*) in Abbildung 4 dargestellt.

3. Ergebnisse

Tabelle 8: miRNAs und AUC Werte mit entsprechender Sensitivität und Spezifität

miRNA	AUC	Cutoff für deltaCT-Wert (CT RNU6B- CT miRNA) bei PCR-Reaktion	Sensitivität	Spezifität
BART 2-5p	0,8	-10,59	92,8%	57,2%
BART 6-3p	0,85	-15,02	85,7%	64,3%
BART 8	0,85	-14,38	64,28%	92,8%
BART 8*#	0,8	-11,01	92,8%	64,3%
BART 10	0,76	-11,9	85,7%	64,3%
BART 13	0,7	-10,51	92,9%	57,1%
BART 14*	0,73	-19,84	92,8%	50%
BART 1-5p	0,79	-10,02	85,7%	71,4%
BART 3	0,78	-13,22	64,2%	85,7%
BART 5	0,73	-13,86	92,8%	50%
BART 9	0,77	-10,90	92,8%	50%
BART 12	0,67	-15,85	92,8%	42,8%
BART 13*	0,65	-16,09	50%	78,6%
BART 15	0,6	-14,55	85,7%	50%
BART 16	0,67	-12,31	78,5%	64,3%
BART 17-3p	0,6	-1,17	71,4%	57,2%
BART 17-5p	0,62	-12,17	71,4%	64,3%
BART 18-3p	0,65	-12,7	92,85%	35,8%
BART 18-5p	0,64	-15,99	42,8%	85,8%
BART 20-5p	0,68	-17,84	78,5%	57,1%
BART 22	0,64	-19,84	92,8%	35,7%
BART 3*#	0,67	-11,47	92,8%	35,7%
BART 6-5p	0,68	-15,29	85,7%	57,1%
BHRF 1-2*	0,69	-12,18	57,1%	78,5%

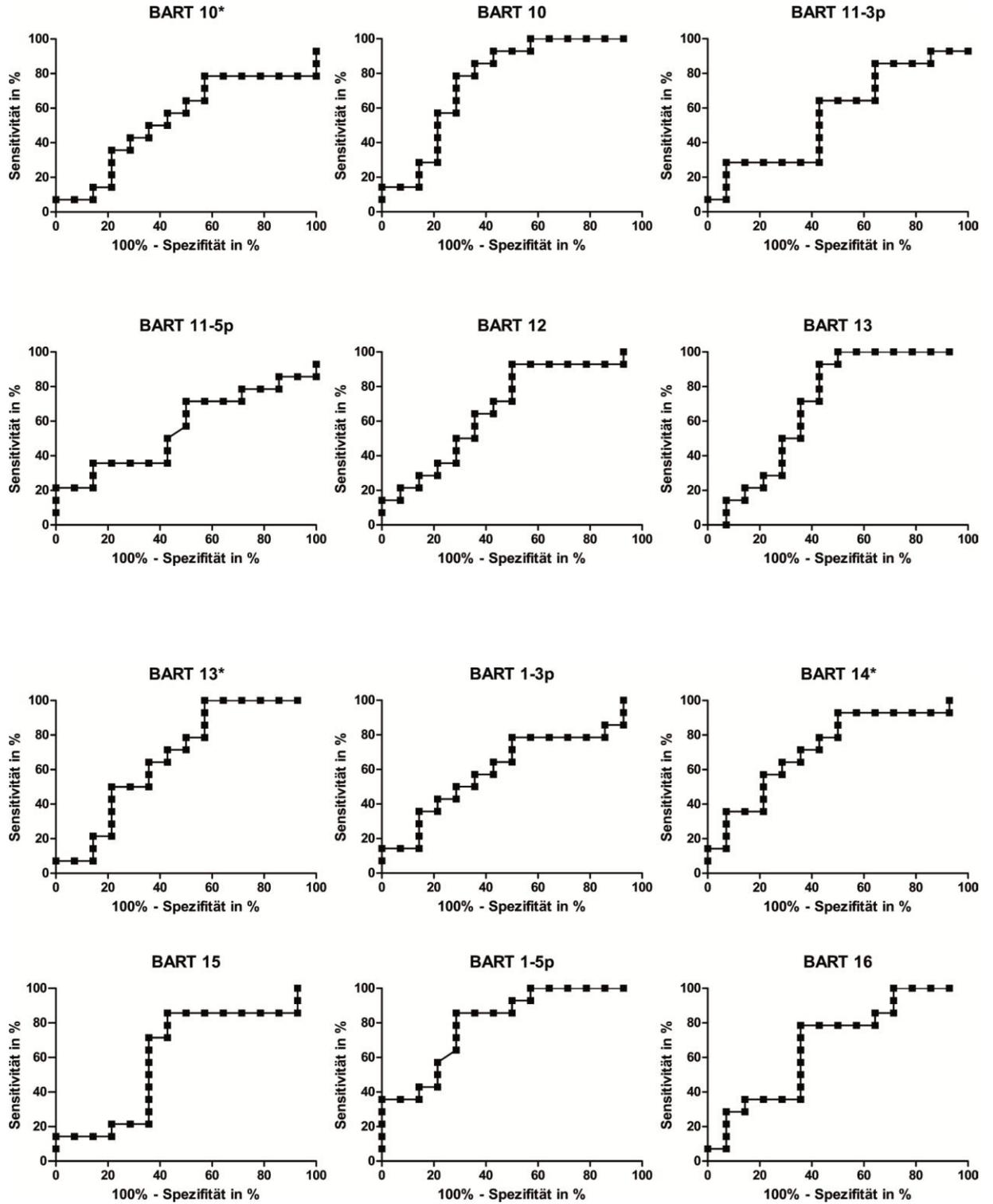
3. Ergebnisse

Tabelle 8: miRNAs und AUC Werte mit entsprechender Sensitivität und Spezifität

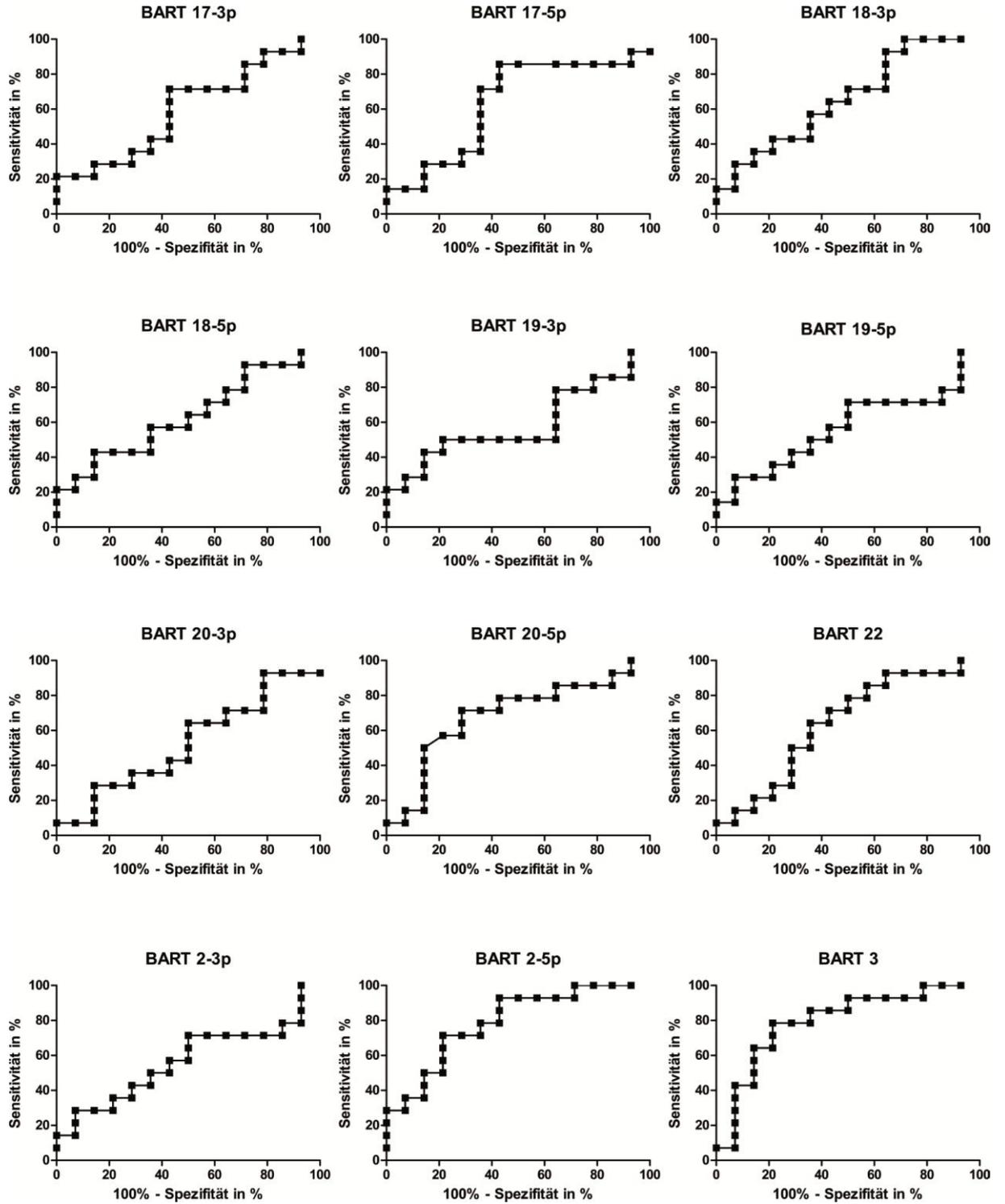
BART 10*	0,54	-9,65	71,4%	42,8%
BART 11-3p	0,55	-10,97	85,7%	35,7%
BART 11-5p	0,56	-5,39	35,7%	85,7%
BART 1-3p	0,59	-20,18	78,5%	50%
BART 19-3p	0,57	1,96	42,8%	85,8%
BART 19-5p	0,56	-19,84	71,4%	50%
BART 20-3p	0,51	-13,99	64,2%	50%
BART 2-3p	0,56	-19,84	71,4%	50%
BART 4	0,55	-9,84	57,1%	64,3%
BART 7	0,56	-19,84	71,4%	50%
BART 7*#	0,51	-18,61	50%	64,3%
BART 9*	0,58	-19,84	71,4%	50%
BHRF 1-1	0,59	-3,1	28,6%	92,9%
BHRF 1-2	0,56	-19,84	71,4%	50%
BHRF 1-3	0,56	-15,45	71,4%	57,2%

Jede ROC-Kurve hat einen spezifischen kalkulierten cut-off-Punkt, welcher festlegt, ob eine qPCR-Reaktion positiv oder negativ zu werten ist. Ergebnisse, die oberhalb des kalkulierten cut-off-Punktes liegen, definieren eine EBV-positive qPCR-Reaktion, Ergebnisse unterhalb des cut-offs eine negative qPCR-Reaktion auf EBV.

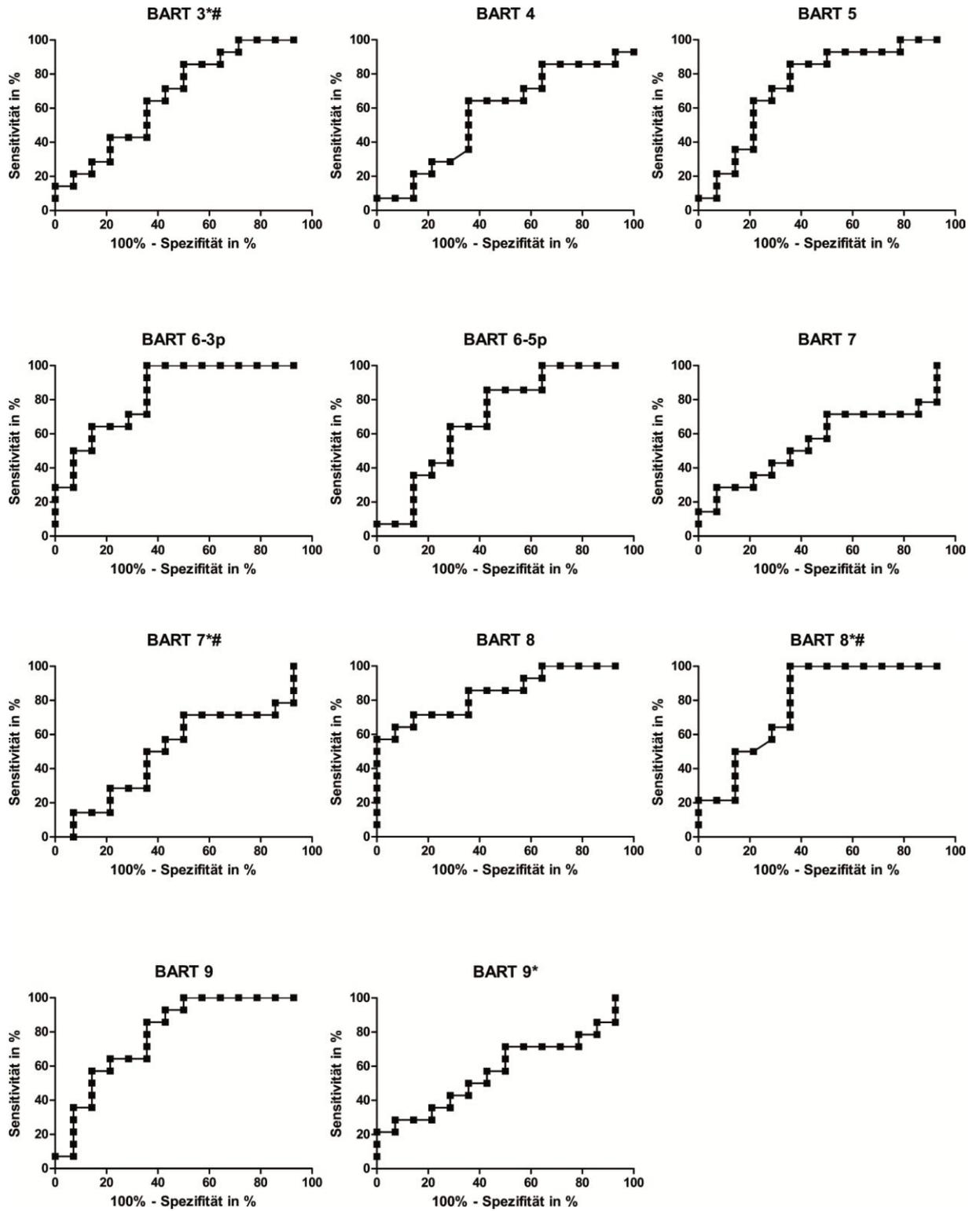
3. Ergebnisse



3. Ergebnisse



3. Ergebnisse



3. Ergebnisse

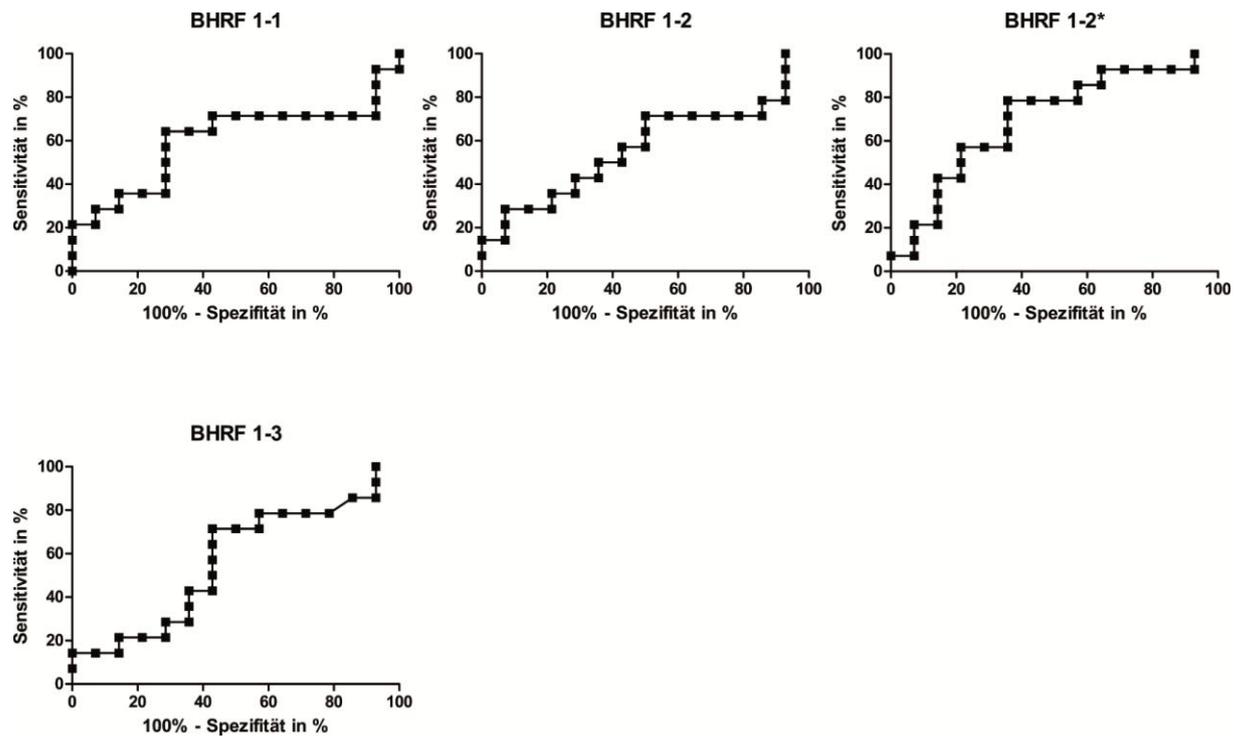


Abbildung 3: **ROC-Kurven aller miRNAS**

Um die Sensitivität und Spezifität der miRNAs bezüglich der Vorhersagewahrscheinlichkeit des EBV-Status bewerten zu können, wurden Receiver Operator Characteristic Curves (ROC) erstellt. Diese basieren auf der relativen miRNA-Expression von EBV-positiv und negativ getesteten Proben. Die Diskriminationsfähigkeit der einzelnen miRNAs ist durch die Fläche unter der Kurve repräsentiert.

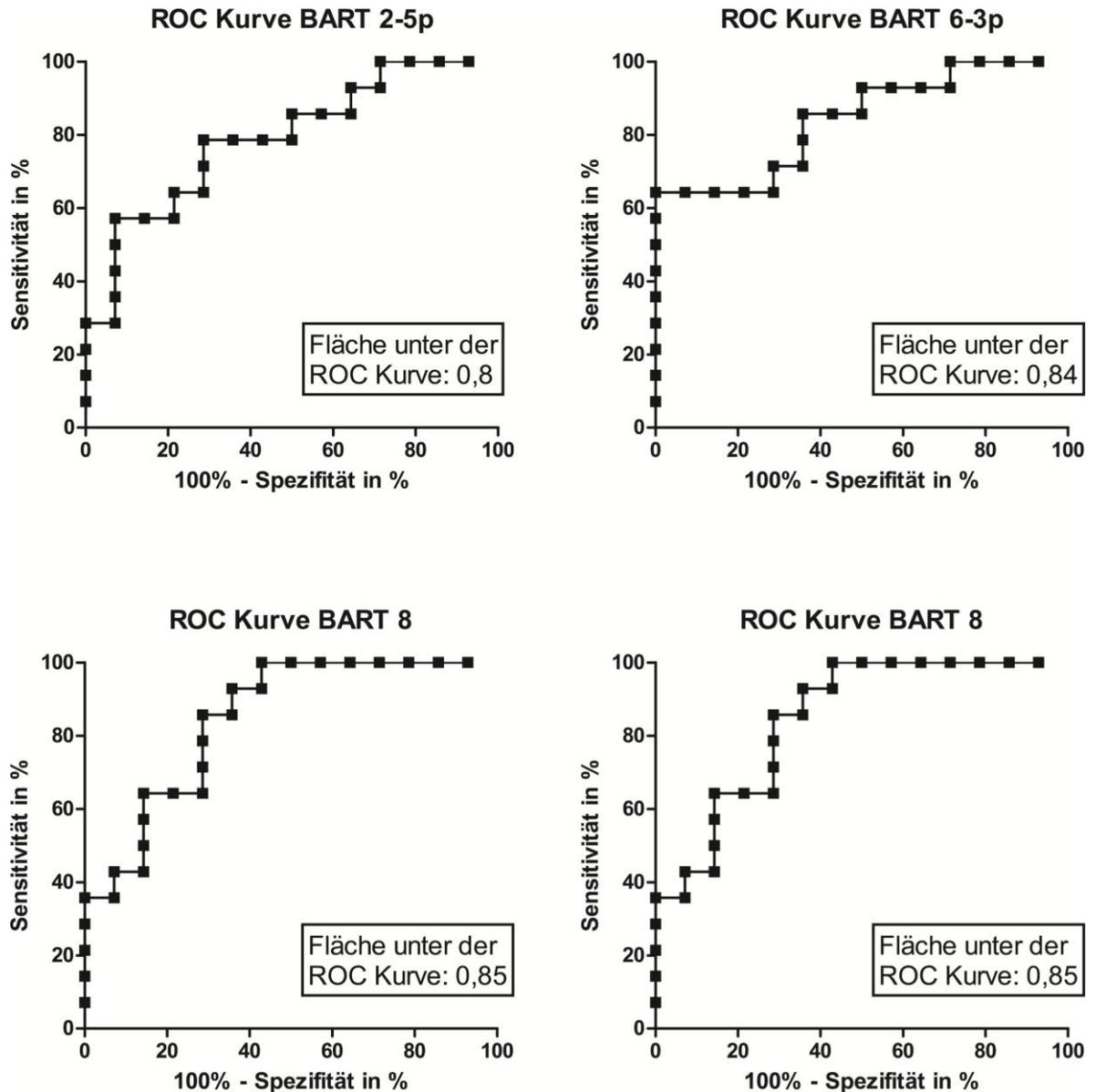


Abbildung 4: ROC Kurven von miRNAs mit besonders guter Diskriminierungsfähigkeit

Diese weisen Werte zwischen 0,8 und 0,9 der Fläche unter der Kurve auf.

3.2.3 EBV-Statusberechnung durch Zusammenfassung unterschiedlicher miRNA-qPCR-Reaktionen

Ob eine Paraffinprobe tatsächlich als EBV-positiv einzustufen ist, lässt sich anhand der Kombination unterschiedlicher EBV-miRNA-Assays herausfinden. Die Kombination der Vorhersagewerte mehrerer EBV-miRNA-Assays (als Summenscore) ist einem einzelnen miRNA-Assay überlegen. Von 25 Hodgkin-Proben (mit ausreichender RNA-Qualität bestimmt mit einer qPCR-Reaktion mit RNU6B) wurden diesbezüglich EBV-miRNA-qPCR-

3. Ergebnisse

Analysen durchgeführt. Die Roh-CT-Werte der ausgewählten EBV-miRNAs dienen als Grundlage für die ROC-Berechnung des Summenscores.

Die Kombination der miRNAs, die eine gute diskriminatorische Qualität bezüglich des EBV-Status aufwiesen (siehe Tabelle 8), zeigte mit einer Sensitivität von 78,57% und einer Spezifität von 92,86% eine höhere Treffsicherheit, den EBV-Status festzustellen, als jede einzelne EBV-miRNA-qPCR. Im Vergleich weist die EBER1-qPCR eine Sensitivität von 71,4% bei identischer Spezifität von 92,86% auf (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: EBER-*in-situ*-Hybridisierung vs. miRNA-Kombination

Goldstandard ist EBER <i>in-situ</i> Hybridisierung		Cutoff	AUC	Sensitivität	Spezifität
Kombination der oben aufgeführten miRNAs	(BART 2-5p, BART 6-3p, BART 8, BART 8*, BART 10, BART 13, BART 14*, BART 1-5p, BART 3, BART 5, BART 9, BART 12, BART 13*, BART 15, BART 16, BART 17-3p, BART 17-5p, BART 18-3p, BART 18-5p, BART 20-5p, BART 22, BART 3*#, BART 6-5p, BHRF 1-2*)	11,00	0,90	78,57%	92,86%
	EBER1-qPCR	-15,16	0,91	71,4%	92,86%

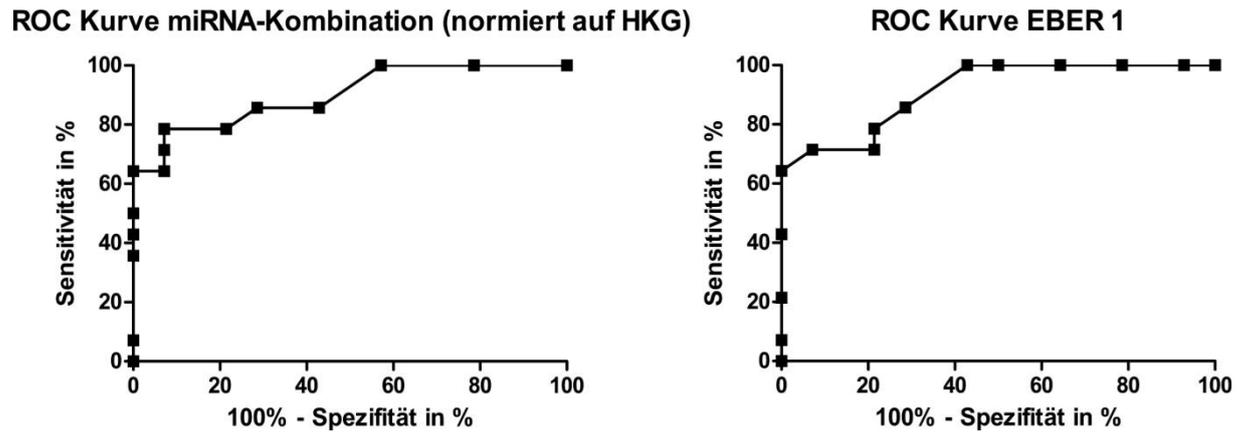


Abbildung 5: **Zusammenfassung der miRNAs im Vergleich zu EBER1**

Die zusammengefassten miRNAs in einen Summenscore (links), abgebildet in einer ROC-Kurve im Vergleich zu der ROC Kurve von EBER 1 (rechts). Beide Verfahren besitzen eine gute Sensitivität und Spezifität (s.o.).

Wurden nur die fünf EBV-miRNAs mit der höchsten Diskriminationsfähigkeit für den EBV-Status benutzt und nicht das vollständige Panel, also BART1-5p, BART2-5p, BART6-3p, BART8 und BART8*#, konnten bei der Bestimmung des EBV-Status eine Sensitivität von 78,57% und eine Spezifität von 85,71% erreicht werden.

Wird der EBV-Status anhand der so zusammengefassten Merkmale bestimmt, so ergibt sich folgendes: die Gruppe der EBV-positiven Hodgkin Lymphome zeigte einen Medianwert von 12,5 positiven EBV-miRNA-qPCR-Reaktionen, während die zuvor mittels EBER-*in-situ*-Hybridisierung EBV-negativ getesteten nur einen Median von 2,5 positiven qPCR-Reaktionen aufwiesen (s. Abb. 6).

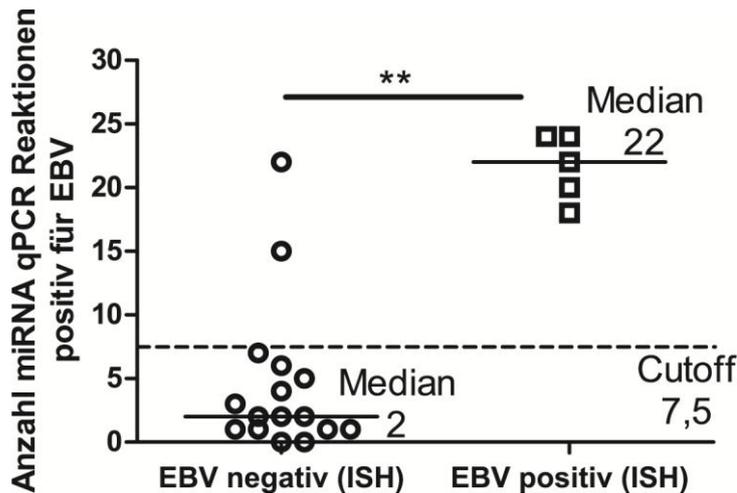


Abbildung 7: EBV-Status in B-Zell-proliferativen Erkrankungen

Die Graphik zeigt die Anzahl an EBV positiven qPCR Reaktionen in der Gruppe anderer pathologischer B-Zell proliferativer Erkrankungen, die negativ für EBV getestet wurden im Vergleich zu den positiv getesteten. Ein gewählter Cutoff Punkt von 7,5 bildet hier eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 87,5%.

3.4 Bioinformatische Prädiktion von EBV-miRNA-Zielgenen

EBV hat einen erheblichen Einfluss auf die zellulären Funktionen einer latent infizierten Zelle (Grundhoff und Sullivan 2011). Auf Basis der Hypothese, dass einige EBV-miRNAs dieselben menschlichen Zielgene beeinflussen, untersuchten wir potentielle menschliche Zielgene der viralen miRNAs, die in EBV-positiven Zellen signifikant hoch exprimiert werden. Hierfür wurde mit Hilfe des Programms Targetscan 4,2 (Grimson et al. 2007; Lewis et al. 2005) eine Computerprogramm gestützte Untersuchung dieser potenziellen Zielgene durchgeführt. Hierbei fanden wir heraus, dass einige menschliche Gene durch mehr als eine EBV-miRNA reguliert zu werden scheinen. Diese 19 Transkripte sind in Tabelle 9 aufgelistet. Mit Hilfe der PANTHER Software (Thomas et al. 2003) führten wir eine Analyse der molekularen Funktionen der möglicherweise durch EBV-miRNAs regulierten Zielgene durch. Dabei zeigte sich insbesondere eine Vielzahl von Genen, die die Transkription beeinflussen, im Vergleich zu den Genen, die Einfluss auf molekulare Funktionen nehmen, basierend auf dem gesamten menschlichen Genom.

3. Ergebnisse

Tabelle 10: Zielgene anhand der eigenen Computer Prädiktion

Zielgen	Beschreibung	Zugeordnete EBV miRNAs (via Targetscan) ¹
KLF12	Kruppel-like factor 12	BART10, BART2-5p, BART3, BART8*, BART9
PRPF4B	PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog B	BART14*, BART3, BART5, BART8*, BART9
PURA	purine-rich element binding protein A	BART10, BART14*, BART2-5p, BART3, BART9
APPBP2	amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein 2	BART10, BART3, BART6-3p, BART8*
ASH1L	ash1 (absent, small, or homeotic)-like	BART10, BART2-5p, BART6-3p, BART9
CAMTA1	calmodulin binding transcription activator 1	BART10, BART2-5p, BART3, BART8*
CTDSPL2	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase like 2	BART10, BART1-5p, BART2-5p, BART8*
CUGBP2	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2	BART14*, BART2-5p, BART5, BART8*
DLG2	discs, large homolog 2, chapsyn-110	BART10, BART3, BART5, BART8*
MAF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog	BART1-5p, BART3, BART5, BART9
MYCN	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived	BART10, BART1-5p, BART2-5p, BART3
OTUD4	OTU domain containing 4	BART10, BART3, BART8*, BART9
PCDH19	protocadherin 19	BART10, BART2-5p, BART5, BART9
RYBP	RING1 and YY1 binding protein	BART10, BART1-5p, BART8*, BART9
TBL1XR1	transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1	BART10, BART3, BART5, BART8*
TCF12	transcription factor 12 (HTF4, helix-loop-helix transcription factors 4)	BART10, BART14*, BART2-5p, BART9

3. Ergebnisse

Tabelle 10: Zielgene anhand der eigenen Computer Prädiktion

TEAD1	TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor)	BART10, BART1-5p, BART2-5p, BART9
VCPIP1	valosin containing protein (p97)/p47 complex interacting protein 1	BART10, BART2-5p, BART8*, BART9
WAPAL	wings apart-like homolog	BART14*, BART2-5p, BART5, BART8*

¹ Die Analyse der Zielgene wurde mit Targetscan 4.2 durchgeführt. Die seed region (Nukleotide 2 bis 8) jeder EBV miRNA wurde hierfür verwendet und diejenigen tabellarisch zusammengefasst, welche zu mehr als drei miRNAs passen.

4. Diskussion

4.1 EBV-miRNAs in archivierten Gewebeproben

4.1.1 Einfluss von Paraffinisierung auf das Gewebe

In unserer Studie führten wir eine umfangreiche Analyse von EBV-miRNAs in paraffinisierten Gewebeproben durch. Dabei wurden 39 EBV-miRNAs in 40 verschiedenen archivierten Hodgkin-Lymphom-Gewebeproben und in 21 archivierten Gewebeproben mit maligner B-Zell-Proliferation wie zum Beispiel diffus großzelligen B-Zelllymphomen untersucht. 20 der genannten Hodgkin Lymphome und fünf der malignen B-Zell-proliferativen Proben wurden mittels EBER-*in-situ*-Hybridisierung positiv auf EBV getestet.

Es zeigte sich, dass miRNAs in Paraffin-Gewebe gut zu detektieren sind, was sich mit bisherigen Veröffentlichungen deckt (Doleshal et al. 2008; Eisele et al. 2012; Junker et al. 2009).

Durch das Versetzen von Gewebeproben mit Formalin denaturiert die DNA, das heißt, die Stoffwechselfvorgänge werden gestoppt, Wasserstoffbrückenbindungen und Basenpaare unterbrochen und die Zellen auf diese Art und Weise konserviert. Des Weiteren können Bindungen zwischen Basenpaaren gelöst werden, wodurch freie Pyrimidin- und Purin-Reste entstehen (Srinivasan et al. 2002).

Dadurch kann es allerdings auch zu Verklumpungen und Vernetzungen der einzelnen RNA-Stränge, Proteine und Basenpaare kommen, welche dann im Rahmen der PCR-Reaktion auch falsch vervielfältigt werden (Srinivasan et al. 2002). Das bedeutet, dass die Proben von unterschiedlicher Qualität und Zusammensetzung sind, was eine einheitliche Verwertung erschwert (Kashofer et al. 2013). Der Fehlergehalt ist dabei unter anderem abhängig von der Verdünnung der Probe. In verschiedenen Studien wurden Methoden zur Verbesserung der Konservierung, der RNA-Extraktion und der Methodik zur Vervielfältigung des Materials entwickelt sowie auch zur Auswertung der Ergebnisse, um die bestmöglichen und einheitlichen Ergebnisse zu erhalten (Fleige et al. 2006; Kashofer et al. 2013; Srinivasan et al. 2002).

Inzwischen ist es so, dass die Qualität und Quantität insbesondere im Vergleich zwischen FFPE-Geweben unterschiedlichen Alters, unterschiedlicher Größe und auch im Vergleich zu frischem Gewebe zu unterscheiden sind (Kokkat et al. 2013; Xi et al. 2007).

Bei der Analyse von miRNAs aus FFPE-Gewebe in Form von qPCR zeigt sich kaum ein Unterschied bezüglich der Qualität und Sensitivität im Vergleich zu anderen diagnosti-

schen Methoden, da diese Methode auch noch bei RNA-Fragmenten mit kürzester Länge funktioniert (Reinard 2010).

4.1.2 Notwendigkeit der Verwendung eines Housekeeping-Gens

Um einer Verfälschung der Ergebnisse durch Verunreinigung mit anderen kurzen RNA-Fragmenten vorzubeugen, werden parallel eine Kontrolle durchgeführt sowie die Qualität der Ergebnisse mit Hilfe eines Housekeeping-Gens als Referenzgens bewertet. Andere Probleme bzgl. der Aussagefähigkeit entstehen durch die Unterschiede in der Art der Durchführung der RNA-Extraktion oder der PCR an sich sowie die unterschiedliche Gewebequalität der Proben (Bustin 2000). Um also die Vergleichbarkeit und auch die Qualität der Proben sichern zu können, ist die Verwendung eines Referenzgens zur internen Kontrolle der qPCR-Reaktion sinnvoll (Kozera und Rapacz 2013). Die Verwendung eines Referenzgens nimmt außerdem Einfluss auf die statistische Auswertung der Experimente. Dieses sollte hierfür eine andere Sequenz als das Zielgen aufweisen. Außerdem sollte ein Referenzgen noch weitere wichtige Merkmale aufweisen. Am wichtigsten ist hier, dass das Expressionslevel des Referenzgens nicht von experimentellen Faktoren beeinflusst wird. Denn dies ist das Hauptproblem in der Methodik der PCR. Demnach sollte auch kein Einfluss durch die Art des Gewebes oder den physiologischen Zustand, also auch die Qualität der Probe entstehen. Es soll jedoch auch die Unterschiedlichkeit in den Ergebnissen zeigen, die zum Beispiel durch verschiedene Arten der Durchführung der Methodik zustande kommen. Hierdurch soll sichergestellt werden, dass jeder dieser Unterschiede im gesamten genetischen Material im gleichen Verhältnis dargestellt wird (Chervoneva et al. 2010). Besonders gut geeignet als Referenzgene sind daher basic metabolism genes, auch Housekeeping-Gene genannt (Kozera und Rapacz 2013; Thellin et al. 1999). Denn diese werden in einem stabilen Zustand und unreguliert exprimiert. Gut eignet sich beispielsweise die in unserer Studie genutzte RNU6B (small nucleolar RNU 6), eine nicht kodierende RNA-Sequenz, die sich im Nukleolus befindet, als Referenzgen (Carlsson et al. 2010).

4.1.3 Vorteile der miRNA-qPCR aus paraffinisiertem Gewebe

Auf Basis dieser Entwicklungen wurde unsere Studie mit EBV-miRNAs durchgeführt. Die Schwierigkeit an viralen miRNAs ist, dass bei einem latenten Befall nur wenige Kopien vorhanden sein können.

Der in unseren Proben mittels *In-situ*-Hybridisierung festgestellte EBV-Status korrelierte mit der Expression bestimmter EBV-miRNAs. Insbesondere die BART-miRNAs waren in

latent infizierten Zellen im Gewebe besonders häufig exprimiert, dies wurde auch für Zelllinien in einer *In-vitro*-Untersuchung bereits festgestellt und beschrieben (Pratt et al. 2009). Ziel unserer Studie war es, durch die qPCR bestimmter miRNAs eine zusätzliche Methode darzustellen, um den EBV-Status latent infizierter Zellen aus archiviertem Gewebe festzustellen.

Hierdurch könnte die EBV-Detektion bei bestimmten Pathologien, für die EBV eine besondere Rolle spielt, wie beispielsweise verschiedene Tumorentitäten, eine ergänzende Diagnosemethode darstellen. Bei anderen Erkrankungen wie beispielsweise chronisch entzündlichen ZNS-Erkrankungen wie Multiple Sklerose, bei denen die Beteiligung von EBV kontrovers diskutiert wird, (Fatima et al. 2010; Lassmann et al. 2011), könnte die Anwesenheit von EBV-miRNAs in den Immunzellen Betroffener auf eine Beteiligung des Virus hinweisen.

Da im Allgemeinen bei 95% der Bevölkerung eine kleine Anzahl von B-Zellen (ca. 1-50 pro Billion B-Zellen (Babcock et al. 1998)) latent mit EBV infiziert sind, ist anzunehmen, dass eine basale Expression von EBV-miRNAs auch in mittels EBER-*in-situ*-Hybridisierung negativ getesteten Hodgkin Lymphomen oder B-Zell-Proliferationen existiert. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen unserer Studie, in denen die meisten EBV-negativ getesteten Hodgkin-Lymphom-Proben ebenfalls eine geringe EBV-miRNA-Expression aufweisen.

Die Quantifizierung von EBV-miRNAs in paraffinisierendem Gewebe lässt sich, wie die Ergebnisse unserer Studie verdeutlichen, auch mit stark degradiertem RNA und aus Schnitten mit einer sehr geringen Anzahl an EBV-positiven Zellen durchführen. Sie ist zudem unabhängig von der Morphologie des Gewebes.

4.2 EBV-Infektion und Biologie

4.2.1 Infektion und Latenzmuster im Zusammenhang mit miRNAs

EBV gehört zur Klasse der Gamma-Herpesviren. Das EBV-Genom besteht aus einer doppelsträngigen DNA von ca. 172 kb (kilobase pairs) Länge. Es war das erste Virus, dessen Genom komplett entschlüsselt wurde (Baer et al. 1984). Wie bereits erwähnt, ist ein Großteil der menschlichen Population mit EBV infiziert. Die Übertragung geschieht oral. Ansteckende Viruszellen können im Speichel von Patienten mit Mononukleose, bei immunsupprimierten Patienten oder teilweise auch bei gesunden, latent infizierten Patienten zu finden sein (Gerber et al. 1972; Strauch et al. 1974; Yao et al. 1985). Das Virus infiziert

die B-Lymphozyten und geht in die Latenzphase über, um in ihnen zu persistieren. Im Rahmen dieser latenten Infektion werden einige Gene exprimiert, die in Zusammenhang mit der Entstehung von EBV-assoziierten Krebserkrankungen stehen.

Normalerweise wandern die B-Zellen, die Antigen-Kontakt hatten, in den Lymphknoten und bilden das Keimzentrum. Hier durchwandern sie mehrere Wachstums- und Differenzierungsprozesse, bei denen am Schluss die selektiert werden, die hochaffine Immunglobuline bzw. Antikörper produzieren. Die anderen enden in der Apoptose. EBV scheint bevorzugt naive B-Zellen zu befallen, die sich im Keimzentrum befinden. Es ist in seinem Latenzmuster der B-Zell-Physiologie und Biologie angepasst. Nach der Infektion wird zunächst Latenzmuster III exprimiert. Hier wurde unter anderem eine spezifische Abhängigkeit des Virus vom B-Zell-eigenen Transkriptionsfaktor PAX5 beschrieben, was die Spezifizierung des Virus auf B-Zellen erklärt (Massini et al. 2009; Tierney et al. 2007).

Wie unten näher beschrieben, werden im Latenzmuster III die meisten viralen Proteine exprimiert ebenso wie die BART-miRNAs. Die BART-miRNAs sind in jeder Latenzform exprimiert, was sie zu wertvollen Markern für die Diagnostik macht. Es liegt nah, dass sie auch Einfluss auf bestimmte Transkriptionsfaktoren haben. Während der Aktivierung und Proliferation der B-Zellen werden die verschiedenen Latenzmuster durchlaufen, von III zu 0 (in den B-Gedächtniszellen) (Thorley-Lawson 2001). So kann das Virus in den Gedächtniszellen lebenslang persistieren, unerkant von zytotoxischen Zellen.

Die Tumorzellen scheinen aus präapoptotischen B-Zellen zu entstehen. Dies wird dadurch gestützt, dass ca. 25% der Hodgkin-Lymphom Zellen Mutationen des B-Zell-Rezeptors zeigen. Normalerweise werden diese der Apoptose zugeführt, durch die Infektion ist dieser Mechanismus jedoch unterbrochen, sie überleben und vermehren sich sogar (Bechtel et al. 2005; Mancao et al. 2005).

Für das Überleben sind insbesondere Signale des B-Zell-Rezeptors und der T-Helferzellen notwendig. Ein wichtiger Aktivator ist hierbei das Oberflächenantigen CD40, welches, wenn es durch T-Helferzellen stimuliert wird, über eine Signalkaskade in Zusammenhang mit TRAFs (tumor-necrosis-factor receptor associated factors) das Überleben der B-Zelle vermittelt. Dieser Signalweg wird durch EBV-eigene Proteine imitiert.

In vitro führt eine Infektion mit EBV dazu, dass ruhende B-Zellen in permanent wachsende lymphoblastoide Zelllinien konvertiert werden. Des Weiteren werden spezifische virale Gene exprimiert, welche unter anderem aus den EBNA-Subtypen sowie LMPs und einigen miRNAs bestehen (Feederle et al. 2011; Vento-Tormo et al. 2014).

Das durch EBV aktivierte Wachstum der B-Zellen resultiert aus Veränderungen in der Genexpression, was sowohl direkt durch Transkriptionsfaktoren als auch auf dem posttranskriptionalen Weg bewirkt werden kann. Auf dieser Ebene könnten die miRNAs beteiligt sein (Vento-Tormo et al. 2014). Eine aktuelle Studie beschreibt eine Korrelation des Wachstums der B-Zellen mit der Expression von EBV miRNAs, insbesondere von BHRF1. Hier konnte eine ausgeprägte Varianz innerhalb der untersuchten Patienten festgestellt werden, was verdeutlicht, dass auch individuelle Faktoren eine Rolle spielen (Delecluse et al. 2019).

4.3 EBV-Latenzmuster, Proteine und miRNA-Expression

4.3.1 Expressionsprofile der Proteine und miRNAs

EBV weist vier verschiedene Latenzmuster auf (0, I-III) in Abhängigkeit vom Status der EBV-Persistenz (Cohen et al. 2008; Küppers 2003).

Während dieser Latenzphasen werden verschiedene (bis zu neun) EBV eigene Proteine exprimiert. Latenzmuster 0 bedeutet, dass EBV in latent infizierten B-Gedächtnis-Zellen mit einer reduzierten Expression viraler Gene persistiert. Eine gelegentliche Expression von LMP2A und EBER ist außerdem charakteristisch für dieses Latenzmuster (Küppers 2003). Ein hoher Prozentsatz der menschlichen Bevölkerung besitzt solche latent infizierten B-Zellen, die aus einer vorausgegangenen EBV-Infektion stammen.

Während Latenzmuster I werden auch EBER1 und -2, BART-miRNAs und EBNA1 exprimiert.

Latenzmuster II findet man in Hodgkin und non Hodgkin Lymphomen sowie T-/NK-Zell-Lymphomen und den nasopharyngealen Karzinomen, hier werden EBER1, -2, EBNA1, LMP1, -2A, -2B, BARTs und BARF1 exprimiert. Ca. 40 % der Hodgkin Lymphome sind EBV-positiv (Massini et al. 2009).

Latenzmuster III tritt gehäuft bei post-Transplantations-Erkrankungen mit lymphatischer Proliferation, AIDS-abhängigen Lymphomen und während der infektiösen Mononukleose auf, hier werden die meisten viralen Gene exprimiert (EBER1, -2, BARTs, BHRF1, EBNA 1, -2, -3A, -3B, -3C, EBNA-LP, LMP1, -2A, -2B (Küppers 2003; H. Lassmann et al. 2011)).

Tabelle 11: Expressionsprofil viraler Gene und EBV miRNAs in Abhängigkeit vom Latenztyp.

Latenztyp	Expressionsprofil viraler Gene	Vorkommen	Expressionsprofil viraler miRNAs
Typ I	EBER1, 2, EBNA 1	B-Zell-Lymphome, Nk-T-Zell-Lymphome	BARTs
Typ II	EBER1, 2, EBNA 1, LMPs (1, 2a, 2b), BARF 1	Nasopharyngeale Carcinome, Hodgkin-Lymphome, Nk/T-Zell-Lymphome	BARTs
Typ III	EBER1, 2, EBNAs (1, 2, 3A, 3B, 3C, LP), LMPs (1, 2A, 2B)	Akute infektiöse Mononukleose, PTLN, AIDS-assoziierte Lymphome	BARTs, BHRF 1

4.3.2 Funktionen der Proteine und miRNAs

EBNA1 ist durch Bindung an den Replikationsort der viralen Episome für die Replikation und Vervielfältigung der viralen DNA sowie Weitergabe dieser an Tochterzellen verantwortlich. Da EBNA1 nicht als Antigen durch MHC-I-Moleküle repräsentiert wird, werden B-Zellen, die nur EBNA1 exprimieren, nicht von zytotoxischen T-Zellen erkannt (Küppers 2003). Die direkte Expression von EBNA1 in Mäusen hat gezeigt, dass sich hier Lymphome entwickeln, was darauf hindeutet, dass EBNA1 onkogene Eigenschaften besitzt. EBNA1 ist ein wichtiges Zielgen für die miRNA BART6 (Lo et al. 2007).

EBNA2 ist wichtig für die zelluläre Transformation und wird daher als erstes Protein direkt nach der Infektion exprimiert. Es reguliert bzw. aktiviert die virale und zelluläre Genexpression und spielt eine wichtige Rolle im Prozess der Transformation (Hammerschmidt und Sugden 1989).

EBNA und die LMP interagieren miteinander, was insgesamt zu Aktivierung von LMP führt (Ok et al. 2015).

LMP1 ist bereits ohne die Expression anderer EBV Gene *In vivo* als Onkogen zu werten. Es ist ein Transmembran-Protein mit einem c-terminalen zytoplasmatischen Ende. Dies besteht aus zwei wichtigen Domänen, CTAR 1 und CTAR 2 (c-terminal activation region). Es imitiert die Funktion von CD40, was für die B-Zell Proliferation und Differenzierung zuständig ist (Kulwicht et al. 1998; Uchida et al. 1999) und verhindert außerdem die Apoptose der B-Zellen über eine NF- κ B-abhängige Signalkaskade (Thorley-Lawson 2001). Über die transmembrane Domäne kann eine dauerhafte Aktivierung von LMP1 er-

folgen, welches über CTAR 1 und 2 mit weiteren angeschlossenen Molekülen und Rezeptoren interagiert. Hier sind vor allem die TRAFs (tumor necrosis factor associated factors) zu nennen, über welche der NF- κ B pathway aktiviert wird. NF- κ B aktiviert die Expression des anti-apoptotischen DISC-Inhibitors c-FLIP und induziert die Expression proinflammatorischer Cytokine (Hinz et al. 2002; Kreuz et al. 2001).

Des Weiteren werden antiapoptotische Proteine hochreguliert (wie BCL2 und A20), wodurch die Apoptose inhibiert wird (Küppers 2003).

Andere Zielgene für NF- κ B in Hodgkin-Lymphom-Zellen können in verschiedene Untergruppen unterteilt werden: Zytokine, Chemokine, Zelloberflächen-Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle, Regulatoren der Apoptose, Signalmoleküle oder Transkriptionsfaktoren mit dem Ziel, das Wachstum zu steigern und die Apoptose zu verhindern (Hinz et al. 2002).

EBV-miRNAs sind auch an dieser Stelle in das Wachstum und die Transformation von B-Zellen involviert, denn sie haben sowohl zelluläre als auch virale Zielgene (Piedade und Azevedo-Pereira 2016; Sakamoto et al. 2017). MiRNAs des BART-Clusters können LMP1 und -2a herunterregulieren. BART16, BART17-5p und BART1-5p haben beispielsweise LMP1 als Zielgen, dies könnte indirekt den Schutz vor dem Immunsystem unterstützen (Boss und Renne 2011; Lo et al. 2007). Die miRNAs BART1-5p, BART16 und BART17-5p nehmen Einfluss auf das Protein LMP1 (Lo et al. 2007). Diese miRNAs konnten auch in den in unserer Studie untersuchten Proben nachgewiesen werden, BART1-5p mit einer durchschnittlich guten Diskriminationsfähigkeit.

LMP2 spielt eine bedeutende Rolle für die Verhinderung einer EBV-Reaktivierung, indem es die Phosphorylierung von Tyrosinkinasen verhindert.

LMP2 teilt sich in zwei Isoformen, LMP2A und -2B. Über die zytoplasmatische Domäne von insbesondere LMP2A kann die Aktivierung der Tyrosinkinasen, die den lytischen Zyklus induzieren, gehemmt werden, sodass das Virus im latenten Zustand in den B-Zellen verbleibt (Miller et al. 1995).

LMP2A besitzt sogenannte ITAMs in seiner zytoplasmatischen Domäne (immunoreceptor Tyrosinkinase-based activation motifs), welche sich ebenfalls im B-Zell-Rezeptor finden und Reaktionen vermitteln. Es bindet die Tyrosinkinasen des B-Zell-Rezeptors und inhibiert diese dadurch, sodass eine B-Zell-Aktivierung und damit der Eintritt in den lytischen Zyklus verhindert wird. Gleichzeitig jedoch imitiert LMP2A die Signale des B-Zell-Rezeptors und sichert dadurch das Überleben der Zelle. Es ist jedoch auch ein virales Antigen, das im Rahmen der Immunabwehr durch zytotoxische T-Zellen erkannt werden kann (Lung et al. 2009). Daher ist durch die Inhibierung der Expression wiederum die Flucht der

infizierten Zelle vor dem Immunsystem gesichert. Hier sind ebenfalls virale miRNAs beteiligt, insbesondere miRNA BART22, welche LMP2A als Zielgen hat. Es ist ein hohes Level an miRNA-Expression mit einem niedrigen Level an LMP2A-Expression verbunden. Durch die Expression von BART22 wird demnach die Expression von LMP2A herabgesetzt (Lung et al. 2009). In unserer Studie wird die miRNA BART22 in den malignen B-Zell-Proliferationen überexprimiert.

Die EBER-RNAs codieren kleine, nicht polyadenylierte RNAs, welche die Sekretion von Interleukin 10 induzieren können, was zum Wachstum infizierter B-Zellen sowie zur Hemmung zytotoxischer T-Zellen beitragen könnte. Außerdem binden EBER-RNAs die Interferon-induzierte RNA-aktivierte Proteinkinase PKR, welche im Zusammenhang mit den Interferon-induzierten antiviralen Effekten steht und könnten so eine Rolle für das Überleben des Virus spielen (Clemens et al. 1994). In Hodgkin Lymphomen sind entsprechend dem Latenztyp II EBER, EBNA1, LMP1, -2A und -2B besonders stark exprimiert (Ok et al. 2015), was sich mit dem Expressionsmuster der entsprechenden beteiligten miRNAs in unserer Studie deckt.

4.4 EBV und Krebs

4.4.1 EBV-miRNAs in verschiedenen Krebsarten

EBV ist mit verschiedenen Krebserkrankungen assoziiert (Kutok und Wang 2006). Es wurden bereits verschiedene Krebsarten hinsichtlich der sowohl viralen als auch zellulären miRNA-Expression untersucht. Hier zeigt sich eine hohe Variabilität innerhalb der Tumore bezüglich der viralen miRNA-Expression, sodass von einer unterschiedlichen Infiltration der verschiedenen Tumore auszugehen ist (Piedade und Azevedo-Pereira 2016; Zhang et al. 2019).

Eine besondere Assoziation wurde zu epithelialen Tumoren wie z.B. des Nasopharynx und des Magens beschrieben (Young und Murray 2003).

Beim Nasopharynxkarzinom (NPC) sind ca. 5-19% der exprimierten miRNAs von EBV stammend (Zhu et al. 2009). Auch wenn es keine umschriebene EBV-miRNA gibt, die durchgehend in allen NPC-Zelllinien exprimiert wird, sind die miRNAs BART7-3p, BART21, BART22, und ebenso BART4 und -5 als besonders häufig und besonders hoch exprimiert beschrieben (Chen et al. 2010; Cosmopoulos et al. 2008; Zhu et al. 2009). MiRNAs des BHRF-Clusters werden nicht beschrieben.

Auch für das Magenkarzinom ist eine Abwesenheit von BHRF-miRNAs und eine Überexpression von BART-miRNAs beschrieben (Marquitz et al. 2015; 2014; Yang et al. 2017). Bei den Zelllinien der Magenkarzinome konnte zudem eine Beeinflussung zellulärer miRNAs durch eine EBV-Infektion festgestellt werden. In diesem Zusammenhang wurde keine erhöhte Expression der EBV-Proteine sondern nur der EBV-miRNAs gemessen, was auf einen direkten Einfluss der EBV-miRNAs auf zelluläre miRNAs hindeutet (Marquitz et al. 2014). Einige der supprimierten zellulären miRNAs haben eine Tumor-Suppressor-Funktion, was wieder das onkogene Potential von EBV bestätigt (Marquitz et al. 2014).

Auch zur chronisch lymphatischen Leukämie ist eine Assoziation mit EBV-miRNAs beschrieben, insbesondere im Zusammenhang mit BHRF1 und BART4 (Ferrajoli et al. 2015). Die charakteristischen miRNA-Expressionsmuster können demnach auf die spezifischen Funktionen der miRNAs in der Tumorgenese hinweisen.

4.4.2 EBV-miRNAs in Zusammenhang mit dem Latenzmuster in verschiedenen Krebsarten

Auch die unterschiedlichen Latenzmuster sind Krebsarten zuzuordnen. In diesem Zusammenhang sind auch unterschiedliche miRNA-Expressionsmuster beschrieben (Wang et al. 2018).

EBV im Latenztyp I kommt gehäuft in Burkitt Lymphomen und Magenkrebs vor, während Latenztyp II in Hodgkin Lymphomen, Nasopharyngealen Tumoren und Lymphohistiozytose mit hyperinflammatorischer Reaktion zu finden ist. Latenztyp III findet man gehäuft in lymphoproliferativen Erkrankungen post-Transplantation (PTLD) sowie in AIDS-assoziierten Lymphomen und lymphoblastoiden Zelllinien (Grywalska und Rolinski 2015).

Eine der größten Gruppen maligner Erkrankungen, die mit EBV assoziiert sind, sind - wie bereits erwähnt - die Lymphome und lymphoproliferativen Erkrankungen. In diffus groß-zelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) ist eine besonders hohe Expression von BART17, BART22 und BART10 beschrieben, hingegen von BART15, -20 und BHRF-miRNAs keine signifikante Überexpression (Imig et al. 2011).

Auch verschiedene zelluläre miRNAs sind hier überexprimiert, welche eine Rolle in der Tumorgenese spielen und möglicherweise auch unter dem Einfluss der EBV-miRNAs stehen (Esquela-Kerscher und Slack 2006; Farazi et al. 2011; Piedade und Azevedo-Pereira 2016). DLBCL, die AIDS-assoziiert sind, weisen im Gegensatz zu DLBCL immunkompetenter Patienten eine besonders hohe Expression von BART22 und BHRF1-3 auf, was da-

rauf hindeutet, dass diese miRNAs eine Rolle in der Immunkompetenz der Wirtszellen spielen könnten (Xia et al. 2008).

Außerdem zeigt sich ein erheblicher Unterschied in der Expression viraler miRNAs in AIDS-assoziierten B-Zell-Lymphomen bezüglich des Latenztyps. Ähnlich wie in Lymphomen und Karzinomen, die vorwiegend dem Latenztyp I zuzuordnen sind, werden keine miRNAs des BHRF1-Clusters exprimiert, wohingegen in Lymphomen, die dem Latenztyp III zuzuordnen sind, eine geringgradige Expression der BHRF-miRNAs besteht (Piedade und Azevedo-Pereira 2016; Xia et al. 2008).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass sowohl in AIDS-assoziierten B-Zell-Lymphomen als auch in DLBCL die miRNA-Expression von einer LMP1-Expression begleitet ist (Xia et al. 2008). Außerdem ist die Expression der miRNA BHRF1 abhängig von Promotoren des Latenztyps III und die BHRF1-Transkripte sind in den lytischen Zyklus und dessen Aktivierung involviert (Amoroso et al. 2010). Dies zeigt, dass sich virale miRNAs in immunkompromittierten Patienten anders verhalten als in Immungesunden, da es auf virale Transkripte hier keine effiziente Immunantwort gibt, was zu einer geringeren Regulation der viralen Genexpression führt (Piedade und Azevedo-Pereira 2016).

In NK-/T-Zell-Lymphomen konnte ein ähnliches Expressionsmuster beschrieben werden: BHRF1-miRNAs werden nicht detektiert, wohingegen BART5 und BART7-5p die am höchsten exprimierten miRNAs sind. Des Weiteren werden auch hier zelluläre miRNAs herauf- bzw. herunterreguliert, unter anderem miRNAs, die proinflammatorische Zytokine und onkogene Proteine beeinflussen (Motsch et al. 2012). In unserer Studie ließen sich in den DLBCL-Proben die miRNAs BART10, BART11-3p, BART12, BART13, BART13*, BART14*, BART15, BART1-5p, BART18-3p, BART22, BART2-3p, BART3, BART4, BART5, BART6-3p, BART6-5p, BART8, BART9 und BHRF1-3 mit einer sehr guten bis guten Diskriminationsfähigkeit (AUC zwischen 0,8 und 1,0) nachweisen.

4.4.3 EBV-miRNAs und Entstehung/Progression von Krebs

Einige Studien beschreiben, abgesehen von den spezifischen miRNA-Expressionsmustern, dass EBV-miRNAs im Allgemeinen auch eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression von Krebs spielen (Zhang et al. 2019). Beispielsweise miRNA BART7-3p, welche in NPC hochreguliert ist, hat PTEN als Zielgen (tumor-suppressorphosphatase and tensin homolog), welches in einen Signalweg für die Transformation von epithelialem zu mesenchyalem Gewebe involviert ist, wodurch die Metastasenbildung gefördert wird (L.-M. Cai et al. 2015). Ein ähnlicher Mechanismus wurde für miRNA BART1 beschrie-

ben, welche ebenfalls PTEN als ein Zielgen aufweist (L. Cai et al. 2015). Dies bestärkt die auch in unserer Studie dargestellte Hypothese, dass es häufig mehrere virale miRNAs gibt, die das gleiche zelluläre Zielgen aufweisen, um dessen Regulation zu gewährleisten. Ein weiteres Zielgen für nahezu alle miRNA des BART2-Clusters ist NDRG1 (n-myc downstream regulated 1). Dies ist ein Suppressor von Metastasen und ein Marker für die epitheliale Differenzierung, was bedeutet, dass dessen Suppression eine Ausdifferenzierung sowie den Wachstumstopp der Zellen vermindert, was wieder zur Karzinogenese beiträgt (Kanda et al. 2015).

Insgesamt zeigen all diese Studien, dass EBV eine große und wichtige Rolle in der Karzinogenese vieler Tumoren spielt.

Eine Zusammenfassung der Zielgene und Funktionen von EBV miRNAs auf Basis der Literatur ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Zielgene von EBV miRNAs anhand der Literatur zusammengefasst (Piedade und Azevedo-Pereira, 2016)

EBV-MiRNA	Zielgen	Funktion
BHRF1-3	CXCL11 (C-X-C motif chemokine 11)	immune escape
BART1	BIM (BCL2 interacting mediator of cell death)	antiapoptotisch
BART1-3p	Caspase-3	antiapoptotisch
BART1-5p	LMP1	immune escape
BART2-5p	MICB (major histocompatibility complex class-I related chain B)	immune escape
BART3	BIM	antiapoptotisch
BART3-5p	DICE1 (deleted in cancer 1)	Zelltransformation und -wachstum
BART5-5p	PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis)	antiapoptotisch
BART6-5p	Dicer	Modulation der miRNA Biogenese
BART7	APC (adenomatous-polyposis-coli-protein)	Zelltransformation und -wachstum

Tabelle 12: Zielgene von EBV miRNAs anhand der Literatur zusammengefasst

BART9	BIM	antiapoptotisch
BART11	BIM	antiapoptotisch
BART12	BIM	antiapoptotisch
BART15	NLRP3 (NLR family, purin domain containing 3) LMP1	immune escape
BART16	TOMM22 (Translocase of outer mitochondrial membrane 22 homologue) Caspase-3	Antiapoptotisch antiapoptotisch
BART17-5p	LMP1 WIF1	immune escape Zelltransformation und -wachstum
BART19-3p	APC	Zelltransformation und -wachstum
BART20-5p	BAD (BCL-2 associated agonist of cell death)	antiapoptotisch

4.5 EBV und Hodgkin Lymphome

Wie bereits eingangs beschrieben ist die Bedeutung von EBV für Hodgkin Lymphome kontrovers diskutiert. Ca. 40% der Hodgkin Lymphome sind EBV-positiv (Massini et al. 2009). Aus der Untergruppe der zusätzlich mit HIV infizierten Patienten sind nahezu 100% EBV-positiv (Dolcetti et al. 2001).

EBV wird vor allem mit dem gemischten Subtyp des Hodgkin Lymphoms in Verbindung gebracht, das NLPHL ist dagegen als Unterform, die nicht mit EBV assoziiert ist, charakterisiert (Murray et al. 1992; Pallesen et al. 1991).

Hodgkin-Lymphom-Zellen entstehen, wie oben bereits beschrieben, aus B-Zellen. Hier handelt es sich um B-Zellen, die aufgrund somatischer Mutationen kein Oberflächen-Immunglobulin durch einen funktionierenden B-Zell-Rezeptor besitzen (Kapatai und Murray 2006). Der normale Weg für diese Zellen wäre die Apoptose. Durch die Infektion mit EBV entgehen sie dieser jedoch dadurch, dass virale Gene und Proteine exprimiert werden (Kanzler et al. 1996). In infizierten B-Zellen werden keine B-Zell-typischen Gene mehr exprimiert, insbesondere der vom B-Zell-Rezeptor physiologischerweise ausgehende Sig-

nalweg wird unterbrochen (Schwering et al. 2003). Die Identität der ursprünglichen B-Zelle geht durch die Überexpression verschiedener anderer Gene verloren, durch welche z.B. die Transkriptionsfaktoren E2A und auch PAX5, welche für die Funktionalität der B-Zelle mit verantwortlich sind, antagonisiert werden (Mathas et al. 2006; Renné et al. 2006). Hodgkin-Lymphom-Zellen zeichnen sich durch eine dauerhafte Aktivierung des NFkB-Signaltransduktionsweges aus, welcher unter anderem durch die Expression der Latenzgene LMP1 und LMP2A in Hodgkin-Lymphom-Zellen aktiviert wird (Kapatai und Murray 2006; Vockerodt et al. 2014).

Es werden jedoch auch andere Mutationen, die zu dieser Aktivierung führen, diskutiert, da nicht alle Hodgkin Lymphome EBV-positiv getestet werden (Kapatai und Murray 2006).

Es besteht die Hypothese, dass EBV in Progenitor-Zellen bereits zu Veränderungen führt, jedoch möglicherweise im Verlauf durch DNA-Rearrangements nicht mehr auffindbar ist (Gan et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse konnten in EBV-negativ getesteten Burkitt-Lymphom-Zellen gefunden werden (Razzouk et al. 1996). Dies ließ sich jedoch durch die konventionellen Methoden nicht bestätigen, sodass eine Bedeutung von EBV für die Entstehung EBV-negativ getesteter Hodgkin Lymphome eher unwahrscheinlich erscheint (Kapatai und Murray 2006; Staratschek-Jox et al. 2000).

Unsere Methode zeigte jedoch auch in den mit *In-situ*-Hybridisierung negativ getesteten Proben eine geringe EBV-miRNA-Expression (vgl. Abbildung 4), was die Diskussion erneut anregen könnte.

4.6 MiRNA-Expressionsmuster

EBV besitzt zwei verschiedene unabhängige miRNA-Typen, die BARTs und BHRFs. Diese befinden sich in den Introns des BHRF1- sowie BART-Clusters. Wie bereits beschrieben unterstützen die miRNAs das Überleben des Virus, die Aufrechterhaltung der Latenz und verhindern die Aktivierung des lytischen Zyklus. In einer Studie wurde dargestellt, dass verschiedene Signalkaskaden und Transduktionen durch miRNAs beeinflusst werden, zum Beispiel der p53 feedback loop, B-Zell-Signalwege und Reaktionen auf oxidativen Stress sowie Apoptose (Skalsky et al. 2012).

Jedes Latenzmuster hat auch ein bestimmtes Expressionsmuster bzw. Profil der EBV-miRNAs. Dies wurde bereits durch ausführliche *In-vitro*-Analysen gezeigt, bei denen miRNAs in diversen latent infizierten Lymphomzellen gefunden wurden (Amoroso et al. 2010; Cai et al. 2006; Pratt et al. 2009). So sind BHRF-Transkripte charakteristisch für das

Latenzmuster III (Amoroso et al. 2010; Cai et al. 2006), während BART-miRNAs eher in Latenzmuster I und II zu finden sind (Pratt et al. 2009).

Während des lytischen Zyklus des Virus werden einige miRNAs besonders hoch exprimiert (z. B. BART1-3p, BART3-3, BART7, BHRF 1-2), während die Expression von BHRF1-1 nicht signifikant erhöht ist (Cai et al. 2006). Daraus erschließt sich, dass die miRNAs auch an der Expression viraler Proteine entsprechend der Latenzmuster beteiligt sind und somit in das Aufrechterhalten der Latenzphase bzw. das Überleben des Virus. Das Expressionslevel der verschiedenen miRNAs ist jedoch nicht nur abhängig vom Latenztyp des Virus sondern auch vom Zelltyp. So werden z. B. in epithelialen NPC-Zellen insgesamt mehr virale miRNAs exprimiert als in B-Zelllinien.

In unserer Untersuchung wurden die BART-miRNAs BART10, BART14*, BART1-5p, BART2-5p, BART3, BART5, BART6-3p, BART8, BART8* und BART9 am häufigsten in den EBV-positiven Hodgkin-Lymphom-Zellen exprimiert, was zu Latenzmuster II, wie es in Hodgkin Lymphomen vorkommt, passt.

4.7 Regulatorische Funktion der exprimierten miRNAs

Einige der Funktionen dieser miRNAs wurden bereits beschrieben. Einen Überblick bietet Tabelle 12.

Es zeigt sich, dass miRNA BART6 die Latenz und die lytische Phase des Virus beeinflusst, indem EBNA2 herunterreguliert wird (Iizasa et al. 2010) und miRNA BART6 reguliert außerdem die Proteine Zta (Chen et al. 2009) und Rta (Heilmann et al. 2012) herunter, welche beide in den Wechsel des Virus in die lytische Phase involviert sind (Iizasa et al. 2010).

Auch BART20-5p greift hier ein, über die Regulation von BZLF1 und BRLF1 (Jung et al. 2014). Hier handelt es sich um frühe Gene, die Zta und Rta codieren. Sie werden von den Promotoren Zp und Rp transkribiert. Beide Gene werden für die komplette Expression früher und später EBV Proteine benötigt, was zur Vermehrung des Virus führt. Es sind auch spezifische CD8⁺ T-Zellen beschrieben mit Spezifität für BZLF1 und BMLF1 (Hatton et al. 2014). BART5 ist unter anderem dafür verantwortlich, dass das Protein PUMA, ein durch p53 hoch regulierter Modulator der Apoptose, welcher ein proapoptotisches Protein der BH3-Klasse der Bcl-2-Familie ist, inhibiert wird und hat dadurch einen anti-apoptotischen Effekt (Choy et al. 2008). Ein anderes durch EBV beeinflusstes antiapoptotisches Protein ist BIM (BCL2 interacting modulator of cell death), ein

Protein der BH3-Familie. Hier sind insbesondere die miRNAs BART1, BART3, BART9, BART11 und BART12 beteiligt (Marquitz et al. 2011).

BART22 hat neben LMP2a, wie oben beschrieben, auch TOMM22 (translocase of outer mitochondrial membrane 22 homologue) als potentiell Zielgen, welches ein Teil eines mitochondrialen Komplexes ist, der als Rezeptor für pro-apoptotische Proteine u.a. BAX (BCL associated protein x) fungiert (Dölken et al. 2010). Auch BART16 hat TOMM22 als Zielgen. BART20-5p hat hingegen BAD (BCL2 associated death promotor protein) als Zielgen, welches zur Familie der BH3 pro-apoptotischen Proteine gehört (Kim et al. 2015). Caspase 3 (**cysteine-aspartic acid protease**), ebenfalls ein an der Apoptose beteiligtes Protein, wurde als Zielgen für BART1-3p und ebenfalls BART16 identifiziert (Vereide et al. 2014). Vier BART-miRNAs (BART5-5p, BART7-3p, BART9-3p und BART14-3p) regulieren die Proteinkinase ATM (ataxia telangiectasia mutated), ein Enzym, welches DNA-Doppelstrangbrüche registriert und eine Signalkaskade bis hin zur Einleitung der Apoptose bei größeren Zellschäden in Gang bringen kann (Lung et al. 2018). Diese Ergebnisse zeigen, dass EBV-miRNAs wesentlich in die Regulation der Apoptose involviert sind. Über die Regulation von BACH-1 durch BART4 und BHRF1-2 wird die Zelle indirekt vor oxidativem Stress geschützt durch die Hochregulation antioxidativer Proteine (Skalsky et al. 2012). Hierdurch wird die Wirtszelle geschützt und deren Überleben verlängert.

Eine andere Arbeitsgruppe beschreibt, dass miRNA BART18-5p die MAP3 Kinase 2 beeinflusst. Diese ist in eine Signalkaskade involviert, welche zur Initiierung des lytischen Zyklus führt. Durch Blockierung dieser Kinase verhindert BART18-5p also den Übergang in die lytische Phase. Somit wird die Latenzphase unterstützt und aufrechterhalten. Man könnte sogar vermuten, dass diese miRNA den unregulierten Übergang des Virus in die lytische Phase in latent infizierten B-Zellen verhindert und damit das Überleben des Virus sichert (Qiu und Thorley-Lawson 2014).

Desweiteren wurde beschrieben, dass die miRNA BART6-5p das Enzym DICER beeinflusst, welches wie bereits zuvor dargestellt beim Spleißvorgang der miRNAs eine Rolle spielt. Dies zeigt wiederum die bedeutende Rolle der miRNAs während des Prozessierens in der Wirtszelle (Skalsky et al. 2012).

MiRNAs des BHRF1-2 Clusters nehmen Einfluss auf den IL-1 (Interleukin-1)-Signalweg, indem sie den IL1-Rezeptor 1 blockieren, was zu einer Veränderung der Zytokin-Expression im Rahmen der Immunreaktion auf EBV führt (Skinner et al. 2017).

Die miRNA BHRF1-3 nimmt Einfluss auf die Interferon-induzierten Chemokine, die T-Zellen anziehen (CXCL-11/I-TAC), was ebenfalls darauf hindeutet, dass EBV-miRNAs

einen Effekt auf das Überleben der Krebszellen im menschlichen Immunsystem ausüben (Xia et al. 2008). Auch für die EBV-miRNA BART2-5p ist dieser NK-/T-Zell Ligand (CXCL11) als Zielgen beschrieben (Nachmani et al. 2009).

BHRF1-3 wird in unserer Studie in den Gewebeproben mit maligner B-Zell-Proliferation ebenfalls exprimiert.

Die miRNA BART2 reguliert die virale DNA Polymerase BALF 5 auf dem Level der Transkription und auch des Proteins herunter (Barth et al. 2008). Außerdem inhibiert BART2 das Stress-induzierte Molekül MICB (Nachmani et al. 2009). Unsere Studie zeigt, dass BART2 reichlich in den EBV-positiven Hodgkin Lymphomen exprimiert wird (BART2-5p) und auch in den EBV-positiven malignen B-Zell-Proliferationen. Eine aktuellere Studie beschreibt, dass BART miRNAs auch *In vivo* ein Wachstum der Tumorzellen auslösen. Dies wurde im Mausmodell an verschiedenen Tumorentitäten getestet (Qiu und Thorley-Lawson 2014).

Die miRNA BART3-5p hat DICE 1 als Zielgen (deleted in cancer 1), ein Tumor-Suppressor-Gen, demnach hat eine Expression dieser miRNA ein deutliches Wachstum der Wirtszelle zur Folge (Lei et al. 2013).

EBV-miRNAs haben weitere Tumor-Suppressor-Gene zum Ziel: WIF 1 (WNT inhibitory factor 1) durch BART19-3p, APC durch BART19-3p und BART7 (Piedade und Azevedo-Pereira 2016).

BART5-3p ist ein direkter Inhibitor des Tumorsuppressorgens p53 in Nasopharynx- und Magenkarzinomzellen und somit maßgeblich am Wachstum beteiligt (Zheng et al. 2018).

Des Weiteren wurde eine Erhöhung der Expression der zellulären miRNA oncomir hsa miR 155 beschrieben durch EBV (Gatto et al. 2008). Dies ist entscheidend für die B-Zell-Transformation und Proliferation (Linnstaedt et al. 2010).

BART15 bindet NLR3P (NLR family, pyrin domain containing 3, auch bekannt als Cryopyrin) ähnlich wie die zelluläre miRNA hsa-miR-223 (Haneklaus et al. 2012). NLRP3 ist ein zelluläres Protein, welches an der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin 1 und Interleukin 18 beteiligt ist. Dadurch reduziert EBV die entzündliche Reaktion und damit die Immunantwort der Zelle auf die virale Infektion.

Häufig werden bestimmte Transkripte von mehr als einer miRNA beeinflusst, was einen synergistischen Effekt auf deren regulatorische Funktion haben könnte (John et al. 2004). Dies könnte ebenso auf EBV-miRNAs zutreffen, wenn man ihren regulatorischen Effekt auf menschliche Transkripte betrachtet.

Wie oben beschrieben führten wir in unserer Studie eine computergestützte Analyse mit Targetscan 4.2 (Grimson et al. 2007; Lewis et al. 2005) durch, um potentielle Zielgene für die EBV-miRNAs, die in unseren EBV-positiven Hodgkin Lymphomen exprimiert wurden, zu finden.

Das Ergebnis der Analyse zeigte, dass viele menschliche Transkripte von einigen der EBV-miRNAs in den Lymphomen beeinflusst werden, insbesondere solche, die eine regulatorische Funktion während des Transkriptionsvorgangs haben (zusammengefasst in Tabelle 10). Die Faktoren KLF12, PRPF4B und PURA sind mit besonderem Interesse zu betrachten, da sie in ihrem 3'UTR-Ende Bindungsstellen für fünf verschiedene in den Hodgkin Lymphomen exprimierte miRNAs besitzen (siehe Tabelle 10).

KLF12 gehört zur Klasse der Zink-Finger-Proteine und supprimiert die Transkription von AP-2 α (Activator protein-2 α), indem es an einen Regulator im Promotor des AP-2 α Gens bindet (Schuierer 2001). Die AP-2 Proteine sind Transkriptionsfaktoren, welche aus DNA-bindenden Proteinen bestehen (AP-2 α , - β , - γ) (Moser et al. 1995; Williams et al. 1988). Räumlich und zeitlich eingegrenzte Expressionsmuster bieten Hinweise für die embryologische Entwicklung (Mitchell et al. 1991), die Regulierung des programmierten Zelltods sowie Zellwachstum und Differenzierung (Zhang et al. 1996). Unkontrollierte Expression von AP-2-Genen steht in Zusammenhang mit maligner Transformation von Zellen sowie erhöhter Expression von Wachstumsfaktoren (Bosher et al. 1995; Kannan et al. 1994).

AP-2 α selber reguliert transkriptionelle Zielgene von c-Myc sowie die c-Myc-induzierte Apoptose stark negativ (Gaubatz et al. 1995; Hilger-Eversheim et al. 2000).

PRPF4B (auch als PRP4K bekannt) spielt eine entscheidende Rolle während des Zusammenbaus der Spliceosomen. Spliceosomen spielen wiederum eine wichtige Rolle bei der Prozessierung von pre-mRNA und bestehen aus vielen Unterkomplexen, welche nacheinander aktiviert werden (Will und Lührmann 2011). Dies geschieht unter anderem durch Phosphorylierung verschiedener Prozessierungsfaktoren, wie z. B. PRP6 und PRP31. Hier scheint PRP4B eine entscheidende Rolle zu spielen (Schneider et al. 2010).

Das PURA (purine rich binding element protein A) Gen kodiert für das Protein Pur alpha, welches ein Einzelstrang-DNA-Bindungsprotein ist. Es ist in die Kontrolle von Wachstum und Zellzyklus auf verschiedenen Ebenen involviert (Wortman et al. 2010). Unter anderem scheint es die Progression des Zellzyklus zu beeinflussen, indem die Aktivität des Transkriptionsfaktors E2F-1 inhibiert wird (Darbinian et al. 1999). Hierbei handelt es sich um einen regulatorischen Faktor des Zellzyklus. Viele Gene, deren Expression für die S-Phase notwendig ist, werden durch E2F hoch reguliert (La Thangue 1994). Zudem soll PURA

auch eine Rolle bei der Replikation viraler DNA stehen (Chen et al. 1995; Daniel et al. 2001).

Eine weitere Studie hat außerdem gezeigt, dass EBV-miRNAs und miRNAs der Wirtszellen synergistisch fungieren. Zum Teil bestehen identische Basenpaar-Sequenzen. Hier wurden EBV-positive Zellen aus Burkitt Lymphomen untersucht (Riley et al. 2012).

Die Frage, ob diese Faktoren, die potentiell während der latenten Infektion durch EBV-miRNAs in Hodgkin Lymphomen beeinflusst werden, eine Bedeutung für die klinische Progression oder Prognose haben, muss in weiteren zukünftigen Studien untersucht werden.

4.8 EBV und MS:

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche neurologische Erkrankung, bei der die Myelinscheide im ZNS angegriffen und zerstört wird, was zu Neurodegeneration führt (Frischer et al. 2009; Lassmann et al. 2007). Der Zusammenhang zwischen der Entstehung der Erkrankung und einer Infektion mit EBV wird kontrovers diskutiert. Die Arbeitsgruppe um H. Lassmann hat sich 2011 ausführlich mit den verschiedenen Hypothesen und Studien beschäftigt und versucht, zu einer Schlussfolgerung zu gelangen.

So beruht eine Vermutung zur Entstehung der Multiplen Sklerose auf der Hypothese einer autoimmunen Reaktion gegen neurale Antigene (Stinissen et al. 1997). Eine andere Vermutung ist die, dass eine chronische oder persistierende Infektion zu einer überschießenden Immunantwort oder sogar autoimmunen Reaktion führt und somit die Entstehung von Multipler Sklerose triggert. EBV wäre ein Virus, das für eine solche Infektion in Frage käme und wurde bereits vielfach daraufhin untersucht (Lünemann und Münz 2009; Maghzi et al. 2011; Salvetti et al. 2009). Dafür sprechen zum einen epidemiologische Aspekte, da Patienten, die an MS erkranken, gehäuft auch mit EBV infiziert sind. Außerdem kann im Serum von MS-Patienten häufig ein erhöhtes Level an EBV-Antigenen, insbesondere EBNA1, gefunden werden (Ascherio und Munger 2010). Welche Rolle EBV allerdings genau spielt, ob Trigger oder Auslöser einer überschießenden Immunreaktion, ist noch ungeklärt, da auch der tatsächliche Anteil EBV-positiver B-Zellen in MS-Herden durch die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen nicht valide gesichert werden kann (Lassmann et al. 2011).

So gibt es einige Vermutungen. Im Sinne eines molekularen Mimikry wurden T-Zellen spezifisch für Myelin-Basisches-Protein gefunden, die mit einem EBV-DNA-Polymerase-

Peptid kreuzreagierten (Lang et al. 2002; Ufret-Vincenty et al. 1998). Auch EBV-spezifische T-Zellen, die wiederum mit Myelin-Basischem-Protein kreuzreagieren, wurden gefunden (Holmøy et al. 2004) sowie EBNA1-spezifische CD 4⁺ T-Zellen, die mit Myelin-Antigenen kreuzreagieren (Lünemann et al. 2008).

EBV persistiert während der latenten Infektion in den zirkulierenden B-Zellen. Wichtiges Kennzeichen der MS ist die kontinuierliche B-Zell-Aktivierung im intrathekalen Raum (Obermeier et al. 2008; Owens et al. 2009). Dies könnte zur Aufrechterhaltung eines chronisch entzündlichen Prozesses und somit zur multiplen Sklerose führen (Pender 2003; Serafini et al. 2007).

Es wurde ebenfalls ein Zusammenhang mit den infizierten B-Zellen und den zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen postuliert. Laut dieser Studien ist dieses Phänomen insbesondere bei der MS, nicht aber bei anderen autoimmunen Entzündungskrankheiten zu finden (Serafini et al. 2010; 2007). Auch eine Interaktion zwischen EBV-spezifischen CD8⁺ Zellen und infizierten Zellen und somit eine möglicherweise Virus-getriggerte Autoimmunreaktion wurde postuliert (Serafini et al. 2019).

Im Rahmen einer Infektion mit EBV können virale miRNAs und Proteine über Exosomen transferiert werden (Meckes et al. 2010; Pegtel et al. 2010). Die Entleerung solcher Exosomen wurde beispielsweise in NPC-Zellen beobachtet. Hierbei wurden miRNAs aller Cluster sowie LMP1 transportiert (Meckes et al. 2010).

Dies könnte das Auftreten von Multipler Sklerose im Zusammenhang mit EBV erklären. Auch wenn in den infektiösen Läsionen keine virale RNA gefunden werden kann, könnten die durch Exosomen heraustransportierten miRNAs an der Pathogenese beteiligt sein (Ascherio und Munger 2010; Levin et al. 2010; Thacker et al. 2006).

Mehrere Studiengruppen konnten mit Hilfe unterschiedlicher Methoden wie *In-situ*-Hybridisierung oder PCR keine Hinweise auf EBV in Gewebe von MS Patienten detektieren (Peferoen et al. 2010; Sargsyan et al. 2010).

Von einer Arbeitsgruppe, Serafini und Aloisi, wurden hingegen vermehrt EBV-positive B-Zellaggregate im MS-Gewebe mittels ISH identifiziert, was bisher nicht reproduziert werden konnte (Serafini et al. 2010; 2007). Dieses Phänomen ist durch verschiedene Ursachen zu erklären. Auch wenn in den verschiedenen Studien eine ähnliche Methodik gewählt wurde, ist die Durchführung dieser nicht immer zu vergleichen und führt zu unterschiedlichen Ergebnissen. Dies hängt unter anderem mit der Qualität der Gewebeproben und der unterschiedlichen Ausprägung der Erkrankung bzw. der Unterscheidung der Läsionen in

Alter, Typ und Schweregrad zusammen (Hans Lassmann et al. 2011; Lassmann et al. 2007).

Daher erscheint es sehr relevant, eine sensitive und spezifische Methode zur Detektion des Virus unabhängig von der Gewebequalität zu finden.

In dieser Arbeit wird eine Methode zum EBV-Nachweis mit miRNAs mittels einer qPCR der EBV-miRNAs in archiviertem Gewebe etabliert. Anhand dieser Studie könnte in Zukunft auch die Frage des Vorhandenseins und der Bedeutung von EBV bei der Multiplen Sklerose und weiteren EBV-assoziierten Pathologien weiter bearbeitet werden.

5. Zusammenfassung

Das Epstein-Barr-Virus besitzt 40 verschiedene miRNAs, welche verschiedene Auswirkungen auf die Gene einer Wirtszelle haben und somit deren mRNA-Profil verändern können. In unserer Studie wurden Expressionsmuster dieser miRNAs in EBV-positiven Hodgkin Lymphomen und B-Zell-Proliferationen mittels umfassender qPCR-Messungen dargestellt. Hierfür wurden Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE) Gewebeproben verwendet. Der EBV-Status der Proben wurde zuvor bereits mittels der Goldstandard Methode der EBER-*in-situ*-Hybridisierung festgestellt.

Die Messung der miRNAs erfolgte nach Deparaffinisierung der Gewebeproben mittels qPCR und RT-PCR, die statistische Auswertung in Form von ROC-Kurven, wobei die Fläche unter der Kurve (AUC) als Maß für die Diskriminierungsfähigkeit der jeweiligen miRNA galt. Hierbei reflektierten besonders hohe AUC-Werte ein hohes Expressionslevel und eine entsprechend gute Diskriminierungsfähigkeit der jeweiligen miRNA. Insgesamt zeigte sich, dass EBV-miRNAs in FFPE Gewebe gut zu detektieren sind. Hierbei war eine Kombination der miRNAs mit der höchsten Diskriminierungsfähigkeit in der Sensitivität und Spezifität vergleichbar mit der Goldstandard Methode der EBER-*in-situ*-Hybridisierung.

EBV verweilt lebenslang latent in einer einmal befallenen Wirtszelle und durchläuft dabei verschiedene Latenzphasen, in denen unterschiedliche Proteine und unterschiedliche miRNAs des Virus exprimiert werden. In den EBV-positiven Hodgkin-Lymphom-Proben dieser Studie zeigte sich ein Expressionsmuster der EBV-miRNAs, welches auf den Latenztyp II des Virus hindeutet. Dies deckte sich auch mit bisherigen Veröffentlichungen.

Die in unserer Studie besonders hoch exprimierten miRNAs wurden mit Hilfe einer computergesteuerten Prädiktion unterschiedlichen zellulären Zielgenen zugeordnet. Hierbei können mehrere miRNAs dasselbe Zielgen regulieren. Diese potentiellen Zielgene stehen größtenteils in Zusammenhang mit regulatorischen Funktionen im Bereich der mRNA-Transkription.

Bei der Untersuchung der Funktionen der EBV-miRNAs und ihrer Zielgene anhand der Literatur zeigte sich ebenfalls eine Häufung im Bereich der Regulation des Wachstums und der Apoptose der Zelle. Dies führte zu der Hypothese, dass EBV und dessen miRNAs eine Rolle in der Tumorgenese verschiedener Krebserkrankungen sowie bei chronisch entzündlichen Erkrankungen spielen können. Gestützt wurde dies durch zahlreiche Nachweise von EBV-miRNAs bei unterschiedlichen Krebserkrankungen wie beispielsweise NPC oder Magenkarzinomen.

Kontrovers diskutiert wurde die Bedeutung von EBV für die Pathogenese chronisch entzündlicher bzw. autoimmuner Erkrankungen am Beispiel der Multiplen Sklerose.

Insgesamt zeigte sich, dass die Messung von EBV-miRNAs mittels qPCR eine ergänzende, sensitive und spezifische Methode ist, den EBV-Status in FFPE-Gewebeproben von Hodgkin Lymphomen und anderen B-Zell-Proliferationen festzustellen. Die Methode ist von der Aussagekraft vergleichbar mit der Goldstandard Methode und hat den Vorteil, dass sie nahezu unabhängig von der Qualität des Gewebes auch in konservierten FFPE-Proben mit relativ geringem Aufwand durchgeführt werden kann.

Literaturverzeichnis

- Albanese M, Tagawa T, Buschle A, Hammerschmidt W (2017): MicroRNAs of Epstein-Barr virus control innate and adaptive antiviral immunity. *J Virol* 91, e01667-16
- Alfieri C, Birkenbach M, Kieff E (1991): Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* 181, 595-608
- Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D (2003): MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol* 13, 807-818
- Amoroso R, Fitzsimmons L, Thomas WA, Kelly GL, Rowe M, Bell AI (2010): Quantitative studies of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs provide novel insights into their regulation. *J Virol* 85, 996-1010
- Anderson P, Kedersha N, (2006): RNA granules. *J Cell Biol* 172, 803-808
- Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J (2007): The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* 318, 761-764
- Ascherio A, Munger, KL (2010): Epstein-barr-virus infection and multiple sclerosis: a review. *J Neuroimmune Pharmacol* 5, 271-277
- Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA (1998): EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 9, 395-404
- Babcock GJ, Hochberg D, Thorley-Lawson AD (2000): The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* 13, 497-506
- Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS, Satchwell SC, Séguin C (1984): DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310, 207-211
- 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
- Barth S, Pfuhl T, Mamiani A, Ehse C, Roemer K, Kremmer E, Jäker C, Höck J, Meister G, Grässer FA (2008): Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res* 36, 666-675
- Bechtel D, Kurth J, Unkel C, Küppers R (2005): Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood* 106, 4345-4350
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E (2006): mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 20, 1885-1898

- 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, Denli AM, Hannon GJ (2001): The rest is silence. *RNA* 7, 1509-1521
- Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W (2006): Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 1111-1124
- 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
- Bollard CM, Cooper LJ, Heslop HE (2008): Immunotherapy targeting EBV-expressing lymphoproliferative diseases. *Best Pract Res Clin Haematol* 21, 405-420
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006): RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1097-1101
- Bosher JM, Williams T, Hurst HC (1995): The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 744-747
- Boss IW, Renne R (2011): Viral miRNAs and immune evasion. *Biochim Biophys Acta* 1809, 708-714
- Bustin SA (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193
- Cai LM, Lyu XM, Luo WR, Cui XF, Ye YF, Yuan CC, Peng QX, Wu DH, Liu TF, Wang E et al. (2015): EBV-miR-BART7-3p promotes the EMT and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by suppressing the tumor suppressor PTEN. *Oncogene* 34, 2156-2166
- Cai L, Ye Y, Jiang Q, Chen Y, Lyu X, Li J, Wang S, Liu T, Cai H, Yao K et al. (2015): Epstein-Barr virus-encoded microRNA BART1 induces tumour metastasis by regulating PTEN-dependent pathways in nasopharyngeal carcinoma. *Nat Commun* 6, 7353
- Cai X, Schäfer A, Lu S, Bilello JP, Desrosiers RC, Edwards R, Raab-Traub N, Cullen BR (2006): Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathogens* 2, e23
- Callan MF, Tan L, Annels N, Ogg GS, Wilson JD, O'Callaghan CA, Steven N, McMichael AJ, Rickinson AB (1998): Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med* 187, 1395-1402
- Carlsson J, Helenius G, Karlsson M, Lubovac Z, Andrén O, Olsson B, Klinga-Levan K, (2010): Validation of suitable endogenous control genes for expression studies of miRNA in prostate cancer tissues. *Cancer Genet Cytogenet* 202, 71-75

- Chen C, Li D, Guo N (2009): Regulation of cellular and viral protein expression by the Epstein-Barr virus transcriptional regulator Zta: implications for therapy of EBV associated tumors. *Cancer Biol Ther* 8, 987-995
- Chen NN, Chang CF, Gallia GL, Kerr DA, Johnson EM, Krachmarov CP, Barr SM, Frisque RJ, Bollag B, Khalili K (1995): Cooperative action of cellular proteins YB-1 and Pur alpha with the tumor antigen of the human JC polyomavirus determines their interaction with the viral lytic control element. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1087-1091
- Chen SJ, Chen GH, Chen YH, Liu CY, Chang KP, Chang YS, Chen HC (2010): Characterization of Epstein-Barr virus miRNAome in nasopharyngeal carcinoma by deep sequencing. *PLoS ONE* 5, e12745
- Chervoneva I, Li Y, Schulz S, Croker S, Wilson C, Waldman SA, Hyslop T (2010): Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. *BMC Bioinformatics* 11, 253
- Choy EY-W, Siu KL, Kok KH, Lung RW-M, Tsang CM, To KF, Kwong DL-W, Tsao SW, Jin DY (2008): An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J Exp Med* 205, 2551-2560
- Clarke CA, Glaser SL, Dorfman RF, Mann R, DiGuseppe JA, Prehn AW, Ambinder RF, (2011): Epstein-Barr virus and survival after Hodgkin disease in a population-based series of women. *Cancer* 91, 1579-1587
- Claviez A (2005): Impact of latent Epstein-Barr virus infection on outcome in children and adolescents with Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol* 23, 4048-4056
- Clemens MJ, Laing KG, Jeffrey IW, Schofield A, Sharp TV, Elia A, Matys V, James MC, Tilleray VJ, (1994): Regulation of the interferon-inducible eIF-2 alpha protein kinase by small RNAs. *Biochimie* 76, 770-778
- Cohen JI, Bollard CM, Khanna R, Pittaluga S (2008): Current understanding of the role of Epstein-Barr virus in lymphomagenesis and therapeutic approaches to EBV-associated lymphomas. *Leuk Lymphoma* 49, 27-34
- Cohen JI (2000): Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 343, 481-492
- Cosmopoulos K, Pegtel M, Hawkins J, Moffett H, Novina C, Middeldorp J, Thorley-Lawson DA (2008): Comprehensive profiling of Epstein-Barr Virus microRNAs in Nasopharyngeal Carcinoma. *J Virol* 83, 2357-2367
- Cullen BR (2006): Viruses and microRNAs. *Nat Genet* 38, 25-30
- Daniel DC, Wortman MJ, Schiller RJ, Liu H, Gan L, Mellen JS, Chang CF, Gallia GL, Rappaport J, Khalili K et al. (2001): Coordinate effects of human immunodeficiency virus type 1 protein Tat and cellular protein Puralpha on DNA replication initiated at the JC virus origin. *J Gen Virol* 82, 1543-1553

- Darbinian N, Gallia GL, Kundu M, Shcherbik N, Tretiakova A, Giordano A, Khalili K, (1999): Association of Pur alpha and E2F-1 suppresses transcriptional activity of E2F-1. *Oncogene* 18, 6398-6402
- Delecluse S, Yu J, Bernhardt K, Haar J, Poirey R, Tsai MH, Kiblawi R, Kopp-Schneider A, Schnitzler P, Zeier M et al. (2019): Spontaneous lymphoblastoid cell lines from patients with Epstein-Barr virus infection show highly variable proliferation characteristics that correlate with the expression levels of viral microRNAs. *PLoS ONE* 14, e0222847
- De Paschale M, Clerici P (2012): Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J Virol* 1, 31-43
- Diepstra A, van Imhoff GW, Schaapveld M, Karim-Kos H, van den Berg A, Vellenga E, Poppema S (2009): Latent Epstein-Barr Virus infection of tumor cells in Classical Hodgkin's Lymphoma predicts adverse outcome in older adult patients. *J Clin Oncol* 27, 3815-3821
- Dolcetti R, Boiocchi M, Ghoghini A, Carbone A (2001): Pathogenetic and histogenetic features of HIV-associated Hodgkin's disease. *Eur J Cancer* 37, 1276-1287
- Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE (2008): Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* 10, 203-211
- Dölken L, Malterer G, Erhard F, Kothe S, Friedel CC, Suffert G, Marcinowski L, Motsch N, Barth S, Beitzinger M et al. (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
- Eisele S, Krumbholz M, Fischer M-T, Mohan H, Junker A, Arzberger T, Hohlfeld R, Bradl M, Lassmann H, Meinel E (2012): Prospects of transcript profiling for mRNAs and microRNAs using formalin-fixed and paraffin-embedded dissected autoptic Multiple Sclerosis lesions: transcript profiling in FFPE tissue. *Brain Pathol* 22, 607-618
- Epstein MA, Achong BG, Barr YM (1964): Virus particles in cultures lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1, 702-703
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006): Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 259-269
- Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E (2008): Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132, 9-14
- Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, Huntzinger E, Yang S-F, Doerks T, Dorner S, Bork P, Boutros M, Izaurralde E (2007): Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev* 21, 2558-2570
- Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T (2011): miRNAs in human cancer. *J Pathol* 223, 102-115

- Fatima N, Toscano MP, Hunter SB, Cohen C (2010): Controversial role of Epstein-Barr virus in Multiple Sclerosis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 19, 246-252
- Feederle R, Haar J, Bernhardt K, Linnstaedt SD, Bannert H, Lips H, Cullen BR, Delecluse H-J (2011): The members of an Epstein-Barr virus microRNA cluster cooperate to transform B lymphocytes. *J Virol* 85, 9801-9810
- Ferrajoli A, Ivan C, Ciccone M, Shimizu M, Kita Y, Ohtsuka M, D'Abundo L, Qiang J, Lerner S, Nouraei N et al. (2015): Epstein-Barr Virus microRNAs are expressed in patients with Chronic Lymphocytic Leukemia and correlate with overall survival. *EBioMedicine* 2, 572-582
- Flavell KJ (2003): The effect of Epstein-Barr virus status on outcome in age- and sex-defined subgroups of patients with advanced Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 14, 282-290
- Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW (2006): Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 28, 1601-1613
- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009): The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 132, 1175-1189
- Gan Y-J, Razzouk BI, Su T, Sixbey JW (2002): A defective, rearranged Epstein-Barr virus genome in EBER-negative and EBER-positive Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 160, 781-786
- Gatto G, Rossi A, Rossi D, Kroening S, Bonatti S, Mallardo M (2008): Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 trans-activates miR-155 transcription through the NF-kappaB pathway. *Nucleic Acids Res* 36, 6608-6619
- Gaubatz S, Imhof A, Dosch R, Werner O, Mitchell P, Buettner R, Eilers M (1995): Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *EMBO J* 14, 1508-1519
- Gerber P, Lucas S, Nonoyama M, Perlin E, Goldstein LI, (1972): Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet* 2, 988-989
- Ghosh Z, Mallick B, Chakrabarti J (2008): Cellular versus viral microRNAs in host-virus interaction. *Nucleic Acids Res* 37, 1035-1048
- Gilligan K, Rajadurai P, Resnick L, Raab-Traub N (1990): Epstein-Barr virus small nuclear RNAs are not expressed in permissively infected cells in AIDS-associated leukoplakia. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 8790-8794
- Glavina-Durdov M, Jakic-Razumovic J, Capkun V, Murray P (2001): Assessment of the prognostic impact of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 expression in Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 84, 1227-1234
- Graser F (1991): 100 Jahre Pfeiffersches Drüsenfieber. *Klin Pädiatr* 203, 187-190

- Gregory RI, Yan K-P, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R (2004): The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235-240
- Grimson A, Farh KK-H, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP (2007): MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27, 91-105
- 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
- Gross U: *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 2. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2009
- Grundhoff A (2006): A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. *RNA* 12, 733-750
- Grundhoff A, Sullivan CS (2011): Virus-encoded microRNAs. *Virology* 411, 325-343
- Grywalska E, Rolinski J (2015): Epstein-Barr Virus-Associated Lymphomas. *Semin Oncol* 42, 291-303
- Gulley ML, Tang W (2008): Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn* 10, 279-292
- Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G, Franzmann MB, Karkov J, Black F, Skinhøj P, Pedersen C (1991): AIDS-related lymphoma. Histopathology, immunophenotype, and association with Epstein-Barr virus as demonstrated by in situ nucleic acid hybridization. *Am J Pathol* 138, 149-163
- Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G (1994): Detection of Epstein-Barr virus small RNAs in routine paraffin sections using non-isotopic RNA/RNA in situ hybridization. *Histopathology* 25, 101-111
- Hammerschmidt W, Sugden B (1989): Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* 340, 393-397
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296
- Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ (2001): Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293, 1146-1150
- Han J, Lee Y, Yeom K-H, Kim Y-K, Jin H, Kim VN (2004): The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18, 3016-3027
- Haneklaus M, Gerlic M, Kurowska-Stolarska M, Rainey A-A, Pich D, McInnes IB, Hammerschmidt W, O'Neill LAJ, Masters SL (2012): Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1 β production. *J Immunol* 189, 3795-3799

- Hatton OL, Harris-Arnold A, Schaffert S, Krams SM, Martinez OM (2014): The interplay between Epstein-Barr virus and B lymphocytes: implications for infection, immunity, and disease. *Immunol Res* 58, 268-276
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ et al. (2005): A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828-833
- Heilmann AMF, Calderwood MA, Portal D, Lu Y, Johannsen E (2012): Genome-wide analysis of Epstein-Barr virus Rta DNA binding. *J Virol* 86, 5151-5164
- Henle G, Henle W, Diehl V, (1968): Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 59, 94-101
- Herbst H, Niedobitek G, Kneba M, Hummel M, Finn T, Anagnostopoulos I, Bergholz M, Krieger G, Stein H (1990): High incidence of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 137, 13-18
- Herold G (Hrsg): *Innere Medizin*, 2011th ed Köln
- Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R (2000): Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 260, 1-12
- Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, Dörken B, Zenke M, Stein H, Scheidereit C (2002): Nuclear Factor κ B-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *Journal Exp Med* 196, 605-617
- Hochberg D, Middeldorp JM, Catalina M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Thorley-Lawson DA, (2004): Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 239-244
- Holmøy T, Kvale EØ, Vartdal F (2004): Cerebrospinal fluid CD4+ T cells from a multiple sclerosis patient cross-recognize Epstein-Barr virus and myelin basic protein. *J Neurovirol* 10, 278-283
- Howe JG, Steitz JA (1986): Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 9006-9010
- Humphreys DT, Westman BJ, Martin DIK, Preiss T (2005): MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 16961-16966
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint 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
- Iizasa H, Wulff B-E, Alla NR, Maragkakis M, Megraw M, Hatzigeorgiou A, Iwakiri D, Takada K, Wiedmer A, Showe L et al. (2010): Editing of Epstein-Barr Virus-encoded

BART6 microRNAs controls their Dicer targeting and consequently affects viral latency. *J of Biol Chem* 285, 33358-33370

Imig J, Motsch N, Zhu JY, Barth S, Okoniewski M, Reineke T, Tinguely M, Faggioni A, Trivedi P, Meister G et al. (2011): microRNA profiling in Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma. *Nucleic Acids Res* 39, 1880-1893

Jarrett RF (2005): Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study. *Blood* 106, 2444-2451

John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS (2004): Human microRNA targets. *PLoS Biol.* 2, e363

Joseph AM, Babcock GJ, Thorley-Lawson DA (2000): Cells expressing the Epstein-Barr virus growth program are present in and restricted to the naive B-cell subset of healthy tonsils. *J Virol* 74, 9964-9971

Jung Y-J, Choi H, Kim H, Lee SK (2014): MicroRNA miR-BART20-5p stabilizes Epstein-Barr virus latency by directly targeting BZLF1 and BRLF1. *J Virol* 88, 9027-9037

Junker A, Krumbholz M, Eisele S, Mohan H, Augstein F, Bittner R, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R, Meinl E (2009): MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain* 132, 3342-3352

Kanda T, Miyata M, Kano M, Kondo S, Yoshizaki T, Iizasa H (2015): Clustered microRNAs of the Epstein-Barr virus cooperatively downregulate an epithelial cell-specific metastasis suppressor. *J Virol* 89, 2684-2697

Kannan P, Buettner R, Chiao PJ, Yim SO, Sarkiss M, Tainsky MA (1994): N-ras oncogene causes AP-2 transcriptional self-interference, which leads to transformation. *Genes Dev* 8, 1258-1269

Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K (1996): Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 184, 1495-1505

Kapatai G, Murray P (2006): Contribution of the Epstein Barr Virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J Clin Pathol* 60, 1342-1349

Kashofer K, Viertler C, Pichler M, Zatloukal K (2013): Quality control of RNA preservation and extraction from paraffin-embedded tissue: implications for RT-PCR and microarray analysis. *PLoS ONE* 8, e70714

Keegan TH, Glaser SL, Clarke CA, Gulley ML, Craig FE, DiGuseppe JA, Dorfman RF, Mann RB, Ambinder RF (2005): Epstein-Barr virus as a marker of survival after Hodgkin's lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncology* 23, 7604-7613

Khan G, Coates PJ, Kangro HO, Slavin G (1992): Epstein Barr virus (EBV) encoded small RNAs: targets for detection by in situ hybridisation with oligonucleotide probes. *J Clin Pathol* 45, 616-620

- Khanna R, Moss DJ, Burrows SR (1999): Vaccine strategies against Epstein-Barr virus-associated diseases: lessons from studies on cytotoxic T-cell-mediated immune regulation. *Immunol Rev* 170, 49-64
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003): Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216
- Kim H, Choi H, Lee SK (2015): Epstein-Barr virus miR-BART20-5p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting BAD. *Cancer Lett* 356, 733-742
- Kokkat TJ, Patel MS, McGarvey D, LiVolsi VA, Baloch ZW (2013): Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: a valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein. *Biopreserv Biobank* 11, 101-106
- Kozera B, Rapacz M (2013): Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 54, 391-406
- Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N (2005): Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495-500
- Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H (2001): NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21, 3964-3973
- Kulwichit W, Edwards RH, Davenport EM, Baskar JF, Godfrey V, Raab-Traub N (1998): Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 11963-11968
- Küppers, R (2003): B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 3, 801-812
- Kutok JL, Wang F (2006): Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 1, 375-404
- Kwon JM, Park YH, Kang JH, Kim K, Ko YH, Ryoo BY, Lee SS, Lee SI, Koo HH, Kim WS (2006): The effect of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol* 85, 463-468
- La Thangue NB (1994): DRTF1/E2F: an expanding family of heterodimeric transcription factors implicated in cell-cycle control. *Trends Biochem Sci* 19, 108-114
- Lagos-Quintana M (2001): Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858
- Laichalk LL, Hochberg D, Babcock GJ, Freeman RB, Thorley-Lawson DA (2002): The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. *Immunity* 16, 745-754
- Lang G: *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2. Auflage; Springer Verlag, Wien 2013.

Lang HLE, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, Hjorth P, Sondergaard L, Svejgaard A, Wucherpfennig K et al. (2002): A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 3, 940-943

Lassmann H, Niedobitek G, Aloisi F, Middeldorp JM, the NeuroproMiSe EBV Working Group (2011): Epstein-Barr virus in the multiple sclerosis brain: a controversial issue-report on a focused workshop held in the Centre for Brain Research of the Medical University of Vienna, Austria. *Brain* 134, 2772-2786

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF (2007): The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 17, 210-218

Lau NC (2001): An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854

Lee RC (2001): An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864

Lee Y (2002): MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21, 4663-4670

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S et al. (2003): The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004): MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 4051-4060

Lei T, Yuen K-S, Xu R, Tsao SW, Chen H, Li M, Kok K-H, Jin D-Y (2013): Targeting of DICE1 tumor suppressor by Epstein-Barr virus-encoded miR-BART3* microRNA in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 133, 79-87

Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A (2010): Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 67, 824-830

Levsky JM, Singer RH (2003): Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci* 116, 2833-2838

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

Linnstaedt SD, Gottwein E, Skalsky RL, Luftig MA, Cullen BR (2010): Virally induced cellular microRNA miR-155 plays a key role in B-cell immortalization by Epstein-Barr virus. *J Virol* 84, 11670-11678

Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R (2005): MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7, 719-723

Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2002): Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 297, 2053-2056

Lo AKF, To KF, Lo KW, Lung RWM, Hui JWY, Liao G, Hayward SD (2007): Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 16164-16169

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA et al. (2005): MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838

Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004): Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95-98

Lünemann JD, Jelčić I, Roberts S, Lutterotti A, Tackenberg B, Martin R, Münz C (2008): EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J Exp Med* 205, 1763-1773

Lünemann JD, Münz C (2009): EBV in MS: guilty by association? *Trends Immunol* 30, 243-248

Lung RW-M, Tong JH-M, Sung Y-M, Leung P-S, Ng DC-H, Chau S-L, Chan AW-H, Ng EK-O, Lo K-W, To K-F (2009): Modulation of LMP2A expression by a newly identified Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART22. *Neoplasia* 11, 1174-1184

Lung RW-M, Hau PM, Yu KHO, Yip KY, Tong JH-M, Chak WP, Chan AW-H, Lam KH, Lo AK-F, Tin EK-Y et al. (2018): EBV-encoded miRNAs target ATM-mediated response in nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol* 244, 394-407

Maghzi A-H, Marta M, Bosca I, Etemadifar M, Dobson R, Maggiore C, Giovannoni G, Meier U-C (2011): Viral pathophysiology of multiple sclerosis: A role for Epstein-Barr virus infection? *Pathophysiology* 18, 13-20

Mancao C, Altmann M, Jungnickel B, Hammerschmidt W (2005): Rescue of “crippled” germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood* 106, 4339-4344

Marquitz AR, Mathur A, Chugh PE, Dittmer DP, Raab-Traub N (2014): Expression profile of microRNAs in Epstein-Barr virus-infected AGS gastric carcinoma cells. *J Virol* 88, 1389-1393

Marquitz AR, Mathur A, Edwards RH, Raab-Traub N (2015): Host gene expression is regulated by two types of noncoding RNAs transcribed from the Epstein-Barr virus BamHI a rightward transcript region. *J Virol* 89, 11256-11268

Marquitz AR, Mathur A, Nam CS, Raab-Traub N (2011): The Epstein-Barr virus BART microRNAs target the pro-apoptotic protein Bim. *Virology* 412, 392-400

Massini G, Siemer D, Hohaus S (2009): EBV in Hodgkin Lymphoma. *Medit J Hemat Infect Dis* 1 e2009013

- Mathas S, Janz M, Hummel F, Hummel M, Wollert-Wulf B, Lusatis S, Anagnostopoulos I, Lietz A, Sigvardsson M, Jundt F et al. (2006): Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol* 7, 207-215
- Meckes DG, Shair KHY, Marquitz AR, Kung C-P, Edwards RH, Raab-Traub N (2010): Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 20370-20375
- Mi H, Dong Q, Muruganujan A, Gaudet P, Lewis S, Thomas PD (2009): PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic Acids Res* 38, D204-D210
- Miller CL, Burkhardt AL, Lee JH, Stealey B, Longnecker R, Bolen JB, Kieff E (1995): Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* 2, 155-166
- Miller G, Niederman JC, Andrews LL (1973) Prolonged oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus after infectious mononucleosis. *N Engl J Med* 288, 229-232
- Miller G, El-Guindy A, Countryman J, Ye J, Gradoville L (2007): Lytic cycle switches of oncogenic human gammaherpesviruses. *Adv Cancer Res* 97, 81-109
- Mitchell PJ, Timmons PM, Hébert JM, Rigby PW, Tjian R (1991): Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev* 5, 105-119
- Miyashita EM, Yang B, Babcock GJ, Thorley-Lawson DA (1997): Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol* 71, 4882-4891
- Moser M, Imhof A, Pscherer A, Bauer R, Amselgruber W, Sinowatz F, Hofstädter F, Schüle R, Buettner R (1995): Cloning and characterization of a second AP-2 transcription factor: AP-2 beta. *Development* 121, 2779-2788
- Motsch N, Alles J, Imig J, Zhu J, Barth S, Reineke T, Tinguely M, Cogliatti S, Dueck A, Meister G et al. (2012): MicroRNA profiling of Epstein-Barr virus-associated NK/T-cell lymphomas by deep sequencing. *PLoS ONE* 7, e42193
- Mueller O, Hahnenberger K, Dittmann M, Yee H, Dubrow R, Nagle R, Ilsley D (2000): A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis* 21, 128-134
- Murphy JK, Young LS, Bevan IS, Lewis FA, Dockey D, Ironside JW, O'Brien CJ, Wells M (1990): Demonstration of Epstein-Barr virus in primary brain lymphoma by In situ DNA hybridisation in paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* 43, 220-223
- Murray PG, Young LS, Rowe M, Crocker J (1992): Immunohistochemical demonstration of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein in paraffin sections of Hodgkin's disease. *J Pathol* 166, 1-5

- 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
- Niedobitek G, Herbst H, Young LS, Brooks L, Masucci MG, Crocker J, Rickinson AB, Stein H (1992): Patterns of Epstein-Barr virus infection in non-neoplastic lymphoid tissue. *Blood* 79, 2520-2526
- Niller HH, Wolf H, Minarovits J (2008): Regulation and dysregulation of Epstein-Barr virus latency: implications for the development of autoimmune diseases. *Autoimmunity* 41, 298-328
- Obermeier B, Mentele R, Malotka J, Kellermann J, Kämpfel T, Wekerle H, Lottspeich F, Hohlfeld R, Dornmair K (2008): Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nat Med* 14, 688-693
- Ok CY, Li L, Young KH (2015): EBV-driven B-cell lymphoproliferative disorders: from biology, classification and differential diagnosis to clinical management. *Exp Mol Med* 47, e132
- Olsen PH, Ambros V (1999): The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 216, 671-680
- Owens GP, Bennett JL, Lassmann H, O'Connor KC, Ritchie AM, Shearer A, Lam C, Yu X, Birlea M, DuPree C et al. (2009): Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* 65, 639-649
- Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS (1991): Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. *Lancet* 337, 320-322
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P et al. (2000): Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-89
- Pearson G, Dewey F, Klein G, Henle G, Henle W (1970): Relation between neutralization of Epstein-Barr virus and antibodies to cell-membrane antigens-induced by the virus. *J Natl Cancer Inst* 45, 989-995
- Peferoen LAN, Lamers F, Lodder LNR, Gerritsen WH, Huitinga I, Melief J, Giovannoni G, Meier U, Hintzen RQ, Verjans GM et al. (2010): Epstein Barr virus is not a characteristic feature in the central nervous system in established multiple sclerosis. *Brain* 133, e137
- Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MAJ, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Würdinger T, Middeldorp JM (2010): Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 6328-6333
- Pender MP (2003): Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases. *Trends Immunol* 24, 584-588

- Petersen CP, Bordeleau M-E, Pelletier J, Sharp PA (2006): Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 21, 533-542
- Pfeffer S (2004): Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304, 734-736
- Piedade D, Azevedo-Pereira J (2016): The role of microRNAs in the pathogenesis of Herpesvirus infection. *Viruses* 8, 156
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W (2005): Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309, 1573-1576
- Plaisance-Bonstaff K, Renne R (2011): Viral miRNAs. *Methods Mol Biol* 721, 43-66
- Pratt ZL, Kuzembayeva M, Sengupta S, Sugden B (2009): The microRNAs of Epstein-Barr Virus are expressed at dramatically differing levels among cell lines. *Virology* 386, 387-397
- Qiu J, Thorley-Lawson DA (2014): EBV microRNA BART 18-5p targets MAP3K2 to facilitate persistence in vivo by inhibiting viral replication in B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 11157-11162
- Razzouk BI, Srinivas S, Sample CE, Singh V, Sixbey JW (1996): Epstein-Barr Virus DNA recombination and loss in sporadic Burkitt's lymphoma. *J Infect Dis* 173, 529-535
- Reedman BM, Klein G (1973): Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int J Cancer* 11, 499-520
- Reinard T: *Molekularbiologische Methoden*, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart 2010.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000): The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906
- Reinhart BJ, Bartel DP (2002): Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* 297, 1831
- Renné, C, Martin-Subero JJ, Eickernjäger M, Hansmann M-L, Küppers R, Siebert R, Bräuninger A (2006): Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 169, 655-664
- Riley KJ, Rabinowitz GS, Yario TA, Luna JM, Darnell RB, Steitz JA (2012): EBV and human microRNAs co-target oncogenic and apoptotic viral and human genes during latency. *EMBO J* 31, 2207-2221
- Sakamoto K, Sekizuka T, Uehara T, Hishima T, Mine S, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Kuroda M, Katano H (2017): Next-generation sequencing of miRNAs in clinical samples of Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas. *Cancer Med* 6, 605-618

Salvetti M, Giovannoni G, Aloisi F (2009): Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 22, 201-206

Sargsyan SA, Shearer AJ, Ritchie AM, Burgoon MP, Anderson S, Hemmer B, Stadelmann C, Gattenlöhner S, Owens GP, Gilden D et al. (2010): Absence of Epstein-Barr virus in the brain and CSF of patients with multiple sclerosis. *Neurology* 74, 1127-1135

Schneider M, Hsiao H-H, Will CL, Giet R, Urlaub H, Lührmann R (2010): Human PRP4 kinase is required for stable tri-snRNP association during spliceosomal B complex formation. *Nat Struct Mol Biol* 17, 216-221

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006): The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7, 3

Schuijjer M (2001): Induction of AP-2alpha Expression by Adenoviral Infection Involves Inactivation of the AP-2rep Transcriptional Corepressor CtBP1. *J of Biol Chem* 276, 27944-27949

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

Schwering I, Bräuninger A, Klein U, Jungnickel B, Tinguely M, Diehl V, Hansmann M-L, Dalla-Favera R, Rajewsky K, Küppers R (2003): Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 101, 1505-1512

Sen GL, Blau HM (2005): Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 7, 633-636

Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, Andreoni L, Trivedi P, Salvetti M, Faggioni A et al. (2007): Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 204, 2899-2912

Serafini B, Severa M, Columba-Cabezas S, Rosicarelli B, Veroni C, Chiappetta G, Magliozzi R, Reynolds R, Coccia EM, Aloisi F (2010): Epstein-Barr virus latent infection and BAFF expression in B cells in the multiple sclerosis brain: implications for viral persistence and intrathecal B-cell activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 677-693

Serafini B, Rosicarelli B, Veroni C, Mazzola GA, Aloisi F (2019): Epstein-Barr virus-specific CD8 T cells selectively infiltrate the brain in Multiple Sclerosis and interact locally with virus-infected cells: clue for a virus-driven immunopathological mechanism. *J Virol* 93, e00980-19

Skalsky RL, Corcoran DL, Gottwein E, Frank CL, Kang D, Hafner M, Nusbaum JD, Feederle R, Delecluse H-J, Luftig MA et al. (2012): The viral and cellular microRNA targetome in lymphoblastoid cell lines. *PLoS Pathog* 8 e1002484

Skalsky RL, Cullen BR, (2010): Viruses, microRNAs, and Host Interactions. *Ann Rev of Microbiology* 64, 123-141

- Skinner CM, Ivanov NS, Barr SA, Chen Y, Skalsky RL (2017): An Epstein-Barr virus microRNA blocks Interleukin-1 (IL-1) signaling by targeting IL-1 receptor 1. *J Virol* 91, e00530-17
- Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G (2000): The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell* 5, 659-669
- Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S (2002): Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 161, 1961-1971
- Staratschek-Jox A, Kotkowski S, Belge G, Rüdiger T, Bullerdiek J, Diehl V, Wolf J (2000): Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin-Reed-Sternberg cells: no evidence for the persistence of integrated viral fragments in Latent membrane protein-1 (LMP-1)-negative classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 156, 209-216
- Stinissen P, Raus J, Zhang J (1997): Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. *Crit Rev Immunol* 17, 33-75
- Strauch B, Andrews LL, Siegel N, Miller G (1974): Oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus by renal transplant recipients and other patients treated with immunosuppressive drugs. *Lancet* 1, 234-237
- Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D (2005): SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 435, 682-686
- Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A (2006): Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol* 59, 499-503
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999): Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75, 291-295
- Thermann R, Hentze MW (2007): *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* 447, 875-878
- Thomas PD, Kejariwal A, Campbell MJ, Mi H, Diemer K, Guo N, Ladunga I, Ulitsky-Lazareva B, Muruganujan A, Rabkin S et al. (2003): PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification. *Nucleic Acids Res* 31, 334-341
- Thorley-Lawson DA (2001): Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 1, 75-82
- Thorley-Lawson DA, Gross A (2004): Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 350, 1328-1337

- Tierney R, Nagra J, Hutchings I, Shannon-Lowe C, Altmann M, Hammerschmidt W, Rickinson A, Bell A (2007): Epstein-Barr virus exploits BSAP/Pax5 to achieve the B-cell specificity of its growth-transforming program. *J Virol* 81, 10092-10100
- Uchida J, Yasui T, Takaoka-Shichijo Y, Muraoka M, Kulwichit W, Raab-Traub N, Kikutani, H (1999): Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 286, 300-303
- Ufret-Vincenty RL, Quigley L, Tresser N, Pak SH, Gado A, Hausmann S, Wucherpfennig KW, Brocke S (1998): In vivo survival of viral antigen-specific T cells that induce experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 188, 1725-1738
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007): Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931-1934
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2008): Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* 7, 1545-1549
- Vento-Tormo R, Rodríguez-Ubreva J, Lisio LD, Islam ABMMK, Urquiza JM, Hernando H, López-Bigas N, Shannon-Lowe C, Martínez N, Montes-Moreno S et al. (2014): NF- κ B directly mediates epigenetic deregulation of common microRNAs in Epstein-Barr virus-mediated transformation of B-cells and in lymphomas. *Nucleic Acids Res* 42, 11025-11039
- Vereide DT, Seto E, Chiu Y-F, Hayes M, Tagawa T, Grundhoff A, Hammerschmidt W, Sugden B (2014): Epstein-Barr virus maintains lymphomas via its miRNAs. *Oncogene* 33, 1258-1264
- Vockerodt M, Cader FZ, Shannon-Lowe C, Murray P (2014): Epstein-Barr virus and the origin of Hodgkin lymphoma. *Chin J Cancer* 33, 591-597
- Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S (2007): Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev* 21, 1857-1862
- Wang M, Yu F, Wu W, Wang Y, Ding H, Qian L (2018): Epstein-Barr virus-encoded microRNAs as regulators in host immune responses. *Int J Biol Sci* 14, 565-576
- Wen K-C, Sung P-L, Yen M-S, Chuang C-M, Liou W-S, Wang P-H (2013): MicroRNAs regulate several functions of normal tissues and malignancies. *Taiwan J Obstet Gynecol* 52, 465-469
- Wightman B, Burglin TR, Gatto J, Arasu P, Ruvkun G (1991): Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev* 5, 1813-1824
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993): Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862
- Will CL, Lührmann R (2011): Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a003707

- Williams T, Admon A, Lüscher B, Tjian R (1988): Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev* 2, 1557-1569
- Wood TA, Frenkel EP (1967): The atypical lymphocyte. *Am J Med* 42, 923-936
- Wortman MJ, Hanson LK, Martínez-Sobrido L, Campbell AE, Nance JA, García-Sastre A, Johnson EM (2010): Regulation of PURA gene transcription by three promoters generating distinctly spliced 5-prime leaders: a novel means of fine control over tissue specificity and viral signals. *BMC Mol Biol* 11, 81
- Wu L, Belasco JG (2008): Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell* 29, 1-7
- Wu L, Fan J, Belasco JG (2006): MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 4034-4039
- Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J (2007): Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA* 13, 1668-1674
- Xia T, O'Hara A, Araujo I, Barreto J, Carvalho E, Sapucaia JB, Ramos JC, Luz E, Pedroso C, Manrique M et al. (2008): EBV microRNAs in primary lymphomas and targeting of CXCL-11 by ebv-mir-BHRF1-3. *Cancer Res* 68, 1436-1442
- Yang YC, Liem A, Lambert PF, Sugden B (2017): Dissecting the regulation of EBV's BART miRNAs in carcinomas. *Virology* 505, 148-154
- Yao QY, Rickinson AB, Epstein MA (1985): A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int J Cancer* 35, 35-42
- Yates JL, Warren N, Sugden B (1985): Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313, 812-815
- Yekta S, Shih I-H, Bartel DP (2004): MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304, 594-596
- Young LS, Murray PG (2003): Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 22, 5108-5121
- Zhang J, Hagopian-Donaldson S, Serbedzija G, Elsemore J, Plehn-Dujowich D, McMahon AP, Flavell RA, Williams T (1996): Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 381, 238-241
- Zhang X, Ye Y, Fu M, Zheng B, Qiu Q, Huang Z (2019): Implication of viral microRNAs in the genesis and diagnosis of Epstein-Barr virus-associated tumors. *Oncol Lett* 18, 3433-3442
- Zhao S, Liu M-F (2009): Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation. *Sci China C Life Sci* 52, 1111-1116

Zhao XF, Reitz M, Chen QC, Stass S (2011): Pathogenesis of early leukemia and lymphoma. *Cancer Biomark* 9, 341-374

Zheng X, Wang J, Wei L, Peng Q, Gao Y, Fu Y, Lu Y, Qin Z, Zhang Xu, Lu J (2018): Epstein-Barr virus microRNA miR-BART5-3p inhibits p53 expression. *J Virol* 92 e01022-18

Zhu JY, Pfuhl T, Motsch N, Barth S, Nicholls J, Grasser F, Meister G (2009): Identification of Novel Epstein-Barr Virus MicroRNA Genes from Nasopharyngeal Carcinomas. *J Virol* 83, 3333-3341

Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, Santesson L (1970): EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 228, 1056-1058